

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA
MESTRADO EM CIRURGIA

SÂNIA NARA COSTA DA ROCHA

**EFEITOS DO ÁCIDO ZOLEDRÔNICO NA CONSOLIDAÇÃO DE FRATURAS DA
DIÁFISE FEMORAL DE RATOS**

FORTALEZA

2011

SÂNIA NARA COSTA DA ROCHA

EFEITOS DO ÁCIDO ZOLEDRÔNICO NA CONSOLIDAÇÃO DE FRATURAS DA
DIÁFISE FEMORAL DE RATOS

Dissertação submetida 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.

Orientador: Prof. Dr. José Alberto Dias Leite

FORTALEZA

2011

SÂNIA NARA COSTA DA ROCHA

EFEITOS DO ÁCIDO ZOLEDRÔNICO NA CONSOLIDAÇÃO DE FRATURAS DA
DIÁFISE FEMORAL DE RATOS

Dissertação submetida 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.

Aprovada em: / /

Banca Examinadora

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

Profa. Dra. Margarida Maria de Lima Pompeu
Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Sheila Márcia de Araújo Fontenele
Faculdade de Medicina Christus

Prof. Dr. Antonio Ribeiro da Silva Filho

A Deus, por me iluminar, guiar e proteger.
A cada dia que se passa sinto toda a sua
proteção e seu amor.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Vânia Costa, pela sua força, coragem, determinação, dedicação, garra, amor e carinho. Por ser um exemplo de mulher e de mãe, sempre tão disposta a lutar pela suas filhas e sempre me estimulando a crescer como ser humano e me tornar uma pessoa melhor. Por ter acreditado tanto em mim e me ensinado a sonhar.

Às minhas irmãs, Mara e Dânia Costa, pelo companheirismo, carinho, paciência e dedicação. Por sempre estarem ao meu lado em todos os momentos da minha vida, e também terem se disponibilizado em me auxiliar tanto nessa pesquisa.

À minha avó, Maria Mirtes e á minha família. Especialmente as minhas primas, que sempre tiveram paciência para me ouvir e me estimular.

Ao meu orientador Professor Doutor José Alberto Dias Leite, pelo exemplo de profissional e ser humano. Por ter acreditado em mim, ter-me ensinado e orientado tão pacientemente, auxiliando-me em todos os momentos desta pesquisa. Pela sua dedicação, disponibilidade, amabilidade e otimismo.

Aos mantenedores da Faculdade Christus, José Lima De Carvalho Rocha e Estevão Lima de Carvalho Rocha, por ter disponibilizado todos os recursos da Faculdade Christus para o sucesso desta pesquisa. A infra-estrutura encontrada na instituição foi de extrema importância para a realização do presente trabalho.

Ao Professor Doutor Antonio Ribeiro da Silva Filho, pelo exemplo de médico e pesquisador, por estar sempre disposto a ajudar a todos e por ser tão atencioso e gentil.

Ao Professor Doutor Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos, coordenador do Programa de Pós-Graduação *Strictu Sensu* em cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará.

À Fisioterapeuta Mestre Gisele Façanha Diógenes Teixeira, por ter-me ajudado tanto nesta pesquisa, por estar sempre ao meu lado em todas as fases desse trabalho. Por ter-se tornado uma amiga tão especial, tão carinhosa e sempre disposta a me auxiliar.

Ao Médico Ortopedista, Júlio Cesar Chagas Cavalcante, pela sua amizade e ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Às minhas amigas, Gabriela Meireles Rosa, Pâmella Ramona, Samantha Macêdo, por serem tão amáveis, tão companheiras, por sempre estarem-me estimulando com suas palavras de carinho.

À Farmacêutica Livia Valérya da Cruz Paiva, sua contribuição foi essencial a este trabalho, por ser minha grande amiga de infância e me mostrar o real sentido da palavra amigo.

Aos funcionários da Faculdade de Medicina Christus, Francisco Wellington da Silva, pela sua disponibilidade e paciência e ao José Erinaldo de Souza, por ter preparado brilhantemente com tanto esmero as lâminas histológicas utilizadas nesse estudo.

Às senhoras Maria Luciene Vieira de Oliveira e Magda Maria Gomes Fontenele, secretárias do Programa de Pós- Graduação *strictu sensu* do Programa de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, por terem sempre tanto zelo com cada um dos alunos. Mostrando-se sempre competentes e dispostas a ajudar. Obrigada pelo carinho.

Aos acadêmicos de Medicina Cláudio Manuel Gonçalves da Silva Leite e Gabriela Pequeno Gomes Costa Aguiar, pelo interesse e ajuda dada a esta pesquisa.

Ao Mestre Charles Jean Gomes de Mesquita, por ter me auxiliado a encontrar o referencial teórico, no que se diz respeito à via de administração do medicamento utilizado nesse trabalho e por ter aceitado fazer parte da banca de qualificação dessa pesquisa.

Ao Professor Doutor Francisco Vagnaldo Fachine Jamacaru, por permitir a utilização de seus programas para análise dos dados nesta pesquisa. Por ter contribuição essencial nos resultados desse trabalho. Por ter aceitado participar da banca de qualificação.

À Professora Doutora Maria Luzete Costa Cavalcante, por ter aceitado participar da banca de qualificação desse trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo importante apoio financeiro na realização desta pesquisa.

À técnica em Radiologia Maria da Conceição de Souza, pelo carinho com que me recebeu para a realização dos exames radiológicos.

À Antônia Ferreira Alves Sampaio, pela ajuda dada nesse trabalho.

Enfim, agradeço a todas as pessoas que fazem parte da minha vida e que contribuíram para a realização desse sonho. Obrigada por existirem.

“O começo da sabedoria é encontrado na dúvida; duvidando começamos a questionar e procurando podemos achar a verdade”.

Pierre Abelard

RESUMO

EFEITOS DO ÁCIDO ZOLEDRÔNICO NA CONSOLIDAÇÃO DE FRATURAS DA DIÁFISE FEMORAL DE RATOS. Autora: **Sânia Nara Costa da Rocha**. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Cirurgia. Universidade Federal do Ceará. Orientador: Prof. Dr. José Alberto Dias Leite.

As fraturas femorais são consideradas um problema de saúde pública e são responsáveis por um alto índice de morbidade e mortalidade pela ocorrência de possíveis complicações. Ocorrem não somente em pacientes jovens expostos a grandes traumas como também na população idosa. A maioria dos pacientes idosos possui determinadas afecções como, por exemplo, a osteoporose, que aumenta ainda mais o risco dessas fraturas, já que a tendência é que a idade média da população aumente, as consequências da osteoporose aumentarão na mesma proporção. Estudos clínicos demonstraram que o uso dos bifosfonatos reduzem o risco da ocorrência dessa fraturas em pacientes osteoporóticos. O ácido zoledrônico pertence à classe dos bifosfonatos, sendo considerado atualmente o mais potente. Como a dose que esses pacientes utilizam é anual, há um aumento da aderência e da persistência dos pacientes no tratamento, diminuindo, assim, o risco de fraturas. Este trabalho teve, como objetivo, verificar os efeitos do ácido zoledrônico no processo de consolidação óssea nos fêmures de ratos reduzidos com fio de Kirshner. Foram utilizados 36 ratos machos, adultos, da linhagem Wistar, com peso que variou de 250 a 300g. Todos os animais foram submetidos à cirurgia em que era realizada a fratura da diáfise femoral com uma guilhotina romba. Os animais foram divididos em dois grupos: o grupo do ácido zoledrônico, que recebeu, via intraperitoneal, 0,1 mg/Kg do ácido e o grupo controle. Os animais foram sacrificados com 7, 14 e 28 dias de pós-operatório. Houve duas mortes por causas desconhecidas. Foram realizados estudos radiográficos com filme de mamógrafo para analisar a densidade óptica e a área do calo ósseo, medida em mm² e estudo histológico, utilizando amostras coradas com *picrosirius red* sob a luz polarizada do microscópio, para quantificar a formação de colágeno tipo I e tipo III na região cortical próxima a fratura e no calo ósseo. Em relação à densidade óptica, não se observou nenhum resultado estatisticamente relevante em relação ao uso do ácido zoledrônico. Ao se realizar uma análise intergrupos, em relação à área do calo ósseo, não houve diferença significativa ($p < 0,05$) nos tempos de consolidação utilizados nessa pesquisa. Apesar do grupo zoledronato no tempo de 28 dias ter um resultado muito próximo em relação ao nível de significância ($p = 0,0532$). Já na análise intragrupos, observa-se um aumento considerado natural na área do calo ósseo. A percentagem de colágeno tipo III no calo ósseo e nas corticais não revelou diferença significativa tanto na análise intragrupos como na análise intergrupos. Em contrapartida, esse trabalho teve resultados significantes em relação ao colágeno tipo I, havendo um aumento da percentagem do colágeno tipo I no calo ósseo no tempo de consolidação de 28 dias ($p = 0,0098$). Nas corticais do fêmur próximas à fratura, esse aumento foi verificado nos três tempos de consolidação considerados nesta pesquisa. Concluindo que o ácido zoledrônico promoveu uma maior deposição de colágeno tipo I, sugerindo aceleração no processo de consolidação óssea, sobretudo na fase final da reparação. Em relação à percentagem de colágeno tipo III (no calo ósseo e nas corticais próximas ao calo), a área do calo ósseo e a densidade óptica do calo ósseo, não houve resultados estatisticamente significantes.

Palavras-chave: Bifosfonatos. Fraturas ósseas. Regeneração óssea.

ABSTRACT

EFFECTS OF ZOLEDRONIC ACID ON FRACTURE HEALING OF FEMORAL DIAPHYSIS OF RATS. Autora: **Sânia Nara Costa da Rocha**. Dissertation (Master). Post-Graduate Program in Surgery. Universidade Federal do Ceará. Advisor: Prof. Dr. José Alberto Dias Leite.

Femoral fractures are considered a public health problem and account for a high rate of morbidity and mortality by the occurrence of complications. They occur not only in young patients exposed to major trauma but in the elderly population as well. Most elderly patients have certain conditions, eg, osteoporosis, which further increase the risk of such fractures. Since the trend is that the average age of population increase, the consequences of osteoporosis will increase proportionately. Clinical studies have demonstrated that the use of bisphosphonates reduces the risk of occurrence of fractures in osteoporotic patients. Zoledronic acid belongs to the class of bisphosphonates, currently being considered the most potent. Because the dose that these patients use is on an annual basis, there is an increased adherence and persistence of patients in treatment, thereby decreasing the risk of fractures. This study aimed to evaluate the effects of zoledronic acid on bone healing in femurs of rats with reduced Kirshner wire. We used 36 adult male rats, Wistar, weights ranged from 250 to 300g. All animals underwent surgery that was performed on the fracture of the femoral shaft with a blunt guillotine. The animals were divided into two groups: the group of zoledronic acid, which received intraperitoneally 0.1 mg / kg of the acid and the control group. The animals were sacrificed 7, 14 and 28 days postoperatively. There were two deaths from unknown causes. We performed a radiographic study with film mammography to analyze the optical density and area of callus, measured in mm² and histological study, using samples stained with picosirius red under dense microscopic light to quantify the formation of collagen type I and type III in the cortical region near the fracture and callus. No significant statistical results regarding the optical density were observed with the use of the zoledronic acid. When conducting a comparative inter-group analyses, the callus area showed no significant differences ($p < 0.05$) in a time of consolidation (7, 14 and 28 days) used in this study. Despite the zoledronate group in 28 days time to have a result very close to the level of significance ($p < 0.05$). In the intragroup analysis there is considerable increase in the natural area of the callus. The percentage of type III collagen in the cortical and callus did not possess significant differences in intragroup analysis and the analysis groups. By contrast this study had significant results in relation to collagen type I. Concluding that zoledronic acid significantly increased the percentage of type I collagen in the callus in healing time of 28 days. And in the cortical bone three times considered (7, 14, 28 days).

Keywords: Bisphosphonates. Bone fractures. Bone regeneration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura do ácido zoledrônico.....	20
Figura 2	Divisão dos animais entre os grupos.....	26
Figura 3	Incisão longitudinal anterior na articulação do joelho direito (JD) do animal e orifício de acesso ao canal medular entre os côndilos. Animal em decúbito dorsal, com joelho direito (JD) em flexão.....	28
Figura 4	Bloqueio do fio de Kirshner (F) na região trocateriana (RT). Animal em decúbito lateral.....	28
Figura 5	Ilustração da guilhotina romba.....	29
Figura 6	Posicionamento do animal na guilhotina romba no momento da fratura.....	30
Figura 7	Imagens radiográficas nos grupos, controle e ácido zoledrônico, nos tempos de 7, 14 e 28 dias de consolidação óssea.....	32
Figura 8	Ilustração do programa utilizado para quantificar a densidade óptica e a área do calo ósseo.....	33
Figura 9	Imagens histológicas nos grupos controle e ácido zoledrônico, nos tempos de 7, 14 e 28 dias de consolidação óssea.....	35
Figura 10	Ilustração do programa utilizado para quantificar a porcentagem de colágeno tipo I, em lâminas com aumento de 100x.....	35
Figura 11	Densidade óptica do calo ósseo definida como a média dos níveis de cinza, mensurada nos grupos Controle e Zoledronato nos dias 7, 14 e 28 de consolidação óssea.....	37
Figura 12	Área do calo ósseo mensurada nos grupos Controle e Zoledronato nos dias 7, 14 e 28 de consolidação óssea.....	39
Figura 13	Densidade de colágeno tipo I, expressa em termos percentuais, mensurada na região do calo ósseo nos grupos Controle e Zoledronato nos dias 7, 14 e 28 de consolidação óssea.....	40
Figura 14	Densidade de colágeno tipo I, expressa em termos percentuais, mensurada na porção cortical do calo ósseo nos grupos. Controle e Zoledronato nos dias 7, 14 e 28 de consolidação óssea.....	42
Figura 15	Densidade de colágeno tipo III, expressa em termos percentuais, mensurada na região do calo ósseo nos grupos. Controle e Zoledronato nos dias 7, 14 e 28 de consolidação óssea.....	43
Figura 16	Densidade de colágeno tipo III, expressa em termos percentuais, mensurada na porção cortical do calo ósseo nos grupos. Controle e Zoledronato nos dias 7, 14 e 28 de consolidação óssea.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Valores da média e desvio padrão da densidade óptica do calo ósseo referentes às medições efetuadas nos animais dos grupos. Controle e Zoledronato nos três tempos estudados (dias 7, 14 e 28)..	38
Tabela 2	Valores da média e desvio padrão da área do calo ósseo referentes às medições efetuadas nos animais dos grupos. Controle e Zoledronato nos três tempos estudados (dias 7, 14 e 28).....	39
Tabela 3	Valores da média e desvio padrão da densidade de colágeno tipo I na porção medular do calo ósseo referentes às medições efetuadas nos animais dos grupos. Controle e Zoledronato nos três tempos estudados (dias 7, 14 e 28).....	41
Tabela 4	Valores da média e desvio padrão da densidade de colágeno tipo I na porção cortical do calo ósseo referentes às medições efetuadas nos animais dos grupos. Controle e Zoledronato nos três tempos estudados (dias 7, 14 e 28).....	42
Tabela 5	Valores da média e desvio padrão da densidade de colágeno tipo III na porção medular do calo ósseo referentes às medições efetuadas nos animais dos grupos. Controle e Zoledronato nos três tempos estudados (dias 7, 14 e 28).....	44
Tabela 6	Valores da média e desvio padrão da densidade de colágeno tipo III na porção medular do calo ósseo referentes às medições efetuadas nos animais dos grupos. Controle e Zoledronato nos três tempos estudados (dias 7, 14 e 28).....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AZ	Ácido Zoledrônico
BF's	Bifosfonatos
CEPA	Comitê de Ética em Pesquisa Animal
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DMO	Densidade Mineral Óssea
LABCEX	Laboratório de Cirurgia Experimental
P-C-P	Átomo de Carbono Central
PSR	<i>Picrosirius red</i>
R1 E R2	Cadeias Laterais
SAMM	Sistema de Análise Morfométrica
SBCAL	Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório
UFC	Universidade Federal do Ceará

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	Justificativa.....	23
2	OBJETIVO.....	24
3	MÉTODOS.....	25
3.1	Tipo de estudo.....	25
3.2	Aspectos éticos.....	25
3.3	Local da pesquisa.....	25
3.4	Caracterização da amostra.....	25
3.5	Ambiente de experimentação.....	25
3.6	Delineamento do estudo.....	26
3.7	Procedimento cirúrgico.....	27
3.8	Técnica de indução da fratura.....	29
3.9	Estudo radiográfico.....	31
3.10	Estudo histológico.....	33
3.11	Análise estatística.....	36
4	RESULTADOS.....	37
4.1	Estudo radiográfico.....	37
4.1.1	Densidade óptica do calo ósseo.....	37
4.1.2	Área do calo ósseo em mm ²	38
4.2	Estudo histológico.....	40
4.2.1	Densidade de colágeno tipo I no calo ósseo.....	40
4.2.2	Densidade de colágeno tipo I na região cortical do fêmur próximo a fratura	41
4.2.3	Densidade de colágeno tipo III no calo ósseo.....	43
4.2.4	Densidade de colágeno tipo III na região cortical do fêmur próximo a fratura.....	44
5	DISCUSSÃO.....	46
6	CONCLUSÃO.....	54
	REFERÊNCIAS.....	55
	APÊNDICE.....	61
	ANEXO.....	64

1 INTRODUÇÃO

As fraturas da diáfise do fêmur são, em geral, causadas por traumas violentos. O fêmur é o maior osso do corpo e está envolto por grandes massas musculares e, por esse motivo, é menos provável que haja uma exposição óssea (HEBERT *et al.*, 2003). A complexidade do traço dessas fraturas aumenta de acordo com a intensidade da força energética no momento do trauma e está relacionada ao aumento da violência urbana (FALAVINHA, 1996).

