

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PROGRAMA DE CIRURGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIRURGIA

GISELE FAÇANHA DIÓGENES TEIXEIRA

EFEITOS DO CARBONATO DE LODENAFIL NA CONSOLIDAÇÃO DE FRATURAS DA
DIÁFISE FEMORAL DE RATOS TRATADOS COM HASTE INTRAMEDULAR

FORTALEZA

2010

GISELE FAÇANHA DIÓGENES TEIXEIRA

EFEITOS DO CARBONATO DE LODENAFIL NA CONSOLIDAÇÃO DE FRATURAS DA
DIÁFISE FEMORAL DE RATOS TRATADOS COM HASTE INTRAMEDULAR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* do Programa de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Cirurgia.

Orientador: Prof. Dr. José Alberto Dias Leite

FORTALEZA

2010

T266e Teixeira, Gisele Façanha Diógenes

Efeitos do carbonato de lodenafil na consolidação de fraturas da diáfise femoral de ratos tratados com haste intramedular / Gisele Façanha Diógenes Teixeira. – Fortaleza-Ce, 2010.

67 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. José Alberto Dias Leite

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia

1. Inibidores de Fosfodiesterase 2. Fixação Intramedular de Fraturas 3. Consolidação da Fratura I. Leite, José Alberto Dias (Orient.) II. Título.

CDD: 617.15

GISELE FAÇANHA DIÓGENES TEIXEIRA

EFEITOS DO CARBONATO DE LODENAFIL NA CONSOLIDAÇÃO DE FRATURAS DA
DIÁFISE FEMORAL DE RATOS TRATADOS COM HASTE INTRAMEDULAR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* do Programa de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Cirurgia.

Orientador: Prof. Dr. José Alberto Dias Leite

Aprovada em 23 de Fevereiro de 2010

Banca Examinadora

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

Profa. Dra. Adriana Rolim Campos Barros
Universidade de Fortaleza

Prof. Dr. Miguel Ricardo Barbosa Moraes
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Antonio Ribeiro da Silva Filho
Faculdade de Medicina Christus

A DEUS, que sempre esteve comigo, me orientando, guiando meus passos, me cobrindo com seu amor.

Aos meus pais, MANUEL JOAQUIM DIÓGENES TEIXEIRA e MÔNICA CARDOSO FAÇANHA, que sempre me incentivaram e me deram todo o alicerce para chegar aqui e serão sempre meus orientadores.

Aos meus irmãos, MARCELO FAÇANHA DIÓGENES TEIXEIRA e ERIC GOMES DIÓGENES TEIXEIRA, pelo carinho e apoio.

Aos meus avós, NELSON SÁ FAÇANHA e DAYSE CARDOSO FAÇANHA, por serem meus segundos pais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente ao meu orientador Professor Doutor JOSÉ ALBERTO DIAS LEITE, exemplo de médico e dedicação à pesquisa, pelos ensinamentos, estímulos e determinação com que orientou esta pesquisa. Por ter ficado ao meu lado, acreditado em mim, por ter sido pra mim uma figura paterna dentro da pesquisa, por ter resolvido com todo bom humor e otimismo todos os impasses que esta pesquisa enfrentou.

A Professora Mestre, ANA CRISTHINA DE OLIVEIRA BRASIL, por todos os ensinamentos brilhantemente passados, por todo incentivo, por ser além de tudo minha amiga.

A Professora Doutora, ADRIANA ROLIM CAMPOS BARROS, por todo o apoio, por sua essencial contribuição, por sempre me orientar, especialmente nos momentos em que mais preciso. Por aceitar participar da banca examinadora desta pesquisa e ter contribuindo de forma tão extraordinária para tornar esta pesquisa melhor.

Ao Professor Doutor FRANCISCO VAGNALDO FECHINE JAMACARU, por me ensinar a usar o programa genialmente desenvolvido por ele, por ajudar na análise dos resultados, por aceitar participar da banca de qualificação deste trabalho, por ter feito observações tão importantes para a melhoria desta pesquisa, por ser sempre tão solícito e paciente, enfim por sua ajuda e inestimável colaboração neste trabalho.

Ao Mestre CHARLES JEAN GOMES DE MESQUITA, por ter aceitado participar da banca de qualificação deste trabalho e pelas preciosas considerações que engrandeceram este trabalho.

A Professora Doutora MARIA LUZETE COSTA CAVALCANTE, por participar da banca de qualificação deste trabalho, por fazer suas brilhantes sugestões de uma maneira tão gentil, contribuindo para a melhora da qualidade desta pesquisa.

Ao Professor Doutor MIGUEL RICARDO BARBOSA MORAES, por aceitar participar da banca examinadora, por todas as considerações tão importantes, feitas para o engrandecimento desta pesquisa.

Ao Professor Doutor ANTONIO RIBEIRO DA SILVA FILHO, por aceitar participar da banca examinadora, por todas as sugestões valiosas apresentadas.

Ao Professor Doutor PAULO ROBERTO LEITÃO DE VASCONCELOS, Coordenador do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* do PROGRAMA de Cirurgia da Universidade Federal do Ceará, pela competência com que desenvolve suas atividades.

Ao Professor Doutor JOSÉ TELMO VALENÇA JÚNIOR, Patologista, pesquisador, que ajudou a avaliar os cortes histológicos desta pesquisa.

Ao Médico JOSÉ LIMA DE CARVALHO ROCHA, Diretor da Faculdade Christus e companheiro de Pós-Graduação, por facilitar o nosso acesso às instalações modernas da Faculdade.

A Senhora MARIA JOSÉ RAPOSO RODRIGUES, Coordenadora dos Laboratórios de Saúde e Biotério da Faculdade de Medicina Christus pelo apoio, disponibilidade e dedicação com que executa suas atividades.

A Fisioterapeuta, SÂNIA NARA COSTA DA ROCHA, por ter sido meu apoio, minha base, minha companheira durante todas as etapas deste estudo, por ter me ouvido, me incentivado a seguir em frente, sempre com seu jeito doce e meigo, por nunca me deixar desistir ou desanimar.

Ao Médico Ortopedista Mestre CARLOS WINDSON CAVALCANTE MOTA, por ter me apoiado no início da pesquisa, por ter ido ao laboratório comigo, por ter cedido parte do seu material a esta pesquisa, por ter sido sempre tão acessível.

Ao Médico Ortopedista JÚLIO CÉSAR CHAGAS CAVALCANTE, por todo incentivo, por querer sempre o melhor para este estudo.

Ao Cirurgião Dentista VALMIRLAN FECHINE JAMACARU, pelo incentivo no início deste trabalho, pela ajuda na obtenção das imagens, pela ajuda nos resultados, por me mostrar o que é verdadeiramente ser apaixonado por pesquisa.

Ao Fisioterapeuta FRANCISCO FLEURY UCHOA SANTOS JUNIOR, por ser amigo, por eu poder contar em todos os momentos, por, com seu exemplo, me fazer crescer, pela ajuda com a estatística, pelo apoio, por ser uma pessoa que eu verdadeiramente admiro.

Ao Veterinário HELDER CAMBRAIA, por crer na legitimidade deste estudo, e aceitar nos fornecer os anestésicos, indispensáveis nesta pesquisa.

Aos funcionários da Faculdade de Medicina Christus, em especial ao técnico de laboratório FRANCISCO WELLINGTON DA SILVA, por toda a paciência e dedicação, por todo o companheirismo, por ter me ensinado tudo o que foi possível a respeito dos laboratórios e ao JOSÉ ERINALDO GOMES DE SOUSA, por preparar as lâminas histológicas com tanto esmero.

A técnica em Radiologia MARIA DA CONCEIÇÃO DE SOUZA, por ter me ajudado tão prontamente na realização dos exames radiológicos.

A Professora Mestre ANA PAULA VASCONCELOS ABDON e ao Acadêmico de Fisioterapia RAMON TÁVORA VIANA, ambos da Universidade de Fortaleza, por terem me ensinado a técnica de gavagem.

Aos acadêmicos de Medicina, CLÁUDIO MANUEL GONÇALVES DA SILVA LEITE, GABRIELA PEQUENO GOMES COSTA DE AGUIAR e JOSÉ ALBERTO DIAS LEITE

FILHO que ajudaram tão espontaneamente com as fotos das lâminas, parte tão essencial do trabalho.