As fraturas da diáfise femoral apresentam uma incidência anual de 1 a 4:10.000 pessoas e ocorrem principalmente em pacientes abaixo de 40 anos (KUPCZIK *et al.*, 2009). Nesses pacientes, a fratura se dá por envolvimento em acidentes de alta energia como, por exemplo, ferimentos por arma de fogo, queda de grande altura e acidentes de trânsito. Já em idosos acima de 60 anos, ocorrem por acidentes de baixa energia (queda da própria altura) (MORAES *et al.*, 2009).

As ocorrências de acidentes de trânsito têm aumentado progressivamente e, conseqüentemente, há um aumento no número de vítimas que apresentam fraturas, na maioria dos casos de difícil tratamento (GUARNIERO *et al.*, 2007).

Em relação aos traumas de membros inferiores, são responsáveis por importante morbidade e mortalidade (BUCHOLZ; BRUMBACK, 1993). Levam a risco de morte pela possibilidade de complicações: sequestração sanguínea, lesão arterial, infecção, associação com outros traumas e fraturas, etc. (HEBERT *et al.*, 2003) e podem determinar deformidades e sequelas em função das complicações imediatas ou tardias (BONE; ANDERS; ROHRBACHER, 1998).

A sequestração sanguínea é frequente. No dia do trauma, a perda sanguínea pode variar de 600 a 1.200 ml e no terceiro pode variar de 1.400 a 2.400 ml (REIS, 2007).

Segundo Kupczik *et al.* (2009), as fraturas de fêmur podem ser fechadas ou expostas e seu tratamento é predominantemente cirúrgico através da fixação interna ou externa que proporcionam estabilidade necessária para a consolidação óssea.

Foram desastrosas as primeiras tentativas de fixação interna. Esse quadro só mudou em 1940, após o uso da fixação intramedular, proposta por Küntscher. A fixação interna promovia estabilidade, permitia mobilidade livre e indolor das articulações e algum suporte de carga. Porém, não poderia ser utilizada nos casos de fraturas muito proximais ou distais na diáfise. Com os avanços recentes, tem-se a haste intramedular bloqueada, que atinge qualquer nível da diáfise femoral (REIS, 2007). Segundo Orr *et al.* (2002), é consenso que as lesões ósseas devem ser fixadas o quanto antes, por promoverem melhora das condições hemodinâmicas, proteção às estruturas adjacentes ao foco dessa fratura e mobilização precoce do paciente.

Historicamente, têm-se desenvolvido métodos de tratamento cirúrgico, baseados nos conceitos de fixação biológica das fraturas que orientam o menor manuseio do invólucro do fêmur com o intuito de preservar a sua vascularização e conseqüente melhor capacidade de consolidação óssea (FALAVINHA, 1996). Em estudo comparativo de haste intramedular e a placa ponte para o tratamento das fraturas multifragmentárias do fêmur de 119 pacientes, mostrou que esses métodos de osteossíntese são eficientes com bons e excelentes resultados clínicos, alto índice de consolidação das fraturas e baixos índices de complicações (FERNANDES *et al.*, 2002).

Já as hastes bloqueadas possuem vantagens biomecânicas quando comparadas a outras técnicas de imobilização, visto que permitem a estabilização rígida das fraturas e preservam os padrões biológicos de osteossíntese (ROMANO *et al.*, 2008).

No concernente ao tratamento conservador, esse só acontece em raras circunstâncias como, por exemplo, quando o hospital não possui material mínimo adequado, o médico não está habilitado para este tipo de intervenção ou nos casos de processos infecciosos. Mesmo assim o tratamento conservador é temporário, e o paciente deve ser transferido para um centro melhor adaptado para o tratamento dessa fratura (HEBERT *et al.*, 2003).

O tecido ósseo é extremamente ativo. Desempenha diversas funções no organismo como a proteção aos órgãos internos, fornecimento de apoio estrutural e

físico aos tendões e músculos, além de atuar como reservatório de íons. É composto por matriz orgânica e inorgânica. O componente inorgânico é constituído por cristais de hidroxiapatita, além de outros minerais como o magnésio, flúor, potássio e sódio. Cerca de 98% da matriz orgânica são compostas por colágeno tipo I, outras proteínas não colágenas, como os proteoglicanos, osteocalcina, integrinas e células especializadas (HAZEMBERG; TAYLOR; LEE, 2007).

Ainda relacionado ao tecido ósseo, ressalta-se que esse é um tipo especializado de tecido conjuntivo. Como já foi elucidado acima, é formado por células e material extracelular calcificado: a matriz óssea. As células são: os osteócitos, os osteoblastos e os osteoclastos. Os osteócitos encontram-se localizados profundamente nas fibras protéicas da matriz óssea estando, provavelmente, envolvidos na homeostase do cálcio plasmático. Os osteoblastos são as células que sintetizam a parte orgânica (colágeno tipo I, proteoglicanos e glicoproteínas) da matriz óssea, são capazes de concentrar fosfato de cálcio, participando da mineralização da matriz. Já os osteoclastos são células móveis, gigantes, multinucleadas e extensamente ramificadas. A função dos osteoclastos é a reabsorção óssea. Essas células destroem a matriz sempre que o osso precisa ser remodelado (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). A remodelação óssea é uma função fisiológica que ocorre em ossos normais. Essa remove os microdanos e substitui o osso danificado em tecido ósseo novo (LIN, 1996).

O colágeno é a proteína mais abundante nos ossos, na pele e nos tendões. As fibras de colágeno são parcialmente responsáveis pelas propriedades biomecânicas do osso, como resistência à pressão sob ele e; também por dar suporte aos músculos e à pele. São conhecidos 20 tipos diferentes de colágeno, sendo o colágeno tipo I o mais abundante (MARK, 1999)

A consolidação óssea é um processo complexo que envolve múltiplas fases que se superpõem (GUARNIERO *et al.*, 2007). De acordo com Padula *et al.* (2003), no tecido ósseo, existe uma complexa interação de fatores reguladores locais e sistêmicos. Esses mediadores promovem equilíbrio contínuo entre formação e reabsorção. A ocorrência de uma fratura culmina na quebra desse equilíbrio e a partir desse momento, uma série de eventos intra e extracelulares vão ocorrer com o objetivo de reparar o tecido lesado.

A consolidação das fraturas de ossos tubulares pode ser dividida em seis estágios. No primeiro estágio, também chamado de hematoma, ocorre um extravasamento de sangue nos vasos rompidos para o periósteo, que ocorre após algumas horas e pode se estender por dias. O segundo estágio, ou estágio inflamatório, caracteriza-se pela formação de um exsudato serofibrinoso e o aumento de células antecessoras dos osteoblastos, que começam a reabsorver o tecido ósseo necrosado, dois dias após a fratura. O terceiro estágio caracteriza-se pela formação de tecido de granulação que atua na angiogênese e na organização dos tecidos e estruturas e ocorre entre o segundo e o décimo segundo dia após a fratura. A partir do quarto estágio, inicia-se o processo de consolidação óssea. Esse estágio é evidente após a primeira semana e pode durar vários meses. Nessa fase, o calo ósseo encontra-se mole ou fibroso e vai gradativamente se transformando em calo duro, o calo ósseo propriamente dito. No quinto estágio o calo ósseo está formado. No sexto estágio, chamado de estágio de remodelação, o osso maduro é substituído por tecido ósseo lamelar. Esse processo se dá em todos os indivíduos ao longo da vida, sendo mais evidente nos meses que sucedem uma fratura (SCHWARTSMANN; LECH; TELÖKEN, 2003).

Algumas drogas como a hialuronidase, esteróides anabolizantes, insulina, condroitina sulfato, hormônio do crescimento, calcitonina, hormônios tireoidianos e vitaminas A e D atuam estimulando a consolidação óssea; em contrapartida drogas como corticosteróides, anticoagulantes, tiouracil e vitaminas A e D em altas doses atuam retardando a consolidação (GIORDANO *et al.*, 1999).

O uso de corticosteróides retarda o processo de reparo das fraturas, pois; diminui a formação do hematoma fraturário, limitando a fase inflamatória; retarda a produção de tecido cartilaginoso que seria substituído posteriormente por osso trabecular (MENDES *et al.*, 2001). A resposta inflamatória é indispensável no processo de reparação. Sem a inflamação, não seria possível a cicatrização dos tecidos (COTRAN; KUMAR; ROBBINS, 1996).

Segundo Müller *et al.* (2004), outro fármaco que retarda a consolidação óssea é o diclofenaco sódico.

Giordano *et al.* (1999) realizaram um estudo experimental em ratos, em que estudaram a influência da enoxaparina na consolidação das fraturas e concluíram que essa droga estimulou a formação de calo ósseo em fases intermediárias de sua formação.

O ácido zoledrônico foi o fármaco estudado no presente trabalho. Esse ácido pertence à classe dos bifosfonatos (BF's). Os primeiros BF's foram sintetizados há mais de cem anos por Von Bayer e Hofmann. Devido à propriedade de inibirem a precipitação de sais de cálcio, a primeira aplicação deste grupo de fármacos foi como agentes anticorrosivos, não sendo descritos efeitos potencialmente terapêuticos até 1968 (FLEISCH, 2002).

O conhecimento de suas características biológicas data da década de 60 do século XX. Foram sintetizados no século XIX. E, no passado, eram utilizados para fins industriais, como agentes de anti-sedimentação e aditivos para a limpeza de canos de água e óleo, prevenindo a formação do carbonato de cálcio (FLEISCH, 2002).

Os BF's apresentam, na sua estrutura, dois grupos fosfatos ligados a um átomo de carbono central (P-C-P) e duas cadeias laterais (R1 e R2), unidas ao carbono central. A estrutura P-C-P juntamente com as cadeias laterais permitem um grande número de variações possíveis, daí surgirem vários tipos de bifosfonatos (DANNEMANN; ZWAHLEN; GRATZ, 2006). São análogos químicos da substância endógena, denominada ácido pirofosfórico, que, no organismo, se encontra como pirofosfato, um inibidor natural da reabsorção óssea. No entanto, essa substância não pode ser utilizada como agente terapêutico no tratamento de doenças ósseas, pois sofre uma rápida hidrólise enzimática. Os BF's são seus análogos sintéticos, em que o átomo central de oxigênio é substituído por um de carbono. Essa modificação faz com que os BF's sejam mais resistentes à degradação enzimática e possuam uma meia-vida biológica maior, suficiente para influenciar o metabolismo ósseo (LICATA, 1997).

Diferentes substituintes ligados ao carbono central dão características únicas para cada fármaco. O grupo R1 fornece a afinidade dos BF's pelos cristais ósseos, enquanto o grupo R2 é responsável pela potência e atividade farmacológica. O

comprimento da cadeia lateral é muito importante, sendo a maior atividade encontrada em compostos com quatro carbonos, como, por exemplo, o alendronato (SHINODA *et al.*, 1983).

Os BF's desaparecem rapidamente da circulação, unem-se aos minerais dos ossos e concentram-se, seletivamente, em osso. Se não forem incorporados na matriz mineral dos ossos, os BF's são eliminados através da urina (GREEN, 2001). São forte inibidores da atividade osteoclástica. Todos os compostos dos BF's acumulam-se por longos períodos de tempo na matriz óssea mineralizada. Dependendo da duração do tratamento e do BF específico prescrito, esse fármaco pode manter-se anos no nosso organismo (LIN, 1996).

Os BF's unem-se ao osso e incorporam-se na matriz óssea. Durante a remodelação óssea, o fármaco é absorvido pelos osteoclastos e incorporado no citoplasma celular, o qual inibe a função osteoclástica, induzindo a morte celular apoptótica (FLEISCH, 2002). Inibe igualmente a reabsorção osteoclástica mediada pelos osteoblastos, possuindo propriedades antiangiogênicas (GREEN, 2001).

Assim sendo, a remodelação óssea e a deposição óssea fisiológica ficam gravemente comprometidas em pacientes que recebem terapia com BF's. Além disso, os bifosfonatos possuem propriedades antiangiogênicas e podem ser diretamente tumorícidias, tornando-os importantes agentes no tratamento do câncer (MARTIN *et al.*, 2001). Segundo Green (2001), os BF's inibem a proliferação, reduzem a viabilidade e induzem a apoptose em muitas células tumorais humanas.

Os bifosfonatos podem dividir-se em duas subclasses, conforme uma de suas cadeias laterais possuírem ou não uma ligação nitrogenada. Os BF's nitrogenados (pamidronato, alendronato, residronato, ibandronato, ácido zoleidrônico) são mais potentes, pois inibem a via do mevalonato, bloqueando a enzima farnesil-difosfato sintetase, o que resulta numa alteração da membrana celular lipídica do osteoclasto, levando a uma alteração do seu mecanismo celular, provocando a apoptose osteoclástica (KUMAR *et al.*, 2007).

Segundo VERA *et al.* (2007), os BF's são indicados na doença de Paget, hipercalcemia maligna, metástases ósseas associadas ao câncer de mama e da próstata, no mieloma múltiplo e na osteoporose.

Em geral os BF's são bem tolerados se forem administrados corretamente, porém existem relatos de efeitos adversos associados ao seu uso. No caso dos BF's orais, os efeitos adversos mais freqüentes são úlceras gástricas, esofagites e osteomalacia. Os intravenosos são similares aos orais, tendo sido descrito alguns casos de flebites, anemia, edema, fadiga e síndromes pseudogripais. Doses endovenosas elevadas podem causar problemas renais, como falência renal e necrose tubular aguda (VERA *et al.*, 2007).

Existem vários tipos de BF's, dentre eles pode-se citar: alendronato, clodronato, etidronato, EB-1053, ibandronato, neridronato, olpadronato, incandronato, pamidronato, risedronato, tiludronato, YH-529 e o ácido zoleidrônico.

O ácido zoledrônico é uma nova geração de BF's, sendo considerado atualmente o mais potente. Esse ácido possui dois átomos de nitrogênio em um anel imidazol heterocíclico (Figura 1). Há forte evidência de que os BF's à base de nitrogênio exercem seus efeitos celulares por meio da inibição específica de uma enzima na via do mevalonato, a farnesil difosfatossintase (FPPS). O mecanismo de ação dos BF's que possuem nitrogênio é a inibição da remodelação óssea mediada pelos osteoclastos, por prevenir a prenilação de algumas proteínas formadas na via metabólica da síntese de colesterol.