Ao senhor FÁBIO ARAÚJO RIBEIRO, por todo o carinho e dedicação, por está ao meu lado, me apoiando, ajudando a seguir em frente, por ser meu amigo e meu companheiro.

A senhorita RENATA CAMERINO OSTERNO, por ser sempre mais que uma amiga, por ser uma Irmã.

A Fisioterapeuta TICIANA TEIXEIRA BLUHM, por seu companheirismo e sua amizade, por ter ido assistir a apresentação desta pesquisa.

As senhoras MARIA LUCIENE VIEIRA DE OLIVEIRA e MAGDA MARIA GOMES FONTENELE, secretárias do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* do Programa de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, pela prestimosa ajuda.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia pelos ensinamentos ministrados.

A todos os amigos, que me incentivaram, entenderam muitas vezes a minha ausência, que torceram para este projeto, tão importante pra mim, efetivar-se.

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

A FACULDADE CHRISTUS, pela infra-estrutura cedida, pelo apoio que sem o qual não teria sido possível a realização deste estudo.

A RICHARDS, na pessoa do senhor RICARDO FRANÇA, que nos cedeu gentilmente os fios de Kirshner necessários à pesquisa.

Enfim, a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste estudo.

"Se eu vi mais longe, foi por estar de pé sobre ombros de gigantes". Isaac Newton

RESUMO

EFEITOS DO CARBONATO DE LODENAFIL NA CONSOLIDAÇÃO DE FRATURAS DA DIÁFISE FEMORAL DE RATOS TRATADOS COM HASTE INTRAMEDULAR.

GISELE FAÇANHA DIÓGENES TEIXEIRA. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia. Universidade Federal do Ceará. Orientador: Prof. Dr. José Alberto Dias Leite.

O objetivo do estudo foi verificar os efeitos do carbonato de lodenafil no processo de consolidação óssea nos fêmures de ratos reduzidos com fio de Kirshner. Os fatores vasculares são extremamente importantes para a formação do calo ósseo. O carbonato de lodenafil causa efeitos vasodilatadores, pertence ao grupo dos inibidores da fosfodiesterase seletiva para o tipo 5 (PDE5), enzima que hidrolisa monofosfato de guanosina cíclico (GMPc). O GMPc induz o relaxamento da musculatura lisa, sendo utilizado no tratamento da disfunção erétil. Foram utilizados 36 ratos machos, adultos, da linhagem Wistar, com o peso médio de 300g. Todos os animais foram submetidos a cirurgia em que era realizada a fratura da diáfise femoral com uma guilhotina romba. Os animais foram divididos em 2 grupos: o grupo lodenafil, que recebeu, via oral, doses diárias de carbonato de lodenafil (10mg/kg) e o grupo controle. Os animais foram sacrificados com 7, 14 e 28 dias de pós-operatório. Houve duas mortes, dois falsos trajetos do fio e em três animais não foi estabelecida a fratura. Foram realizados estudo radiográfico com filme de mamógrafo para analisar a densidade óptica e 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. A densidade de colágeno tipo I na região cortical do fêmur próximo à fratura verificada no grupo lodenafil foi significativamente menor que a observada no grupo controle com 28 dias de consolidação óssea (**P = 0,0028). Os resultados encontrados não são consistentes o suficiente para afirmar que este fármaco exerce algum efeito na consolidação óssea. Verificou-se que o Carbonato de lodenafil não influenciou no processo de consolidação óssea nos fêmures de ratos reduzidos com fio de Kirshner.

Palavras-chave: Inibidores de Fosfodiesterase. Fixação Intramedular de Fraturas. Consolidação da fratura.

ABSTRACT

EFFECTS OF LODENAFIL CARBONATE ON FEMORAL DIAPHYSIS FRACTURES HEALING IN RATS TREATED WITH INTRAMEDULLARY STEM. GISELE FAÇANHA DIÓGENES TEIXEIRA. Dissertation (Mastership). Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia. Universidade Federal do Ceará. Advisor: Prof. Dr. José Alberto Dias Leite.