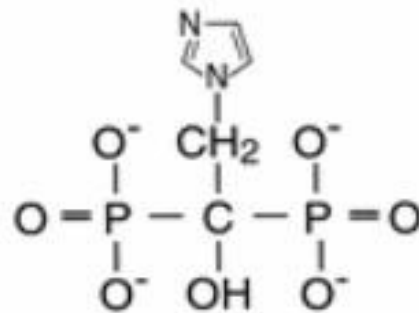


Figura 1 – Estrutura do ácido zoledrônico
Fonte: (FLEISH, 2007)

O ácido zoledrônico pode ser infundido por via intravenosa por um tempo mais curto (15-20 min) e volume (soro fisiológico ou glicosado) mínimo de 100 ml. A característica química desse ácido prolonga sua meia-vida no osso e permite exercer seu efeito no esqueleto durante meses e talvez anos após sua administração. É importante ressaltar que uma característica típica da classe dos BF's é sua pobre absorção, quando administrada por via oral, variando de 0,5 a 3% especialmente na presença de alimentos. Este ácido é considerado a melhor opção de tratamento devido a sua maior potência e remissão prolongada, em uma única infusão de curto tempo. É utilizado no tratamento da hipercalcemia de malignidade, e ainda mostra-se de grande eficácia no tratamento da osteoporose pós-menopausa, osteoporose induzida por corticóide e doença de Paget (GRIZ; COLARES; BANDEIRA, 2006).

A osteoporose é caracterizada por uma redução da resistência óssea, aumentando a suscetibilidade do indivíduo para a ocorrência de fraturas (KEAVENY *et al.*, 2007). A resistência dos ossos fica comprometida pela deterioração progressiva na sua densidade e qualidade. A deficiência do estrogênio (inibidor produção dos osteoclastos) é o principal fator causal da osteoporose em mulheres pós-menopausa. Além disso, nos indivíduos com osteoporose, a invalidez e o medo de fraturas adicionais podem conduzir a limitação de atividades, aumentando assim o isolamento que pode reduzir ainda mais a qualidade de vida (REGINSTER, 2007).

Siris *et al.* (2006) demonstraram que o uso de BF's reduz o risco da ocorrência de fraturas em pacientes osteoporóticos, sendo considerado o tratamento de escolha e observaram que a eficácia do tratamento da osteoporose é comprometida pelos baixos níveis de aderência e persistência.

Araujo *et al.* (2008) concluíram que uma alta aderência no tratamento é necessária para minimizar os riscos de fraturas e que o uso de uma medicação anual é necessária para melhorar da relação aderência-efetividade.

Os BF's orais têm uma baixa absorção no trato gastrointestinal por esse motivo os pacientes devem ingeri-los em jejum com 200 ml de água. Após a ingestão, devem ficar de 30 a 60 minutos, na posição ereta para evitar a esofagite.

Por esse motivo, o uso do ácido zoledrônico anual torna-se mais interessante, havendo uma maior aderência do paciente no tratamento.

Ragi-Eis *et al.* (2007) observaram que a maioria das pacientes preferiu o esquema de administração de apenas uma vez por mês do ibandronato em detrimento do esquema semanal do alendronato. Concluindo que as percepções de preferência e conveniência das pacientes sobre o esquema posológico também deveriam ser levadas em consideração ao se prescrever um bisfosfonato oral, podendo causar um impacto favorável em relação à adesão ao tratamento.

Lewiecki *et al.* (2007) mostram que o ibandronato oral, uma vez por mês, é essencialmente semelhante ao alendronato oral uma vez por semana em termos de melhora da densidade mineral óssea (DMO) do quadril total, do trocânter e do colo femoral após 12 meses.

Miller *et al.* (2008), mostrou que o ibandronato uma vez por mês é clinicamente comparável ao alendronato uma vez por semana para aumentar a DMO na coluna lombar e no quadril após 12 meses.

Black *et al.* (2007) em seu estudo sobre o uso do ácido zoledrônico no tratamento da osteoporose pós-menopausa, concluiu que uma infusão anual de ácido zoledrônico 5 mg em um período de três anos; reduz significativamente o risco de fraturas vertebrais, de quadril e outros tipos; melhora a densidade mineral óssea e dos marcadores de metabolismo ósseo.

Tadakoro (2009) verificou a farmacoeconomia e custo-efetividade dos bisfosfonatos no Brasil e concluiu que o ácido zoledrônico é a melhor opção de custo, aderência e efetividade, sendo a melhor terapêutica disponível para minimizar o impacto econômico do tratamento.

O estudo do zoledronato também é largamente utilizado nos casos de complicações osteolíticas de metástases ósseas. Lu *et al.* (2008) em modelos com ratos indicou que o zoledronato reduz a incidência de metástases ósseas de câncer de pulmão.

Griz, Colares e Bandeira (2006), em seu estudo sobre o Tratamento da doença de Paget óssea: importância do ácido zoledrônico, concluíram que o desenvolvimento de inibidores específicos da reabsorção óssea mediada pelos osteoclastos, particularmente os bisfosfonatos de última geração como o alendronato, risedronato e o ácido zoledrônico, permitiu maiores chances de sucesso no tratamento da doença de Paget, mesmo nos casos mais severos, sendo, portanto, o ácido zoledrônico a melhor opção de tratamento.

Ferreira Júnior *et al.* (2008) elaboraram uma pesquisa para observar os efeitos dos bifosfonatos na reparação de fraturas em tíbias de ratas com osteoporose e concluíram, através da morfometria e histomorfometria, que foi possível constatar a melhoria na densidade óssea, na densidade trabecular óssea e espessura do calo ósseo em todos os grupos tratados, sendo que o alendronato de sódio obteve melhores resultados.

Matos, Araújo e Paixão (2007), em seu estudo, concluíram que o zoledronato estimulou acentuadamente a formação óssea na área metafisária, resultando em grande quantidade de tecido ósseo trabecular e pouca fibrose medular.

Pereira *et al.* (2009), em seu estudo sobre o efeito do ácido zoledrônico em tíbias de ratas ooforectomizadas, concluíram que este ácido também não teve influência significativa na massa corpórea dos animais, porém, ao se analisar os resultados, observaram que o ácido não aumentou significativamente a resistência óssea da diáfise tibial ou área trabecular óssea diafisária.

Palacio *et al.* (2010) estudaram o zoledronato no tratamento da osteoporose umeral em ratas e concluíram que esse bifosfonato não teve influência significativa na massa corpórea dos animais. Os resultados mostraram que o zoledronato aumentou significativamente a resistência óssea do úmero proximal e a área trabecular óssea na região metafisária do úmero em ratas osteoporóticas, sendo, portanto, necessária a realização de outros estudos para se evidenciar sua eficácia em outras regiões umerais.

1.1 Justificativa

Em virtude de os resultados obtidos na literatura serem conflitantes, surgiu a idéia de produzir as fraturas em fêmures de ratos normais, ou seja, sem que se fosse induzida a osteoporose, fazer osteossíntese intramedular e se avaliar realmente qual o comportamento da utilização desse ácido no processo de consolidação das fraturas. Dessa forma, pode-se observar direta e mais claramente o impacto desse medicamento na reparação dessas fraturas.

2 OBJETIVO

Verificar os efeitos do ácido zoledrônico no processo de consolidação óssea em fraturas de fêmures de ratos submetidos à osteossíntese intramedular com fio de Kirshner.

3 MÉTODO

3.1 Tipo de estudo

Trata-se de estudo experimental controlado em ratos.

3.2 Aspectos éticos

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal do Ceará (UFC), no protocolo número 56/08 (Anexo).

A pesquisa foi realizada obedecendo aos princípios éticos na experimentação animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório (SBCAL / COBEA).

Foram aplicadas as normas de redação do Guia para Normalização de Trabalhos Acadêmicos da Universidade Federal do Ceará.

Todos os recursos utilizados na pesquisa são próprios do pesquisador. Não havendo conflito de interesses.

3.3 Local da pesquisa

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Cirurgia Experimental (LABCEX) da Universidade Federal do Ceará e na Faculdade de Medicina Christus.

3.4 Caracterização da amostra

Foram utilizados, neste estudo, 36 ratos (*Rattus norvegicus albinus*) da raça Wistar, machos, adultos, pesando entre 250 e 300g, provenientes do biotério central da Faculdade de Medicina Christus.

3.5 Ambiente de experimentação

Os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno com tampa de grade de metal, contendo, no máximo, seis animais. Essas eram limpas diariamente e mantidas em local seco e arejado, com temperatura ambiente controlada em 25°C, umidade relativa do ar de 55% e ciclo de luz claro-escuro de 12 h, no biotério central

da Faculdade de Medicina Christus. Os animais receberam ração da marca Fri-Ribe® balanceada e água *ad libitum*.

3.6 Delineamento do estudo

Os animais foram distribuídos em 2 grupos: o grupo do ácido zoledrônico (AZ), composto de 18 animais que receberam tratamento com o ácido zoledrônico, via intraperitoneal, 0,1mg/kg, de acordo com os estudos de Palacio *et al.* (2010) e o fármaco foi administrado na ocasião do procedimento cirúrgico, em dose única. Para a administração da substância, utilizou-se seringa estéril para insulina, com agulha fixa. O grupo controle foi composto de 18 animais que não fizeram tratamento medicamentoso.

Esses grupos foram subdivididos de acordo com o período de consolidação óssea em 7, 14, 28 dias, com seis animais em cada um desses grupos (Figura 2). Os animais foram sacrificados por inalação excessiva de éter nos respectivos grupos.

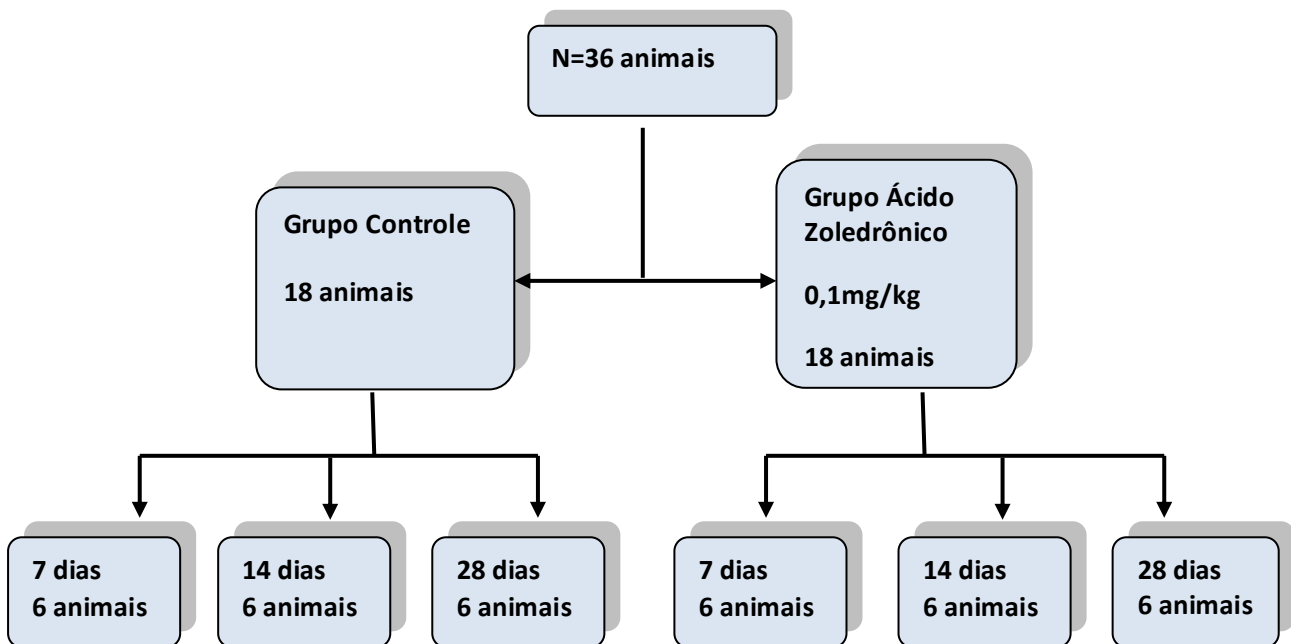


Figura 2 – Divisão dos animais entre os grupos

3.7 Procedimento cirúrgico

Todos os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico, tanto os do grupo do ácido zoledrônico como também os do grupo controle. Todo o material utilizado na intervenção cirúrgica foi devidamente esterilizado e utilizado em apenas um animal por esterilização.

Os animais foram pesados, para os cálculos da anestesia e dose do medicamento. Para a anestesia foi utilizado o cloridrato de xilazina (5mg/kg) e cloridrato de cetamina (40mg/kg) por via intraperitoneal. A anestesia foi realizada no quadrante inferior esquerdo do abdômen. Efetuou-se a elevação da pele com uma das mãos e fez-se injeção com a perfuração da parede abdominal a 90°, garantindo o acesso à cavidade intraperitoneal sem o risco de lesão das vísceras. Após o estabelecimento de um nível anestésico apropriado, que poderia ser facilmente verificado ao se observar o animal imóvel ao manuseio, com ausência de resposta a estímulos nociceptivos e à manutenção de frequência e amplitude respiratória normais, foi realizada uma tricotomia na região anterior da articulação do joelho direito do animal com aparelho de barbear elétrico e posteriormente colocado em decúbito dorsal sobre mesas cirúrgicas, especialmente confeccionadas para animais de pequeno porte. Com Iodopovidona, foi realizada a anti-sepsia da área a ser submetida ao procedimento cirúrgico.

Foi realizada uma incisão longitudinal anterior na articulação do joelho direito do animal. A patela foi deslocada medialmente, com a finalidade de localizar o intercôndilo do fêmur. Para encontrar a região do canal medular, utilizou-se um iniciador de Haste Intramedular, realizando, com ele, um orifício entre os côndilos (Figura 3).

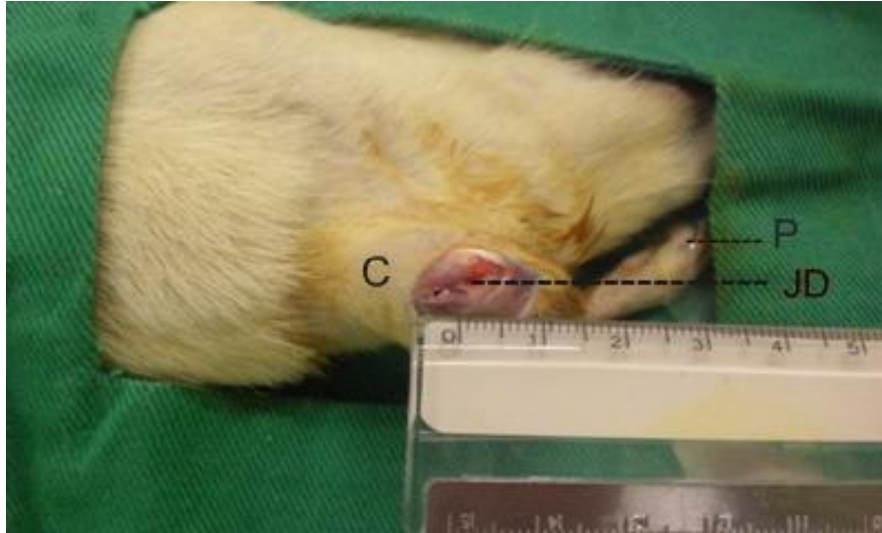


Figura 3 – Incisão longitudinal anterior na articulação do joelho direito (JD) do animal e orifício de acesso ao canal medular entre os côndilos. Animal em decúbito dorsal, com joelho direito (JD) em flexão. Letras C e P correspondem, respectivamente, à coxa e à pata do animal

Após a abordagem do canal medular, por via retrógrada, intercondiliana, foi introduzido um fio de Kirshner de 1mm de diâmetro com o auxílio de um motor de suspensão mini de 130W, velocidade de 0 a 18.000 rpm, até o fio ultrapassar o trocânter maior e exteriorizar-se na pele . Esse fio foi deixado no canal medular, sendo utilizado como haste intramedular, bloqueado no trocânter maior, curvando a extremidade do fio de Kirshner, para evitar migração (Figura 4) e sepultado abaixo da pele do animal. A patela foi reduzida e a ferida cirúrgica suturada com fio de sutura Mononylon 5.0.

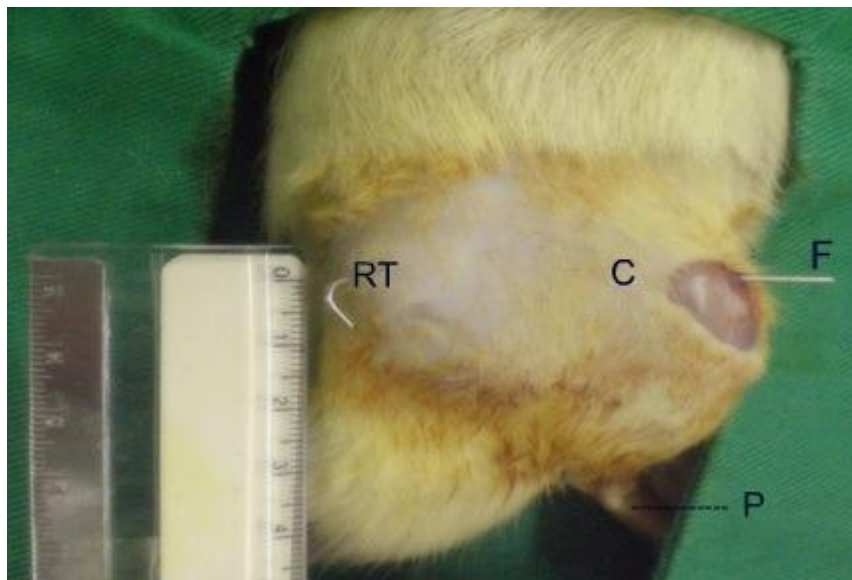


Figura 4 – Bloqueio do fio de Kirshner (F) na região trocanteriana (RT). Animal em decúbito lateral. Letras C e P correspondem, respectivamente, a coxa e pata do animal

3.8 Técnica de indução da fratura

Após o procedimento cirúrgico, foi realizada a produção das fraturas. A técnica utilizada para a produção de fraturas foi a estabilização do fêmur do animal em uma guilhotina romba, a mesma utilizada por Teixeira (2010), composta de uma base (A) com duas barras verticais e paralelas (B e C), e um dispositivo com quatro pontos (D) com duas depressões entre eles, uma para posicionar o fêmur do animal e outra para a superfície romba. Deslizando entre as barras verticais, há uma barra de aço com superfície romba (E), que fica travada (F) no platô (G), encontrado na outra extremidade de barras verticais, ligando-as. Quando a barra de aço é destravada do platô, ela cai com força de 5N, suficiente para fraturar a diáfise femoral (Figura 5).

Na figura 5, pode-se observar a barra de aço destravada, o que permite uma melhor visualização de tudo o que foi elucidado acima. A depressão (H) no dispositivo preso à base é onde o fêmur do animal é estabilizado para ser submetido à fratura.

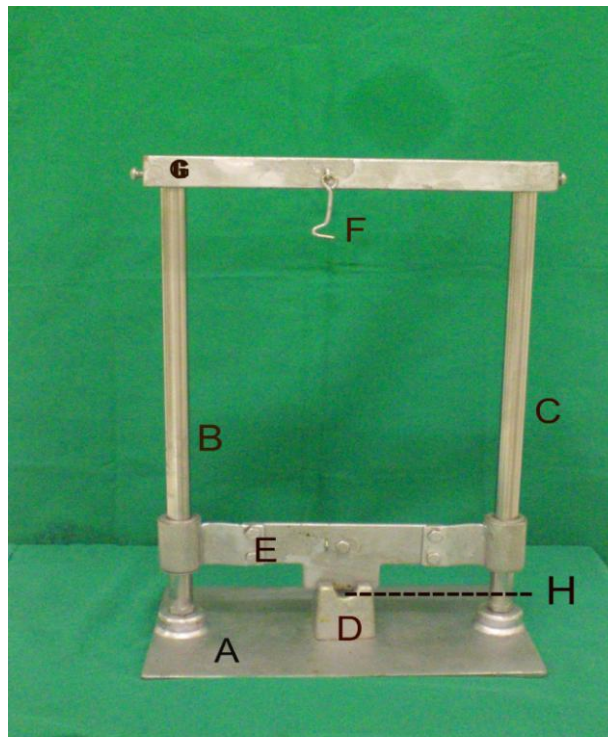


Figura 5 – Ilustração da guilhotina romba. Composta de uma base (A), duas barras verticais e paralelas (B e C), dispositivo com quatro pontos (D), com duas depressões entre eles (H), barra de aço com superfície romba (E), que fica travada (F) no platô (G). Quando é destravada, cai com força de 5N, suficiente para fraturar a diáfise femoral do animal

Para uma correta posição do fêmur nessa depressão (Figura 5-H), o animal deve ser colocado na diagonal em relação à base da guilhotina romba, com a articulação do joelho em flexão e o quadril em rotação interna. Antes da barra de aço ser destravada, o pesquisador tem que ser cuidadoso, certificando-se de que a cauda do animal não seja exposta pela força que irá causar a fratura, situando-a ao longo do corpo do animal. O pesquisador segura o animal ainda anestesiado durante todo o processo da indução da fratura. Na figura 6, pode-se observar melhor o posicionamento do animal na guilhotina romba no momento da fratura.

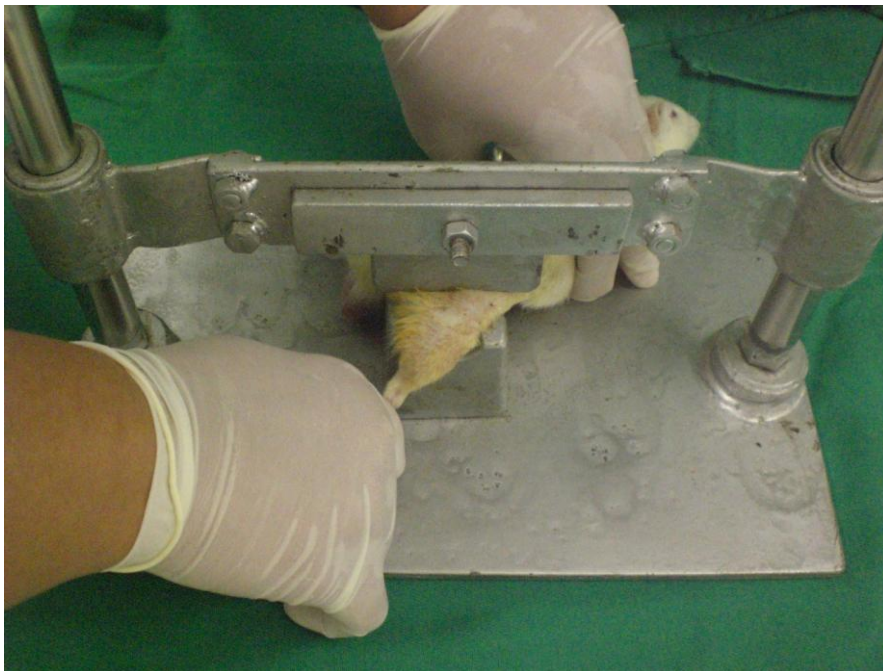


Figura 6 – Posicionamento do animal na guilhotina romba no momento da fratura

No pós-operatório, os animais, de ambos os grupos, receberam Paracetamol (2mg/kg) associado a fosfato de codeína (0,03mg/kg) (CODEX®), diluído na água, por três dias.

Após o efeito da anestesia até o dia do sacrifício, os animais não foram imobilizados, deambulando livremente, conforme o membro submetido ao procedimento permitisse.

3.9 Estudo radiográfico

Após o sacrifício dos animais de cada subgrupo, foi realizado exame radiográfico do fêmur dos animais em película de mamógrafo, em um aparelho Senographe DMR da GE®. A técnica utilizada foi a de 24kV e 14mAs, com a magnificação de 1,8. O tubo do mamógrafo foi posicionado verticalmente e as peças anatômicas colocadas em uma bandeja do aparelho a 20cm do foco de emissão, com a face anterior voltada para cima, na distância de 60 cm do filme. As peças de cada tempo estudado foram colocadas na mesma película, sendo o tempo de exposição de 0,5 segundo.

Os exames foram visualizados no microscópio cirúrgico (D.F. Vasconcellos M90®) do laboratório de microcirurgia da Universidade Federal do Ceará e com aumento de 10x. A imagem foi digitalizada através de uma placa de vídeo externa com Sistema de captura de vídeo Pixelview® (Aparelho de Captura de TV PlayTV Box4) acoplada ao microscópio e ao computador.

A figura 7 contém imagens radiográficas, ilustrando a diferença do calo ósseo entre os grupos controle e ácido zoledrônico nos tempos estudados, 7, 14 e 28 dias de consolidação óssea.

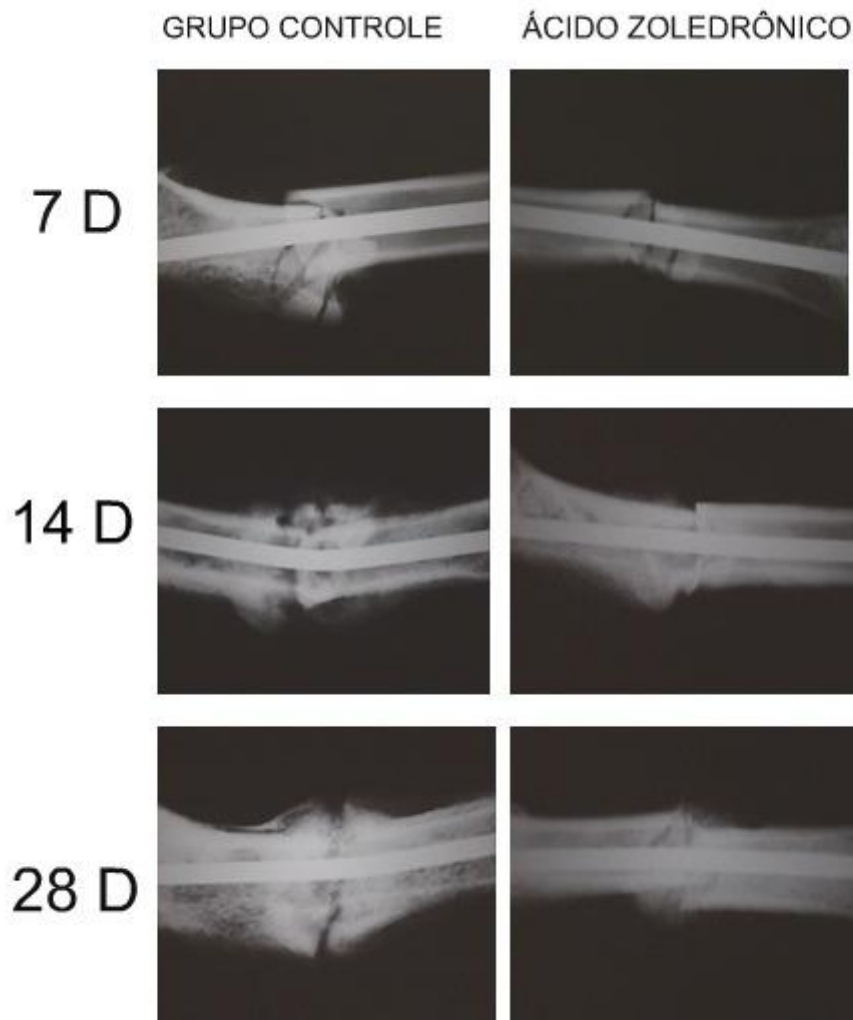


Figura 7 – Imagens radiográficas nos grupos, controle e ácido zoledrônico, nos tempos de 7, 14 e 28 dias de consolidação óssea

A densidade óptica, quantificada por meio da média dos níveis de cinza, e o tamanho da área do calo ósseo em mm² foram analisadas a partir de um programa informatizado de análise de imagens (Sistema de Análise Morfométrica – SAMM), desenvolvido do Programa de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará e modificado para este fim (JAMACARU, 2006).

Após selecionada a área de interesse na imagem a ser analisada, marcada em azul, na figura 8, era realizada a quantificação da área do calo ósseo em mm² e a média dos níveis de cinza. Níveis de cinza é uma escala utilizada na computação, em que 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 essa

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) essa média se encontra, mais radiopaco é o exame radiográfico, ou seja, mais consolidado o calo ósseo está.

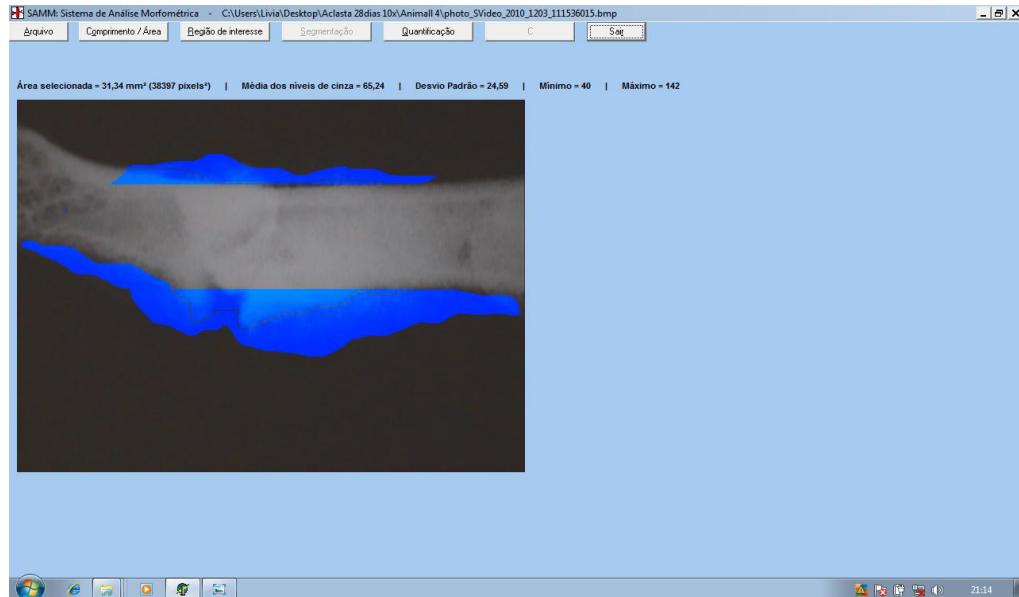


Figura 8 – Ilustração do programa utilizado para quantificar a densidade óptica e a área do calo ósseo.

3.10 Estudo histológico

O calo ósseo foi submetido a estudo microscópico em todas as peças. As peças foram submetidas à descalcificação com utilização de ácido fórmico a 5% por 72 horas. Após esse período, as peças eram cortadas longitudinalmente, com uma serra própria, para selecionar apenas o calo ósseo e a região próxima à fratura. O corte foi impregnado com parafina, levado ao micrótomo, onde foi feito transversalmente um corte de 5 micrômetros de espessura. A análise histológica foi realizada utilizando a coloração *Picrosirius red*, observada na luz polarizada do microscópio óptico (N-200T, Coleman, São Paulo, Brasil), para verificar a birrefringência do colágeno tipo I e do colágeno tipo III no calo e na cortical próxima a fratura.

As imagens foram capturadas (Cyber-shot DSC-W55, Sony), colocando as lâminas sob um microscópio óptico com luz polarizada. As configurações da câmera foram padronizadas, assim como a intensidade da luz do microscópio. As imagens digitais foram capturadas com uma magnificação de 100 vezes e armazenadas no formato Windows® BMP (Bitmap), com as dimensões de 450x450 *pixels*.

Os campos estudados corresponderam ao calo ósseo e às corticais do fêmur próximas à fratura. Sob a luz polarizada, as fibras do colágeno tipo I 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. A figura 9 contém imagens histológicas, ilustrando a diferença da densidade do colágeno tipo I e tipo III entre os grupos controle e ácido zoledrônico nos tempos estudados, 7, 14 e 28 dias de consolidação óssea.

O exame quantitativo de colágeno foi realizado utilizando um programa informatizado de análise de imagens (Sistema de Análise Morfométrica – SAMM), desenvolvido especificamente para esse fim (JAMACARU, 2006). Foram realizadas medidas em *pixels* dos feixes que representavam a birrefringência em 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 red*. O programa separava automaticamente as estruturas de interesse e quantificava o percentual da estrutura de interesse em relação à área de interesse (Figura 10).