The study was to investigate the effects of Lodenafil Carbonate in the process of bone healing in femurs of rats with reduced Kirshner's wire. The vascular factors are extremely important for the formation of callus. Lodenafil Carbonate cause vasodilatory effects, belongs to the group of selective phosphodiesterase type 5(PDE5) inhibitors, that enzyme inhibits cyclic guanosine monophosphate (GMPc) and relaxation of smooth muscles and are used to treat erectile dysfunction. It used 36 male rats, adult male rats, with the average weight of 300g. All animals underwent surgery in which fractures to the femoral shaft with a blunt guillotine. The animals were divided into 2 groups: lodenafil group, wich received oral doses of carbonate lodenafil (10mg/kg) and the control group. The animals were sacrificed at 7, 14 and 28 days postoperatively. There were two deaths, two false paths of the wire and three animals was not established fracture. Were performed radiographic studies with film mammography to analyze the optical density and area of callus, measured in mm² and histological study, using samples stained with *picrosirius red* under microscope light polarization, to quantify formation of collagen type I and type III in the cortical region near the fracture and callus. The density of type I collagen in the cortical region of the femur near the fracture observed in group lodenafil was significantly lower than that observed in the control group at 28 days of bone (** P = 0.0028). The results are not consistent enough to say that this drug has an effect on bone healing. It was found that the carbonate lodenafil not influence the process of bone healing in femurs of rats with reduced wire Kirshner.

Keywords: Phosphodiesterase Inhibitors. Fracture Fixation, Intramedullary. Fracture Healing.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Divisão dos animais entre os grupos.....	28
FIGURA 2 – Localização do orifício de acesso ao canal medular entre os côndilos, animal em decúbito dorsal.....	29
FIGURA 3 - Bloqueio do fio de Kirshner na região trocanteriana, animal em decúbito lateral.....	30
FIGURA 4 - Guilhotina romba.....	31
FIGURA 5 - Estabilização do fêmur na guilhotina romba.....	32
FIGURA 6 – Posicionamento do animal na guilhotina romba.....	32
FIGURA 7 – Imagens radiográficas nos tempos de 7, 14 e 28 dias de consolidação óssea nos grupos controle e lodenafil.....	34
FIGURA 8 – Quantificação, com aumento de 10x, da área do calo em mm ² e da densidade óptica, definida como média dos níveis de cinza.....	35
FIGURA 9 - Imagens histológicas nos tempos de 7, 14 e 28 dias de consolidação óssea nos grupos controle e lodenafil.....	37
FIGURA 10 - Quantificação da percentagem do colágeno tipo I, em lâmina com aumento de 10x.....	37
FIGURA 11 – Densidade óptica do calo ósseo. Dados expressos como média e desvio padrão.....	41
FIGURA 12 – Área do calo ósseo em mm ² mensurada nos grupos controle e lodenafil. Os dados apresentados como média e desvio padrão.....	43
FIGURA 13 – Densidade de colágeno tipo I, expressa em termos percentuais, mensurada no calo ósseo nos grupos controle e lodenafil nos dias 7, 14 e 28 de consolidação óssea. Dados expressos em média e desvio padrão.....	45
FIGURA 14 – Densidade de colágeno tipo I, expressa em termos percentuais, mensurada na porção cortical do fêmur próximo a fratura nos grupos controle e lodenafil nos dias 7, 14 e 28 de consolidação óssea. Os dados correspondem à média e desvio padrão.....	47
FIGURA 15 – Densidade de colágeno tipo III, expressa em termos percentuais,	

<p>mensurada no calo ósseo nos grupos controle e lodenafil nos dias 7, 14 e 28 de consolidação óssea. Os dados correspondem à média e desvio padrão das medições efetuadas em preparados histológicos.....</p>	<p>49</p>
<p>FIGURA 16 – Densidade de colágeno tipo III, expressa em termos percentuais, mensurada na porção cortical próxima à fratura do fêmur nos grupos controle e lodenafil nos dias 7, 14 e 28 de consolidação óssea. Os dados correspondem à média e desvio padrão das medições efetuadas em preparados histológicos.....</p>	<p>51</p>