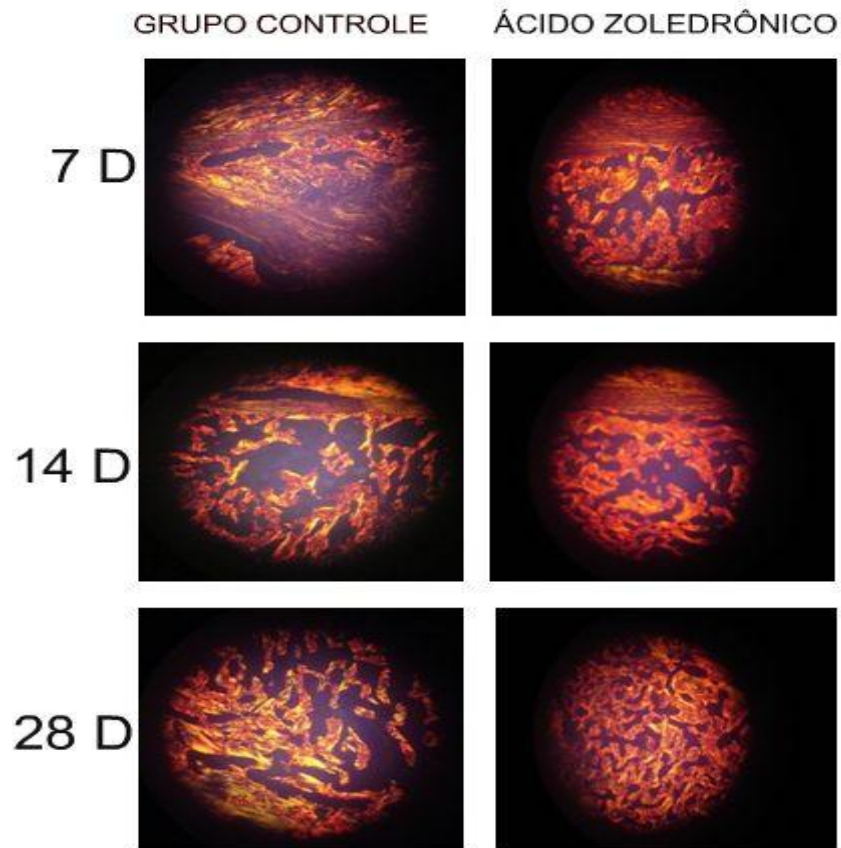


Figura 9 – Imagens histológicas nos grupos controle e ácido zoledrônico, nos tempos de 7, 14 e 28 dias de consolidação óssea

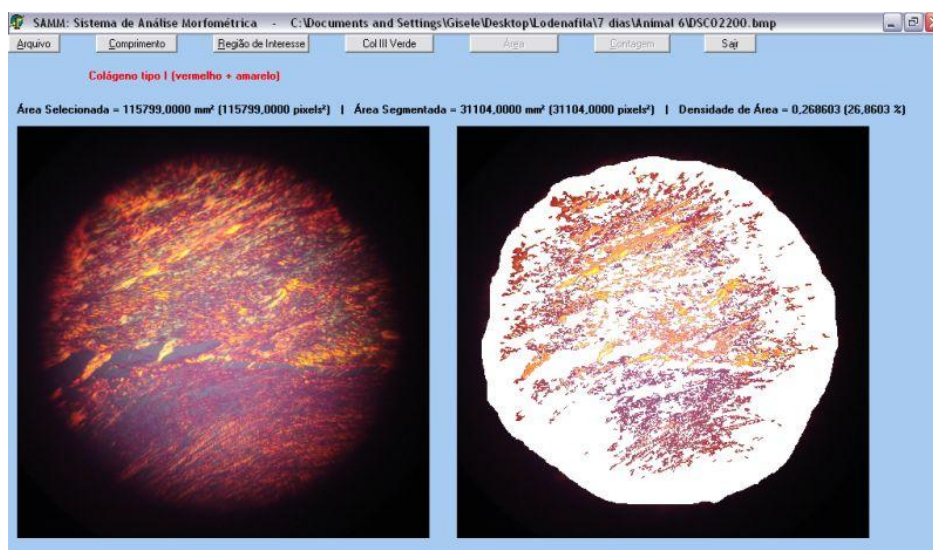


Figura 10 – Ilustração do programa utilizado para quantificar a percentagem de colágeno tipo I, em lâminas com aumento de 100x

3.11 Análise estatística

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* ácido zoledrônico), 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 três tempos (dias 7, 14 e 28) em um mesmo grupo, foram realizadas pela análise de variância (ANOVA) associada ao teste de comparações múltiplas de Tukey (dados paramétricos) ou pelo teste de Friedman 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, 2007) foi utilizado tanto para a realização dos procedimentos estatísticos como para a elaboração dos gráficos.

4 RESULTADOS

4.1 Estudo Radiográfico

Os dados foram analisados em relação à densidade óptica, definida como a média dos níveis de cinza, e à área do calo ósseo em mm².

4.1.1 Densidade óptica do calo ósseo

A densidade óptica do calo ósseo, definida como a média dos níveis de cinza, mensurada nos grupos Controle e Zoledronato nos dias 7, 14 e 28 de consolidação óssea pode ser observada na figura 9. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em fêmures de 5 (D7 e D28) e 6 (D14) animais do grupo Controle e 6 (D7, D14 e D28) ratos do grupo Zoledronato estão apresentados na tabela 1 e figura 11.

Na análise intergrupos, não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos de tratamento em nenhum dos tempos; tampouco, nas comparações dentro do mesmo grupo, foram verificadas diferenças estatisticamente significantes entre os tempos estudados.

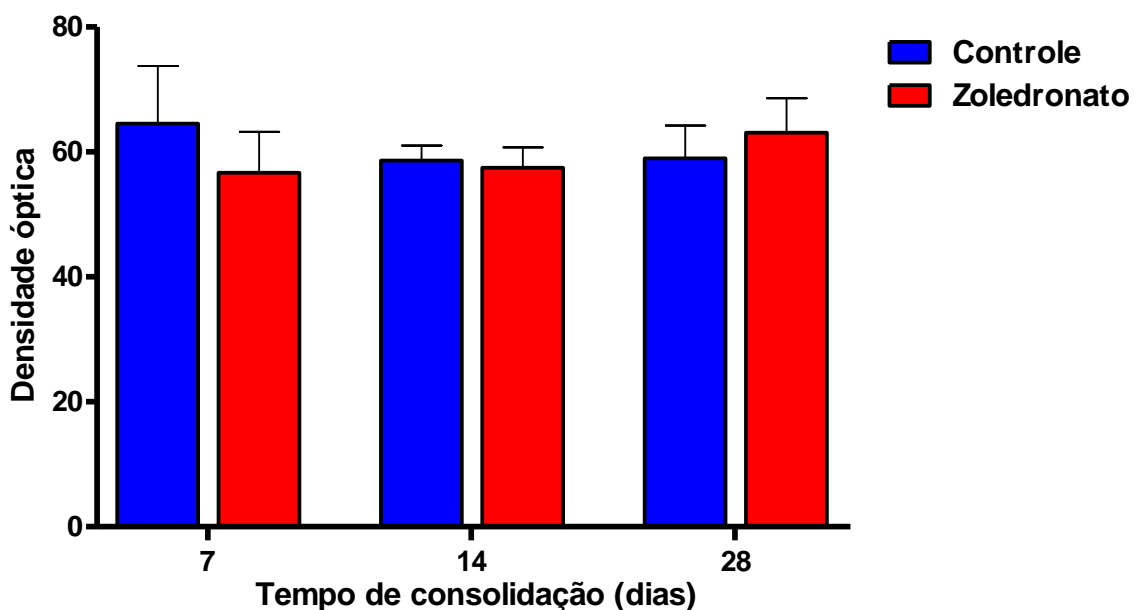


Figura 11 – Densidade óptica do calo ósseo definida como a média dos níveis de cinza, mensurada nos grupos Controle e Zoledronato nos dias 7, 14 e 28 de consolidação óssea

Tabela 1 – Valores da média e desvio padrão da densidade óptica do calo ósseo referentes às medições efetuadas nos animais dos grupos. Controle e Zoledronato nos três tempos estudados (dias 7, 14 e 28)

Tempo de consolidação (dias)	Controle		Zoledronato		Significância (intergrupos)
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	
7	64,51	9,24	56,68	6,53	P=0,1339
14	58,61	2,41	57,49	3,26	P=0,5132
28	58,96	5,26	63,07	5,53	P=0,2418
Significância (intragrupo)	F= 1,5395	P=0,2512	F= 2,5921	P=0,1079	

4.1.2 Área do calo ósseo em mm²

Na figura 12, pode-se observar a área do calo ósseo mensurada nos grupos Controle e Zoledronato nos dias 7, 14 e 28 de consolidação óssea. A tabela 2 expressa os valores dos dados da média e desvio padrão das medições efetuadas em fêmures de 5 (D7 e D28) e 6 (D14) animais do grupo Controle e 6 (D7, D14 e D28) ratos do grupo Zoledronato.

Na análise intergrupos, não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos de tratamento em nenhum dos tempos, embora, no dia 28 a diferença tenha sido marginalmente significante ($P = 0,0532$). Todavia, nas comparações dentro do mesmo grupo, verificaram-se que, no grupo Controle, as áreas do calo mensuradas nos dias 14 ($++P < 0,01$) e 28 ($+++P < 0,001$) foram significativamente maiores que a observada no dia 7. Similarmente, no grupo Zoledronato, as áreas do calo mensuradas nos dias 14 ($**P < 0,01$) e 28 ($***P < 0,001$) foram significativamente maiores que a observada no dia 7; ademais, a área do calo verificada no dia 28 foi significativamente maior ($*P < 0,05$) que a mensurada no dia 14.

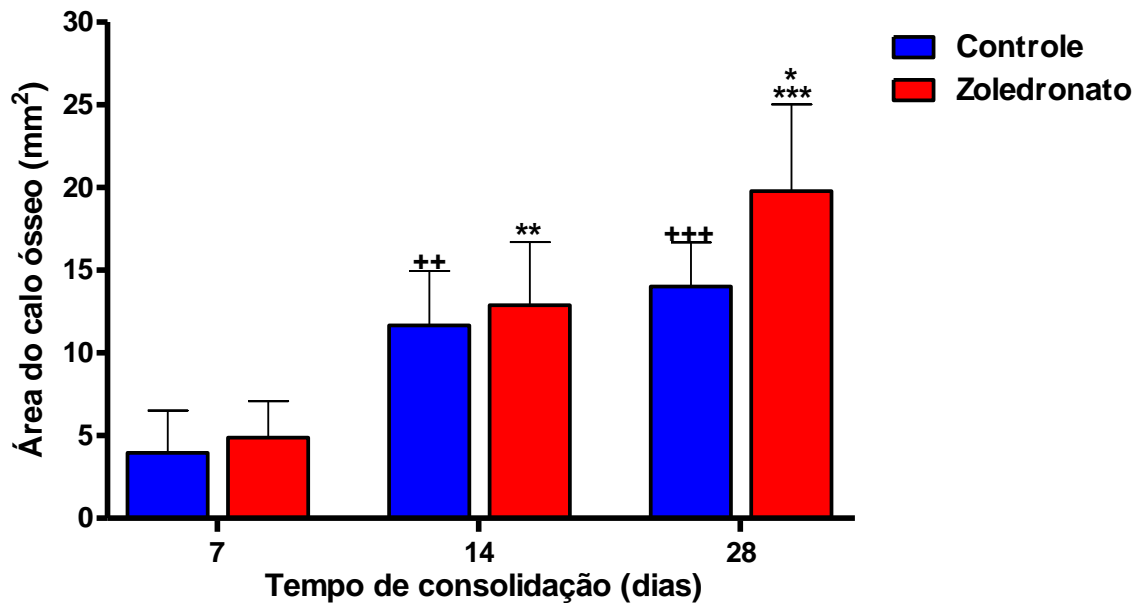


Figura 12 – Área do calo ósseo mensurada nos grupos Controle e Zoledronato nos dias 7, 14 e 28 de consolidação óssea

Tabela 2 – Valores da média e desvio padrão da área do calo ósseo referentes às medições efetuadas nos animais dos grupos. Controle e Zoledronato nos três tempos estudados (dias 7, 14 e 28)

Tempo de consolidação (dias)	Controle		Zoledronato		Significância (intergrupos)
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	
7	3,95	2,55	4,89	2,19	P=0,5303
14	11,66#	3,30	12,89	3,82*	P=0,5628
28	14,00†	2,68	19,78	5,24‡§	P=0,0532
Significância (intragrupo)	F=16,6351	P=0,0003	F=21,3662	P<0,0001	

#P < 0,01 versus D7 no grupo Controle; †P < 0,001 versus D7 no grupo Controle; *P < 0,01 versus D7 no grupo Zoledronato; ‡P < 0,001 versus D7 no grupo Zoledronato; §P < 0,05 versus D14 no grupo Zoledronato (teste de Tukey).

4.2 Estudo histológico

Foi observada a formação de colágeno tipo I e tipo III nas corticais próximas ao calo ósseo e no próprio calo ósseo e avaliada sua proporção em percentagem em relação aos outros elementos presentes na região analisada.

4.2.1 Densidade de colágeno tipo I no calo ósseo

A figura 13 expressa em termos percentuais a densidade de colágeno tipo I, mensurada na região do calo ósseo nos grupos Controle e Zoledronato nos dias 7, 14 e 28 de consolidação óssea. Os dados correspondem à média e ao desvio padrão das medições efetuadas em preparados histológicos de 5 (D7 e D28) e 6 (D14) animais do grupo Controle e 6 (D7, D14 e D28) ratos do grupo Zoledronato (Tabela 3).

Na análise intergrupos, constatou-se que, no dia 28, a densidade de colágeno tipo I verificada no grupo Zoledronato foi significativamente maior (**P = 0,0098) que a observada no grupo Controle. Todavia, nas comparações dentro do mesmo grupo não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes entre os tempos estudados.

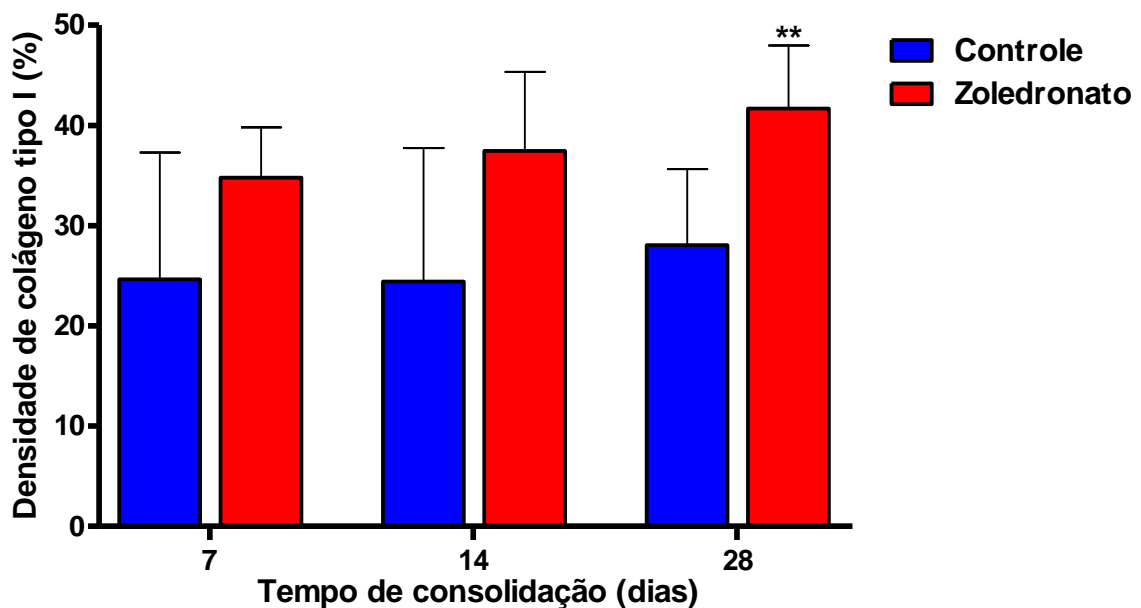


Figura 13 – Densidade de colágeno tipo I, expressa em termos percentuais, mensurada na região do calo ósseo nos grupos Controle e Zoledronato nos dias 7, 14 e 28 de consolidação óssea

Tabela 3 – Valores da média e desvio padrão da densidade de colágeno tipo I na porção medular do calo ósseo referentes às medições efetuadas nos animais dos grupos. Controle e Zoledronato nos três tempos estudados (dias 7, 14 e 28)

Tempo de consolidação (dias)	Controle		Zoledronato		Significância (intergrupos)
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	
7	24,63	12,65	34,78	5,03	P=0,1028
14	24,41	13,33	37,46	7,90	P=0,0660
28	28,06	7,57	41,67	6,30	P=0,0098
Significância (intragrupo)	F=0,1611	P=0,8529	F=1,7038	P=0,2154	

4.2.2 Densidade de colágeno tipo I na região cortical do fêmur próximo a fratura

A Densidade de colágeno tipo I expressa em termos percentuais, mensurada na porção cortical do calo ósseo nos grupos Controle e Zoledronato nos dias 7, 14 e 28 de consolidação óssea pode ser verificada na figura 14. Os dados da tabela 4 correspondem à média e ao desvio padrão das medições efetuadas em preparados histológicos de 5 (D7 e D28) e 6 (D14) animais do grupo Controle e 6 (D7, D14 e D28) ratos do grupo Zoledronato.

Na análise intergrupos, constatou-se que a densidade de colágeno tipo I verificada no grupo Zoledronato, foi significativamente maior que a observada no grupo Controle nos dias 7 (*P = 0,0291), 14 (**P = 0,0011) e 28 (**P = 0,0032). Todavia, nas comparações dentro do mesmo grupo, não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes entre os tempos estudados.

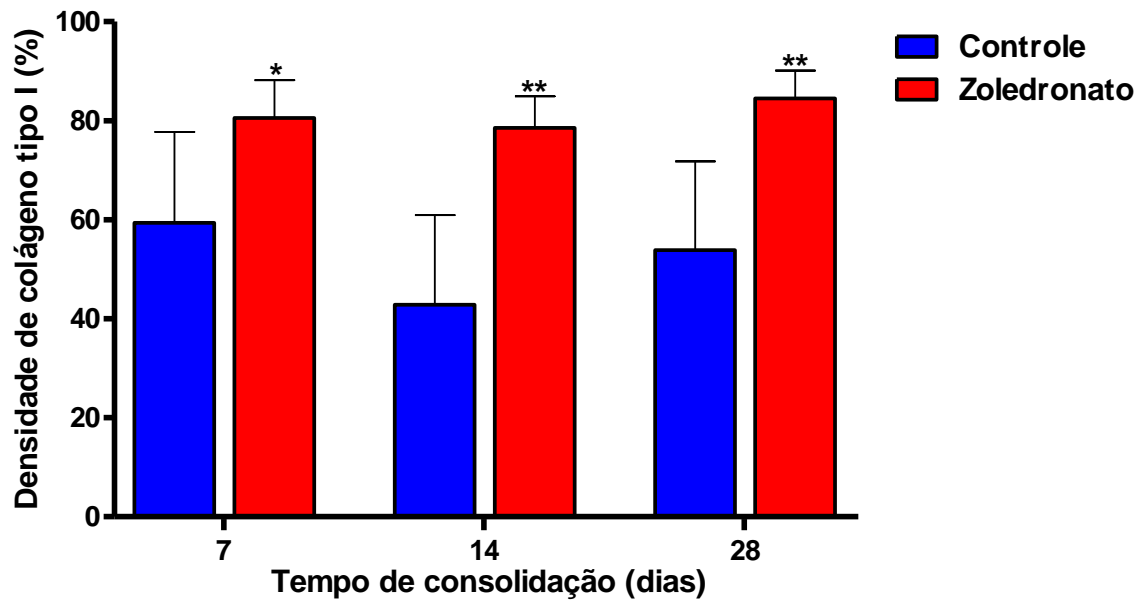


Figura 14 – Densidade de colágeno tipo I, expressa em termos percentuais, mensurada na porção cortical do calo ósseo nos grupos. Controle e Zoledronato nos dias 7, 14 e 28 de consolidação óssea

Tabela 4 – Valores da média e desvio padrão da densidade de colágeno tipo I na porção cortical do calo ósseo referentes às medições efetuadas nos animais dos grupos. Controle e Zoledronato nos três tempos estudados (dias 7, 14 e 28)

Tempo de consolidação (dias)	Controle		Zoledronato		Significância (intergrupos)
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	
7	59,38	18,34	80,56	7,63	P=0,0291
14	42,82	18,15	78,52	6,43	P=0,0011
28	53,83	17,96	84,47	5,64	P=0,0032
Significância (intragrupo)	F=1,1987	P=0,3328	F= 1,2520	P= 0,3142	

4.2.3 Densidade de colágeno tipo III no calo ósseo

Na figura 15, pode-se observar a densidade de colágeno tipo III, expressa em termos percentuais, mensurada na região do calo ósseo nos grupos Controle e Zoledronato nos dias 7, 14 e 28 de consolidação óssea. Os dados correspondem à média e ao desvio padrão das medições efetuadas em preparados histológicos de 5 (D7 e D28) e 6 (D14) animais do grupo Controle e 6 (D7, D14 e D28) ratos do grupo Zoledronato (Tabela 5).

Na análise intergrupos, não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos de tratamento em nenhum dos tempos; tampouco, nas comparações dentro do mesmo grupo, foram verificadas diferenças estatisticamente significantes entre os tempos estudados.

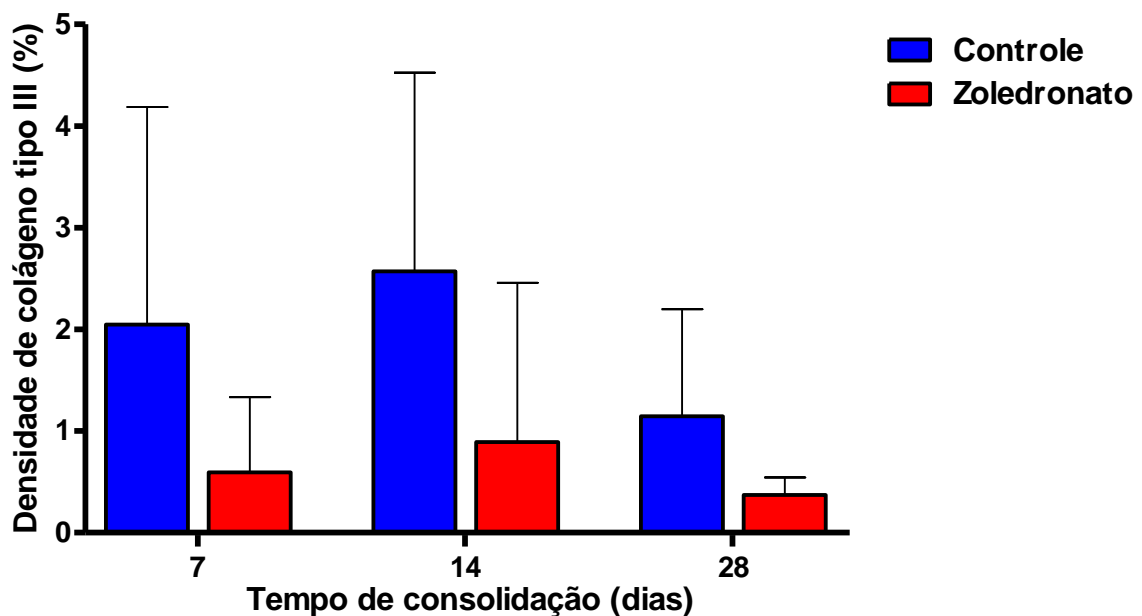


Figura 15 – Densidade de colágeno tipo III, expressa em termos percentuais, mensurada na região do calo ósseo nos grupos. Controle e Zoledronato nos dias 7, 14 e 28 de consolidação óssea

Tabela 5 – Valores da média e desvio padrão da densidade de colágeno tipo III na porção medular do calo ósseo referentes às medições efetuadas nos animais dos grupos. Controle e Zoledronato nos três tempos estudados (dias 7, 14 e 28)

Tempo de consolidação (dias)	Controle		Zoledronato		Significância (intergrupos)
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	
7	2,05	2,14	0,60	0,74	P=0,1516
14	2,57	1,95	0,89	1,57	P=0,1312
28	1,14	1,05	0,37	0,17	P=0,1075
Significância (intragrupo)	F=0,8719	P=0,4412	F=0,4049	P=0,6741	

4.2.4 Densidade de colágeno tipo III na região cortical do fêmur próximo a fratura

A densidade de colágeno tipo III expressa em termos percentuais e mensurada na porção cortical do calo ósseo nos grupos Controle e Zoledronato nos dias 7, 14 e 28 de consolidação óssea, pode ser verificada na figura 16. Os dados expressos na tabela 6 correspondem à média e ao desvio padrão das medições efetuadas em preparados histológicos de 5 (D7 e D28) e 6 (D14) animais do grupo Controle e 6 (D7, D14 e D28) ratos do grupo Zoledronato. Na análise intergrupos, não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos de tratamento em nenhum dos tempos; tampouco, nas comparações dentro do mesmo grupo, foram verificadas diferenças estatisticamente significantes entre os tempos estudados.

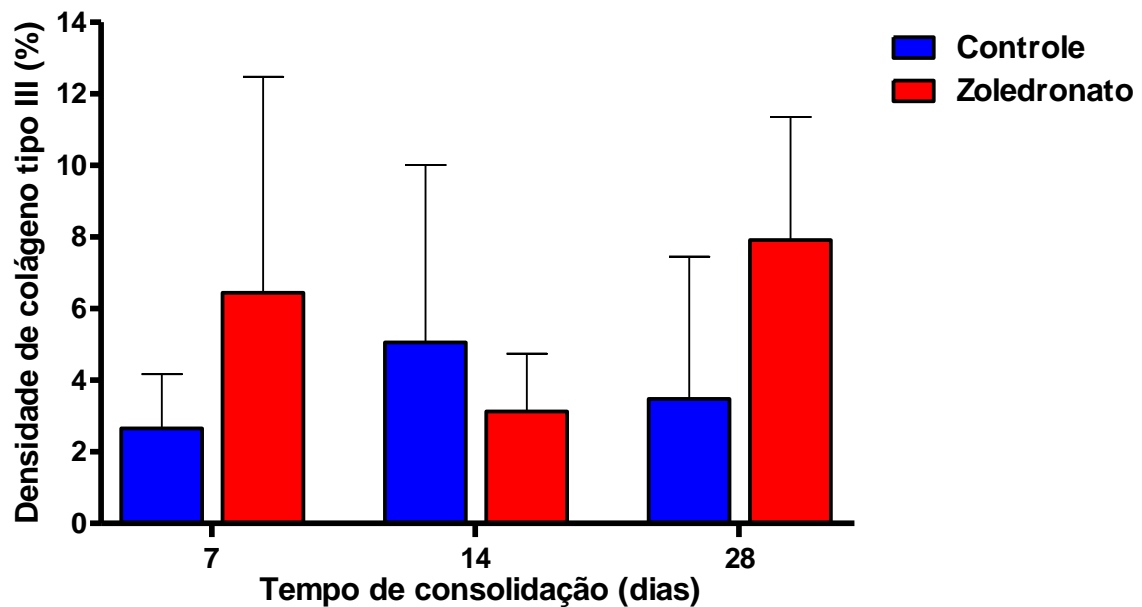


Figura 16 – Densidade de colágeno tipo III, expressa em termos percentuais, mensurada na porção cortical do calo ósseo nos grupos. Controle e Zoledronato nos dias 7, 14 e 28 de consolidação óssea

Tabela 6 – Valores da média e desvio padrão da densidade de colágeno tipo III na porção medular do calo ósseo referentes às medições efetuadas nos animais dos grupos. Controle e Zoledronato nos três tempos estudados (dias 7, 14 e 28)

Tempo de consolidação (dias)	Controle		Zoledronato		Significância (intergrupos)
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	
7	2,65	1,52	6,45	6,03	P=0,2073
14	5,06	4,96	3,12	1,62	P=0,3854
28	3,48	3,97	7,91	3,45	P=0,0783
Significância (intragrupo)	F=0,5513	P=0,5891	F=2,1306	P=0,1533	

5 DISCUSSÃO

Este estudo foi realizado para verificar os efeitos do ácido zoledrônico na consolidação das fraturas de fêmures de ratos tratados com osteossíntese intramedular.

O ácido zoledrônico foi o fármaco escolhido por ser uma nova geração de bifosfonatos. É 10.000 vezes mais potente que o etidronato e 100 vezes mais que o pamidronato. É utilizado no tratamento da hipercalcemia de malignidade, na osteoporose pós menopausa, osteoporose induzida por corticóide e doença de Paget. Possui dois átomos de nitrogênio em um anel imidazol heterocíclico (GRIZ; COLARES; BANDEIRA 2006). Os bisfosfonatos mais potentes são caracterizados pela presença de nitrogênio em sua cadeia lateral (RUSSELL *et al.*, 1999). O efeito principal de todos os bifosfonatos é sua capacidade de inibir a reabsorção óssea mediada pelos osteoclastos (WAKCHOURE *et al.*, 2006).

Para a redução da fratura, utilizou-se o fio de Kirshner, que foi escolhido por se aproximar das hastes intramedulares utilizadas em humanos. A mesma técnica foi realizada por Teixeira (2010). Pode-se observar, em outros trabalhos, o uso desta mesma técnica como, por exemplo, em Azuma *et al.* (2001), numa pesquisa que avaliou o uso do ultra som pulsado de baixa intensidade na consolidação óssea e por Kupczik *et al.* (2009).

Bonnarens *et al.* (1984) utilizaram um aparelho semelhante à guilhotina romba e concluíram que a simplicidade do modelo, a facilidade de sua utilização e o grau mínimo de traumatismo, envolvendo os tecidos moles, tornam-no uma excelente técnica para a produção de modelos de fraturas fechadas em pesquisas com animais.

Vialle *et al.* (2004) também utilizaram o fio de Kirschner intramedular no fêmur de ratos da raça Wistar, como também um aparelho que funciona como a guilhotina romba, para a produção das fraturas. Michaele *et al.* (2004), em sua pesquisa, utilizaram um dispositivo de três pontos para um criação reprodutível de fraturas fechadas de fêmur em ratos.

Foram utilizados nesse estudo ratos Wistar por serem animais de pequeno porte, visto que as despesas para a compra e reprodução são relativamente baixas. Vale salientar ainda a fácil padronização no que diz respeito ao peso, ao estado de saúde, à alimentação, à idade e ao baixo índice de mortalidade (TEIXEIRA, 2010). Todos esses motivos permitem a implementação de grandes grupos, tornando as pesquisas mais viáveis. Segundo Nunamaker *et al.* (1998), modelos experimentais em ratos são os mais frequentemente utilizados quando se quer estudar o processo de cicatrização de uma fratura. Optou-se pelo sexo masculino por não haver variações hormonais em relação às fêmeas. Dois animais morreram nesse estudo, antes da data do sacrifício por causas desconhecidas.

O rato por ser um animal de pequeno porte constitui um desafio para o desenvolvimento de um modelo de fratura, portanto os ossos longos, como o fêmur e a tíbia são mais adequados para o estudo de fraturas. No presente estudo, foi utilizado o fêmur, pois a tíbia apresenta algumas questões a serem consideradas, como o fato de o seu calibre declinar distalmente, pois diferentes locais da fratura resultam em diferentes tamanhos do calo, limitando, assim, a padronização e comparabilidade. Ainda existindo a influência da fíbula, que também pode fraturar, resultando na formação de calos diferentes. Já o fêmur do rato é um osso tubular com diâmetro interno e externo relativamente consistente, sendo mais adequado para o estudo de fraturas (HOLSTEIN *et al.*, 2009).

Para a anestesia, foi utilizado o cloridrato de cetamina e o cloridrato de xilazina, pela facilidade de obtenção desses fármacos e por não haver necessidade de se utilizar grandes volumes dos mesmos. Dos protocolos mais comumente empregados, a associação xilazina-cetamina é considerada uma das mais populares técnicas anestésicas utilizadas em pequenos animais. A xilazina é capaz de contrabalancear os efeitos indesejáveis inerentes ao uso da cetamina, como o aumento da atividade motora e a ativação simpática (HASKINS; FARVER; PATZ, 1986; HALL; CLARKE, 1991; LUNA *et al.*, 2000). Apresenta propriedades seletivas clássicas, como relaxamento muscular por ação central, sedação e analgesia (KOLATA; RAWLINGS, 1982; SPINOSA, 2002). A cetamina foi introduzida na prática clínica a partir da década de 1960, tendo como principal função promover anestesia em humanos e animais. Promove perda sensorial marcante e analgesia, assim como

amnésia e paralisia do movimento, sem perda real da consciência (KLIDE, 1992; LUFT; MENDES, 2005; THURMON; TRANQUILLI; BENSON, 2007).

A via de administração escolhida foi a intraperitoneal, por ser amplamente empregada nesse tipo de animal, o procedimento anestésico mostrou-se bastante eficaz. No pós-operatório, a analgesia foi obtida com a utilização da codeína (derivado morfínico) em associação com o paracetamol diluído em água potável. Semelhante à utilizada por Mesquita *et al.* (2010) e Rocha (2010). A recuperação pós-operatória foi rápida e satisfatória.

Foi realizada uma incisão longitudinal anterior de aproximadamente 2 cm na articulação do joelho do animal, com a finalidade de inserir o fio de Kirshner de 1 mm de diâmetro no canal medular do fêmur, por via retrógrada, uma vez que esse modelo foi escolhido pela facilidade de execução e obtenção do material.

O ácido zoledrônico é administrado em humanos por via intravenosa. No presente estudo, utilizou-se a dose de 0,1mg/kg por via intraperitoneal semelhante à utilizada por Palacio *et al.* (2010). A escolha da via intraperitoneal tornou-se mais viável para a pesquisa pelo fato de que esse medicamento possui alto custo e, depois de aberto, só tem validade de apenas 24 horas, se armazenado em refrigerador entre 2 a 8°C. Por esse motivo, foram utilizados dois frascos do medicamento, que só foram abertos após uma programação detalhada, em que vários fatores foram pensados, como a verificação do horário de funcionamento do laboratório, a disponibilidade dos funcionários, a obtenção de todo o material cirúrgico necessário. Além da otimização de tempo para a esterilização do instrumental cirúrgico, com o objetivo de serem realizadas o máximo de cirurgias possíveis dentro do tempo de validade do medicamento.

A consolidação da fratura é um evento complexo que envolve a interação de uma variedade de processos diferentes (SCHENDELER, 2008). Os dias de escolha para o sacrifício dos animais foram baseados no trabalho de Udupa e Prasad (1963). Esses autores definiram quatro fases no processo de consolidação das fraturas em ratos, em que na primeira semana, tem-se a fase fibroblástica, na segunda, a fase colágena, na terceira e quarta, a fase osteogênica e, na quinta e sexta, a fase de remodelação.

Udupa e Prasad (1963) realizaram estudo histoquímico, com duração de seis semanas, para caracterizar a evolução da consolidação óssea em ratos, tendo-se evidenciado as quatro fases que foram citadas acima: a fase fibroblástica, que é caracterizada principalmente pela proliferação de fibroblastos oriundos do perióstio e posteriormente de condroblastos e osteoblastos; fase do colágeno, na qual, à medida que diminui a proliferação celular, ocorre produção de fibras colágenas no espaço entre os fragmentos; fase osteogênica, caracterizada pela proliferação e hipertrofia de condroblastos, os quais são substituídos por osteoblastos que produzem nova substância intercelular e osso novo e a fase de remodelação, correspondente à quinta e sexta semanas, quando o excesso de massa óssea formada é reabsorvido (MÜLLER *et al.*, 2004). Já que o tempo estimado para a consolidação da fratura em animais é de 28 dias, esta última fase não entrou nos tempos estudados.

O estudo radiológico foi mesmo utilizado no trabalho de Teixeira (2010). As imagens radiológicas foram feitas com películas de mamógrafo, por ter qualidade superior à encontrada nos aparelhos de radiografias convencionais, proporcionando melhor visualização da consolidação óssea. Mendes *et al.* (2001) utilizaram o mesmo procedimento, embora tenham empregado outra técnica, 30mAs, 25Kv.

Para a análise histológica, foi utilizada a coloração *Picrosirius red*(PSR). Essa coloração seguida por microscopia de luz polarizada é usada para visualizar as fibras de colágeno, fazendo-se uma captura digital para posterior análise (CUTTLE *et al.*, 2005). Pode-se observar a mesma análise em Teixeira (2010). Mesquita *et al.* (2010) e Rocha (2010), em seus estudos envolvendo queimaduras de pele em animais, utilizaram a mesma análise, objetivando quantificar a deposição de colágeno.

Quando raios de luz passam através de um filtro polarizado, eles saem vibrando em uma só direção. Um segundo filtro colocado com seu eixo principal perpendicular ao primeiro filtro bloqueará a passagem de luz. Se, porém, um tecido que tiver estruturas formadas por átomos e moléculas com um alto grau de orientação (como celulose, colágeno, cristais e microtúbulos) for colocado entre o dois filtros, a estrutura molecular repetida e orientada modifica o plano de vibração da luz que emerge do primeiro filtro, fazendo com que essas estruturas apareçam

luminosas contra um fundo escuro após passarem pelo segundo filtro. A birrefringência é a capacidade que as estruturas têm de girar o plano de vibração da luz polarizada (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Para serem estudados no microscópio, a maioria dos cortes histológicos deve ser corada, porque, com poucas exceções, os tecidos são incolores. Uma técnica especialmente boa para observar e diferenciar colágeno é o uso de corante PSR associado com luz polarizada. O PSR cora as fibras de colágeno que sob luz polarizada exibem intensa birrefringência (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Sob a luz polarizada, os tecidos ficam luminosos sobre um fundo escuro o que permite diferenciar o colágeno tipo I do colágeno tipo III. O colágeno tipo I apresenta fibras grossas e alinhadas, apresentando-se em tons de amarelo a vermelho. O colágeno tipo III apresenta fibras finas e dispersas coradas em tons de verde (JUNQUEIRA, COSSERMELLI, BRENTANI, 1978).

Amanat *et al.* (2007), procuraram avaliar em seu estudo qual o tempo certo de uma dose única do ácido zoledrônico necessário para aumentar a força no reparo de fraturas em ratos. Utilizaram, na pesquisa, 125 ratos, divididos em cinco grupos: grupo controle, grupo que recebeu o ácido zoledrônico no local da fratura (0,01 mg/kg) e grupo que recebeu o ácido por via intravenosa (0,1 mg/kg), com diferentes horários de administração: no momento da fratura, uma semana após a fratura e duas semanas após a fratura. Os animais foram sacrificados seis semanas após a cirurgia. E foram feitas análises radiográficas, histológicas, testes biomecânicos, tomografia computadorizada quantitativa. É importante ressaltar que realizaram nessa pesquisa uma fratura fechada de fêmur; utilizaram um fio, para ser usado como haste intramedular e também fizeram uso de uma guilhotina romba. Concluíram que o tempo de uma dose única intravenosa do ácido zoledrônico desempenha um papel importante na modulação das propriedades do calo. E ainda observaram que o atraso da dose única produz um calo maior e mais forte.

A maioria das pesquisas sobre o ácido zoledrônico envolve a utilização de ratas osteoporóticas e em variados locais de estudos, como tíbia, úmero e fíbula. Entretanto encontra-se, na literatura, trabalho como o de Matos, Araújo e Paixão (2007), os quais utilizaram coelhos em seu estudo. A amostra foi composta por trinta

animais, todos foram submetidos à osteotomia na diáfise proximal da fíbula. Foram divididos em dois grupos: grupo experimento, em que foi aplicada dose única de 0,04 mg/Kg de zoledronato e o grupo controle. Os animais foram sacrificados após uma, duas e quatro semana. E passaram por análises histomorfométricas. Concluindo que o zoledronato é caracterizado por acentuado estímulo na formação óssea na área metafisária da fíbula, resultando em grande quantidade de volume ósseo trabecular.

Pereira *et al.* (2009), em sua pesquisa sobre o Efeito do ácido zoledrônico em tíbias de ratas ooforectomizadas, utilizaram em seu estudo 40 ratas (*rattus norvegicus albinus*). Aos 60 dias de vida, os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos: grupo ooforectomia e grupo pseudo-cirurgia. Aos 90 dias de vida, foram novamente divididos, de forma aleatória, só que, desta vez, em quatro subgrupos de acordo com a administração intraperitoneal do zoledronato de 0,1 mg/Kg. Doze meses após a administração do medicamento, os animais foram eutanasiados tendo suas tíbias dissecadas para posterior análise. Estas envolviam estudos clínicos, biomecânicos e histomorfométricos. Concluindo que o zoledronato não teve influência significativa na massa corpórea. E observaram ainda que não houve aumento significativo da resistência óssea na diáfise tibial ou área trabecular óssea.

Palacio *et al.* (2010), utilizaram metodologia semelhante ao trabalho que foi descrito acima, diferindo apenas na região estudada, que, nesse caso, foi o úmero. Entretanto obtiveram resultados diferentes. Concluindo que o ácido zoledrônico aumentou significativamente a resistência óssea do úmero proximal e a área trabecular óssea na região metafisária.

No presente trabalho, foram produzidas fraturas em fêmur de rato normal, ou seja, não osteoporótico, tratado com a osteossíntese intramedular, com o objetivo de verificar a ação do zoledronato no processo de reparação do osso fraturado. Para isso, foram utilizadas análises radiológicas, em que se observou a densidade óptica e a área do calo ósseo, e, nas análises histológicas, verificou-se a formação de colágeno tipo I e tipo III no calo ósseo e nas corticais próximas ao local da fratura.

Em relação à densidade óptica do calo ósseo não se verificou nenhum resultado estatisticamente relevante em relação ao uso do ácido zoledrônico. No que se refere à área do calo, pode-se notar que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) intergrupos nos tempos de 7, 14 e 28 dias de consolidação. Apesar de o grupo do zoledronato, no tempo de 28 dias, ter um resultado muito próximo em relação ao nível de significância considerada na pesquisa ($p=0,0532$), Adams e Hambleton (1994) descrevem que, no final da consolidação óssea, o calo ósseo aumenta de tamanho formando um anel bulboso ao redor do foco da fratura. Na análise intragrupos, constatou-se um aumento da área do calo ósseo, sem resultados estatisticamente significantes, sendo considerado um evento normal.

Na percentagem de colágeno tipo I no calo ósseo, não houve aumento significativo na análise intragrupal. Já na análise intergrupos, pode-se observar que o grupo do ácido zoledrônico, no tempo de consolidação de 28 dias, apresentou uma diferença bastante significativa ($p=0,0098$) quando comparado ao grupo controle no mesmo tempo, o que difere dos resultados de Udupa e Prasad (1963) que afirmaram que o conteúdo mucopolissacarídeo aumenta rapidamente na primeira semana após a lesão, e é seguido por um aumento do conteúdo de colágeno durante a segunda semana. A deposição de fosfato de cálcio durante a terceira e a quarta semana provoca uma queda aparente no teor de colágeno, no decurso desse período. O conteúdo de colágeno tende a voltar ao normal durante a fase de remodelação, que só ocorre na quinta e sexta semanas.

Nas corticais do fêmur próximas ao local da fratura, pode-se verificar que a percentagem de colágeno tipo I aumentou significativamente ao se observar a análise intergrupos por tempo de consolidação. Verificando inclusive esse aumento em todos os tempos de consolidação (7, 14, 28) considerados nessa pesquisa.

Com relação à densidade de colágeno tipo III no calo ósseo e nas corticais, não houve diferença significativa tanto na análise intragrupos, quanto nas intergrupos nos tempos de consolidação estudados.

Os osteoblastos são as células que sintetizam o colágeno tipo I. Já a função dos osteoclastos é a de reabsorção óssea. Essas células destroem a matriz sempre que o osso precisa ser remodelado (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). Isto ocorre

em locais que estão mecanicamente enfraquecidos, podendo desenvolver microfraturas (EASTELL *et al.*, 2001).

Em circunstâncias normais, os osteoclastos secretam ácidos que dissolvem o mineral ósseo e enzimas proteolíticas que degradam a matriz óssea. A reabsorção dos ossos pelos osteoclastos é seguida pela migração dos osteoblastos para o local onde está havendo a reabsorção, resultando na formação de novo tecido ósseo. O mecanismo de ação do ácido zoledrônico é justamente inibir a reabsorção óssea, mediada pelos osteoclastos (SIRIS *et al.*, 2006).

Os resultados obtidos nesse estudo estão de acordo com esta descrição, em que se observa a ação anabólica do ácido, bloqueando o efeito catabólico do osteoclasto e melhorando o efeito anabólico dos osteoblastos.

Esse estudo foi feito inicialmente em ratos não osteoporóticos, para verificar o efeito do zoledronato no processo de cicatrização das fraturas. Estudos futuros, envolvendo a indução de osteoporose em ratas e posterior produção de fraturas na diáfise femoral, realizando a osteossíntese intramedular e utilizando o ácido zoledrônico, tornam-se interessantes, para então se observar o comportamento desse medicamento no processo de consolidação das fraturas em ossos osteoporóticos. Podendo-se propor a sua utilização em pacientes osteoporóticos, no leito hospitalar, após procedimento cirúrgico decorrentes de fraturas femorais. Diminuindo, assim, o risco de incidência e melhorando o processo de reparação dessas fraturas.

6 CONCLUSÃO

O ácido zoledrônico promoveu uma maior deposição de colágeno tipo I, sugerindo aceleração no processo de consolidação óssea, sobretudo na fase final da reparação. Em relação à percentagem de colágeno tipo III (no calo ósseo e nas corticais próximas ao calo), a área do calo ósseo e a densidade óptica do calo ósseo, não houve resultados estatisticamente significantes.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, J. C.; HAMBLEM, D. L. **Manual de fraturas**. São Paulo: Artes Médicas, 1994. 313p.
- AMANAT, N.; MCDONALD, M.; GODFREY, C.; BILSTON, L.; LITTLE, D. Optimal timing of a single dose of zoledronic acid to increase strength in rat fracture repair. **J Bone Miner Res.**, v.22, n.6, p.867-876, 2007.
- ARAUJO, D. V.; BAHIA, L. R.; SOUZA, C. P. R.; FERNANDES, R. A.; NAVARRO, J.; BUENO, R. L. P. Análise do custo-efetividade do ácido zoledrônico na prevenção da fratura osteoporótica proximal de fêmur no cenário do Sistema Suplementar de Saúde Brasileiro. **Rev Bras Giatr Gerontol.**, v.11, n.3, p.375-368, 2008.
- ARMITAGE, P.; BERRY, G. **Statistical methods in medical research**. 3ªed. Oxford: Blackwell, 1994. 620p.
- AZUMA, Y.; ITO, M.; HARADA, Y.; TAKAGI, H.; OHTA, T.; JINGUNSHI, 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.371-380, 2001.
- BLACK, D. M; DELMAS, P. D; EASTELL, R.; REID, I. R.; BOONEN, S.; CAULEY, J. A et al. Once-Yearly Zoledronic Acid for Treatment of Postmenopausal Osteoporosis. **N Engl J Med.**, v.356, n.18, p.1809-1822, 2007.
- BONE, L. B.; ANDERS M. J.; ROHRBACHER, B. H. Treatment of femoral fractures in the multiple injured patient with thoracic injury. **Clin Orthop Relat Res.**, v.XX, n.347, p.57-61, 1998.
- 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.
- BUCHOLZ, R. W.; BRUMBACK, R. J. Fraturas da diáfise do fêmur. In: ROCKWOOD, C. A. **Fraturas no adulto**. São Paulo: Manole, 1993. p.1623-1627.
- COTRAN, R. S.; KUMAR, U.; ROBBINS, S. L. Inflamação e reparação. In: ROBBINS, S. L. **Patologia estrutural e funcional**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1996. p.45-83.
- CUTTLE, L.; NATAATMADJA, M.; FRASER, J.F.; KEMPF, M.; KIMBLE, R.M.; HAYES, M.T. Collagen in the scarless fetal skin wound: Detection with Picrosirius-polarization. **Wound Rep Reg**. v. 13, n. 2, p. 198-204, 2005.
- EASTELL, R.; BAUMANN, M.; HOYLE, N.R.; WIECZOREK. **Bone markers- Biochemical and clinical perspectives**. United Kingdom: Martin Dunitz, 2001. 28p.

DANNEMANN, C.; ZWAHLEN, R.; GRATZ, K. W. Clinical Experiences with Bisphosphonate induced osteonecrosis of the jaws. **Swiss Med Wkly.**, v.136, n.31, p.504-509, 2006.

FALAVINHA R. S. Fixação biológica das fraturas multifragmentárias do fêmur. **Rev Bras Ortop.**, v.31, n.6, p.449-456, 1996.

FERNANDES, H. J. A.; REIS, F. B.; TUCCI NETO, P. F.; BELANGERO, W. D. Placa em ponte e haste intramedular bloqueada: estudo comparativo no tratamento de fraturas multifragmentárias da diáfise do fêmur. **Rev Bras Ortop.**, v.37, n.9, p.392-398, 2002.

FLEISCH, H. Development of bisphosphonates. **Breast Cancer Res.**, v.4, n.1, p.30-34, 2002.

FLEISCH, H. Bisphosphonates: Mechanisms of action. **Endocrine Reviews.**, v.19, n.1, pp.80-100, 2007

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

GREEN, J. R. Estrogen receptor transcription and transactivation: Antitumor potential of bisphosphonates. **Breast Cancer Res.**, v.3, n.1, p.1-24, 2001.

GRIZ, L.; COLARES, V.; BANDEIRA, F. Tratamento da doença de Paget óssea: importância do ácido zoledrônico. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v.50, n.5, p.845-851, 2006.

GUARNIERO, L.; MOLLIN, 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 fraturas: estudo experimental em ratos. **Rev Bras Ortop**, v.42 n.7, p.201-205, 2007.

HALL, L. H.; CLARKE, K. W. Medicação pré-anestésica. In: HALL, L. H.; CLARKE, K. W. **Veterinary anaesthesia**. London: Baillière Tindall, 1991. p.50.

HASKINS, S. C.; FARVER, T. B.; PATZ, J. D. Cardiovascular changes in dogs given diazepam and diazepam-ketamine. **Am J Vet Res**, v. 47, n.4, p. 795-798, 1986.

HAZEMBERG, J. G.; TAYLOR, D.; LEE, T. C. The role of osteocytes and bone microstructure in preventing osteoporotic fractures. **Osteoporosis Int Ireland**, v.18, n.1, p. 1-8, 2007.

HEBERT, S.; XAVIER, R.; PARDINI JR, A. G.; BARROS FILHO, T. E. P. **Ortopedia e traumatologia** - princípios e prática. São Paulo: Artmed, 2003. 1264p.

HOLSTEIN, J. H.; GARCIA, P.; HISTING, T.; KRISTEN, A.; MENGER, C.; POHLEMANN, T. Advances in the establishment of define mouse models for the

study of fracture healing and bone regeneration. **J Orthop Trauma**, v.23, n.5, p.31-35, 2009.

JAMACARU, F. V. F. **Quantificação de angiogênese corneana *in vivo* através do processamento de imagens digitais**. 2009. 242f. Tese (Doutorado em Cirurgia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

JUNQUEIRA, L. C.; COSSERMELLI, W.; BRENTANI, R. Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius red and polarization microscopy. **Arch Histol Jpn**, v.41, n.3, p.267-274, 1978.

KEAVENY, T. M.; DONLEY, D. W.; HOFFMANN, P. F.; MITLAK, B. H.; GLASS, E. V.; SAN MARTIN, J. A. Effects of teriparatide and alendronate on vertebral strength as assessed by finite element modeling of QCT scans in women with osteoporosis. **J Bone Miner Res.**, v.22, n.1, p.149-157, 2007.

KLIDE, A. M. Anatomy of the spinal Cord and how the spinal Cord is affected by local anesthetics and other drugs. **Vet Clin North Am Small Anim Pract**, v.22, n.2, p.413-416, 1992.

KOLATA, R. J.; RAWLINGS, C. A. Cardiopulmonary effects of intravenous xylazine, ketamine and atropine in the dog. **Am J Vet Res**, v.43, n.12, p.2196-2198, 1982.

KUMAR, V.; PASS, B.; GUTTENBERG, S.; LUDLOW, J.; EMERY, R.; DONALD, A et al. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: A report of three cases demonstrating variability in outcomes and morbidity. **J Am Dent Assoc**, v.138, n.5, p.602-609, 2007.

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.228-231, 2009.

LEWIECKI, E. M.; RECKER, R. R.; SEDARATI, F.; NEATE, C.; MILLER, P. D. Bone mineral density gains with monthly oral ibandronate (150mg) and weekly oral alendronate (70mg) after 12 months: results from the motion study. **Curr Med Res Opin.**, v.26, p.6-11, 2007.

LICATA, A. A. Bisphosphonate therapy. **Am J Med Sci**, v.313, n.1, p.17-22, 1997.

LIN, J. H. Bisphosphonates: a review of their pharmacokinetic properties. **Bone**, v.18, n.2, p.75-85, 1996.

LU, S.; ZHANG, J.; ZHOU, Z.; LIAO, M. L.; HE, W. Z.; ZHOU, X. Y et al. Synergistic inhibitory activity of zoledronate and paclitaxel on bone metastasis in nude mice. **Oncol Report**, v.20, n.3, p.581-587, 2008.

LUFT, A.; MENDES, F. F. S(+) cetamina em baixas doses: atualização. **Rev Bras Anesthesiol**, v.55, n.4, p.460-469, 2005.

LUNA, S. P. L.; NOGUEIRA, C. S.; CRUZ, M. L.; MASSONE, F.; CASTRO, G. B. Romifidine or xylazine combined with ketamine in dogs premedicated with methotrimeprazine. **Braz J Vet Res Anim Sci**, v.37, n.2, p.93-98, 2000.

MANIGRASSO, M. B.; O'CONNOR, J. P. Characterization of a closed femur fracture model in mice. **J Orthop Trauma**, v.18, n.10, p.687-695, 2004.

MARK, K. V. D. Structure, biosynthesis, and gene regulation of collagens in cartilage. In: SEIBEL, M. J.; ROBINS, S. P.; BILEZIKIAN, J. P. **Dynamics of bone and cartilage metabolism**. London: Academi Press, 1999. p.3-7.

MARTIN, M. B.; GRIMLEY, J. S.; LEWIS, J. C.; HEATH, H. T.; BAILEY, B. N.; KENDRICK, H et al. Bisphosphonates inhibit the growth of Trypanosoma brucei, Trypanosoma cruzi, Leishmania donovani, Toxoplasma gondii, and Plasmodium falciparum: a potential route to chemotherapy. **J Med Chem**, v.44, n.6, p.909-116, 2001.

MATOS, M. A.; ARAÚJO, F. P.; PAIXÃO, F. B. Efeitos do zoledronato na remodelação óssea durante o processo de reparação. **Acta Cir Bras**, v.22, n.2, p.115-119, 2007.

MENDES P. H. B., SCOFANO JUNIOR A. R., SILVA M. G., SOUZA, I.; SILVA FILHO, M. N.; ABREU, A. V et al. Consolidação da fratura após o uso prolongado de corticóide: estudo experimental em ratos. **Rev Bras Ortop**, v.36, n.9, p.345-351, 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 et al. Effect of imiquimod on partial-thickness burns. **Burns**, v.36, n.1, p.97-108, 2010.

MICHAELE, B.; MANIAGRASSO, M.B.; O'CONNOR, J.P. Characterization of a closed femur fracture model in mice. **J Orthop Trauma**, v.18, n.10, p.95-687, 2004.

MILLER, P. D.; EPSTEIN, S.; SEDARAT, F.; REGINSTER, J. Y. Once-monthly oral ibandronate compared with weekly oral alendronate in postmenopausal osteoporosis: results from the head-to-head MOTION study. **Curr Med Res Opin.**, v.24, p. 207-213, 2008.

MORAES, F. B.; SILVA, L. L.; FERREIRA, F. V.; FERRO, A. M.; ROCHA, V. L.; TEIXEIRAK, S. Avaliação epidemiológica e radiológica das fraturas diafisárias do fêmur: estudo de 200 casos. **Rev Bras Ortop**, v.44, n.3, p.199-204, 2009.

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

MÜLLER, S. S.; CURCELLI, E. C.; SARDENBERG, T.; ZUCCON, A.; CRUDIS JÚNIOR, J. L.; PADOVANI, C. R. Análise clínica e biomecânica do efeito do

diclofenaco sódico na consolidação da fratura da tíbia no rato. **Acta Ortop Bras**, v.12, n.4, p.197-204 2004.

NUNAMAKER, D. M. Experimental models of fracture repair. **Clin Orthop Relat Res.**, v.355, supl, p.56-65, 1998.

ORR, E. R.; PASCHOAL, Y. J. P.; GIORDANO, V.; FRANKLIN, C. E.; AMARAL, N. P. Fixação biológica das fraturas multifragmentárias da diáfise do fêmur pela técnica de placa em ponte. **Rev Bras Ortop**, v.37, n.1/2, p.31-38, 2002.

PADULA, E. O. C.; ANDRADE, M. L.; GIORDANO, V.; RAMALHO, M. V. Aspectos morfológicos de consolidação de fratura em ratos diabéticos. **Rev Bras Ortop**, v.38, n.3, p.127-136, 2003.

PALACIO, E. P.; JACOB, E. M.; CAMPI, T. B.; MÜLLER, S. S. O zoledronato no tratamento da osteoporose umeral em ratas. **Acta Ortop Bras**, v.18, n.2, p.95-95, 2010.

PEREIRA, F. R. A. P.; DUTRA, R. C.; OLÍMPO, T. C. R.; MÜLLER, S. S.; PALACIO, E. P. Efeito do ácido zoledrônico em tíbias de ratas ooforectomizadas. **Rev Bras Ortop**, v.44, n.1, p.61-68, 2009.

RAGI-EIS, S.; FRANCISCHETTO, I. F.; ALBERGARIA, B.; OLIVEIRA, A. A.; SIMÕES, F. V.; MILAGRE, K et al. Percepções de conveniência e preferência após 1 ano de tratamento com bisfosfonato oral em um grupo de mulheres brasileiras. **Rev Bras Doenças Osteometabólicas**, v.2, n.2, p.41-47, 2007.

REGINSTER, J. Y. Lidando com pacientes de osteoporose nos dias atuais. **Rev Bras Doenças Osteometabólicas**, v.2, n.2, p.35-40, 2007.

REIS, F. B. **Fraturas**. São Paulo: Atheneu, 2007.

ROCHA, J. L. C. **Estudo dos efeitos do tratamento tópico da mitomicina C na cicatrização na pele dorsal de camundongos *swiss albino* submetidos a queimadura térmica**. 2010. 88f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

ROMANO, L.; FERRIGNO, C. R. A.; FERRAZ, V. C. M.; NINA, M. I. D.; ITO, K. C. Avaliação do uso de haste bloqueada e bloqueio transcortical no reparo de fraturas diafisárias de fêmur em felinos. **Pesq Vet Bras.**, v.28 n.4, p. 201-206, 2008.

RUSSELL, R. G.; ROGERS, M. J.; FRITH, J. C.; LUCKMAN, S. P.; COXON, F. P.; BENFORD, H. L et al. The pharmacology of bisphosphonates and new insights into their mechanism of action. **J Bone Miner Res.**, v.14, sulp.2, p.53-65, 1999.

SCHENDELER, A.; MCDONALD, M. M.; BOKKO, P.; LITTLE, D. G. Bone remodeling during fracture repair: the cellular picture. **Semin Cell Dev Biol.**, v.19, n.5, p.459-466, 2008.

SCHWARTSMANN, C.; LECH, O.; TELOKEN, M. **Fraturas** - Princípios e prática. Artmed: Porto Alegre, 2003. 780p.

SHINODA, H.; ADAMEK, G.; FELIX, H.; SCHENK, R.; HAGAN, P. Structure-active relationships of various bisphosphonates. **Calcif Tissue Int.**, v.35, n.1, p.97-99, 1983.

SIRIS, E. S.; HARRIS, S. T.; ROSEN, C. J.; BARR, C. E.; ARVESEN, J. N.; ABBOTT, T. A et al. Adherence to bisphosphonate therapy and fracture rates in osteoporotic women: relationship to vertebral and nonvertebral fractures from 2 US claims databases. **Mayo Clin Proc.**, v.81, n.8, p.1013-1022, 2006.

SPINOSA, H. S.; GORNIK, S. L. BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada a medicina veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 752p.

TADAKORO, H. Farmacoeconomia e custo efetividade dos bifosfonatos no Brasil. **Rev Bras Med.**, v.66, n.10, p.335-341, 2009.

TEIXEIRA, D. F. G. **Efeitos do carbonato de Iodenafil 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.

THURMON, J. C.; TRANQUILLI, W. J.; BENSON, J. G. Veterinary anesthesia. In: TRANQUILLI, W. J.; THURMON, J. C.; GRIMM, K. A. **Lumb & Jones veterinary anesthesia and analgesia**. Oxford: Wiley-Blackwell, 2007.

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, n.4, p.770-779, 1963.

VERA, J. L. C. P.; MARCOS, J. A. G.; RODRÍGUEZ, S. A.; ARENAS, M. G.; POLANCO, J. C. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw. **Rev Esp Cir Oral y Maxilofac.**, v.29, n.5, p.295-308, 2007.

VIALLE, E.; VIALLE, L. R.; BOECHAT, R.; BLEY, J. P.; SCUSSIATO, R.; BUSATO, T et al. Produção de fratura padronizada de fêmur em ratos. **Rev Bras Ortop.**, v.39, n.6, p.323-329, 2004.

WAKCHOURE, S.; MERREL, M. A.; ALDRICH, W.; MILLENDER-SWAIN, T.; HARRIS, K. W.; TRIOZZI, P et al. Bisphosphonates inhibit the growth of mesothelioma cells in vitro and in vivo. **Clin Cancer Res.**, v.12, n.9, p.2862-2868, 2006.

APÊNDICE – DADOS BRUTOS DA PESQUISA

Área selecionada - Calo

Animal	Controle- 7d	AZ-7d	Controle- 14d	AZ-14d	Controle- 28 d	AZ-28d
1	0,76	5,44	10,87	19,29	16,46	21,11
2	1,92	1,15	8,13	11,41	15,87	12,97
3	5,57	3,42	12,94	8,84	14,02	17,36
4	6,91	5,95	8,36	11,68	9,63	16,95
5	4,61	6,59	16,92	15,5	14,04	28,1
6	Excluído	6,77	12,72	10,62	Excluído	22,21

Média dos níveis de cinza (densidade óptica)

Animal	Controle- 7d	AZ-7d	Controle- 14d	AZ-14d	Controle- 28 d	AZ-28d
1	77,15	51,72	57,16	61,52	53,83	68,88
2	71,17	54,17	54,94	57,6	57,82	58,86
3	60	62,05	59,2	54,07	67,5	56,64
4	55,17	52,76	58,57	53,92	55,88	58,9
5	59,08	51,95	59,71	56,85	59,76	68,69
6	Excluído	67,45	62,06	60,95	Excluído	66,42

Colágeno tipo I nas corticais

Animal	Controle- 7d	AZ-7d	Controle- 14d	AZ-14d	Controle- 28 d	AZ-28d
1	61,34	81,01	58,38	83,14	39,88	89,67
2	76,26	88,41	61,48	69,6	51,67	81,66
3	36,69	85,6	50,63	77,47	82,16	75,81
4	44,94	72,39	45,21	85,6	37,39	82,03
5	77,65	70,09	19,65	82,81	58,04	87,16
6	Excluído	85,83	21,54	72,48	Excluído	90,48

Colágeno tipo III nas corticais

Animal	Controle- 7d	AZ-7d	Controle- 14d	AZ-14d	Controle- 28 d	AZ-28d
1	4,43	4,94	1,75	2,91	5,06	2,36
2	2,89	0,54	1,83	5,48	9,73	5,31
3	1,31	3,94	0,84	2,63	0,31	8,17
4	3,73	14,96	3,26	4,62	1,69	11,3
5	0,9	12,85	12,3	1,63	0,6	10,07
6	Excluído	1,44	10,35	1,47	Excluído	10,27

Colágeno tipo I no calo

Animal	Controle- 7d	AZ-7d	Controle- 14d	AZ-14d	Controle- 28 d	AZ-28d
1	21	27,64	40,43	34,53	20,23	30,92
2	46,04	42,86	29,62	47,86	33,03	45,21
3	17,99	34,14	32,8	47,23	23,26	37,96
4	24,65	37,08	27,2	31,8	25,17	45,97
5	13,46	32,66	7,7	31,22	38,62	42,12
6	Excluído	34,29	8,7	32,11	Excluído	47,82

Colágeno tipo III no calo

Animal	Controle- 7d	AZ-7d	Controle- 14d	AZ-14d	Controle- 28 d	AZ-28d
1	1,37	0,86	0,13	0,15	0,27	0,25
2	0,42	1,99	1,4	4,07	1,45	0,51
3	2,06	0,08	4,04	0,34	0,91	0,65
4	0,68	0,27	1,04	0,23	2,81	0,27
5	5,7	0,23	3,92	0,51	0,28	0,21
6	Excluído	0,14	4,9	0,05	Excluído	0,34

ANEXO – Aprovação do CEPA



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°56/08, sobre o projeto intitulado: **"EFEITOS DO ÁCIDO ZOLEIDRÔNICO NA CONSOLIDAÇÃO DE FRATURAS NA DIÁFISE DOS FÊMURES DE RATOS TRATADOS COM OSTEÓSSÍNTESE INTRAMEDULAR."**, de responsabilidade do Prof. José Alberto Dias Leite, 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 29 de junho de 2009.

Fortaleza, 26 de janeiro de 2011.

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