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 lodenafil nos três tempos estudados (dias 7, 14 e 28)..... 39
- TABELA 2** – Valores da média e desvio padrão da área do calo ósseo referentes às medições efetuadas nos animais dos grupos controle e lodenafil nos três tempos estudados (7, 14 e 28 dias de consolidação)..... 41
- TABELA 3** – Formação de calo ósseo calo ósseo, conforme a imagem radiológica, nos animais dos grupos controle e lodenafil no sétimo dia de consolidação óssea..... 43
- TABELA 4** – Valores da média e desvio padrão da densidade de colágeno tipo I no calo ósseo referente às medições efetuadas nos animais dos grupos controle e lodenafil nos três tempos estudados (7, 14 e 28 dias de consolidação)..... 45
- TABELA 5** – 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 lodenafil nos três tempos estudados (7, 14 e 28 dias de consolidação)..... 47
- TABELA 6** – Valores da média e desvio padrão da densidade de colágeno tipo III no calo ósseo referentes às medições efetuadas nos animais dos grupos controle e lodenafil nos três tempos estudados (dias 7, 14 e 28)..... 49
- TABELA 7** – 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 lodenafil nos três tempos estudados (dias 7, 14 e 28).....	51
--	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Justificativa.....	23
2 OBJETIVO.....	25
3 MATERIAL E MÉTODO.....	26
3.1 Aspectos éticos.....	26
3.2 Tipo de estudo.....	26
3.3 Local da pesquisa.....	26
3.4 Caracterização da amostra.....	26
3.5 Ambiente de experimentação.....	27
3.6 Delineamento do estudo.....	27
3.7 Procedimento cirúrgico	28
3.8 Técnica de indução da fratura.....	30
3.9 Estudo radiográfico.....	33
3.10 Estudo histológico.....	35
3.11 Análise estatística.....	38
4 RESULTADOS.....	39
4.1 Estudo radiográfico.....	39
4.1.1 Formação de calo ósseo no sétimo dia de consolidação.....	39
4.1.2 Densidade óptica do calo ósseo.....	40
4.1.3 Área do calo ósseo em mm ²	42
4.2 Estudo histológico.....	44
4.2.1 Densidade do colágeno tipo I no calo ósseo.....	44
4.2.2 Densidade do colágeno tipo I na região cortical do fêmur próximo à fratura.....	46
4.2.3 Densidade de colágeno tipo III no calo ósseo.....	48

4.2.4 Densidade de colágeno tipo III na região cortical do fêmur próximo a fratura.....	50
5 DISCUSSÃO.....	52
6 CONCLUSÃO.....	58
REFERÊNCIAS.....	59
ANEXO 1 – Declaração de aprovação do Comitê de Ética Animal.....	65
APÊNDICE 1 - Mecanismo de ação do Inibidor da Fosfodiesterase 5 (carbonato de lodenafil).....	66
APÊNDICE 2 – Dados Brutos da pesquisa.....	67

INTRODUÇÃO

As fraturas femorais apresentam uma incidência anual de 1 a 4:10.000 pessoas, podendo ser expostas ou fechadas (KUPCZIK *et al.*, 2009). Este tipo de fratura constitui um problema de saúde pública, em virtude da frequência, dos tipos de mecanismos e da alta morbidade e mortalidade (MORAES *et al.*, 2009).

Existem dois grupos que são mais acometidos, os adultos jovens, em decorrência de traumas de alta energia, como acidentes automobilísticos, e idosos, devido principalmente a queda da própria altura (MORAES *et al.*, 2009). O tratamento deste tipo de fratura é predominantemente cirúrgico, por meio da fixação interna que proporciona estabilidade possibilitando a consolidação óssea (KUPCZIK *et al.*, 2009). As complicações dessas fraturas podem ser sistêmicas ou locais (KUPCZIK *et al.*, 2009).

Uso de hastes intramedulares bloqueadas em humanos foi descrita no início dos anos 50 por Modney (ROMANO, *et al.*, 2008). As hastes intramedulares previnem os micromovimentos responsáveis pela não consolidação óssea, que eventualmente ocorrem em pacientes submetidos a outros tipos de tratamento cirúrgico (ROMANO *et al.*, 2008). As hastes também restauram a função do membro fraturado, proporcionam a mobilização precoce, diminuindo os riscos de complicações cardiopulmonares (FERNANDES *et al.*, 2002).

A formação do calo ósseo para consolidação de fraturas é um complexo processo dinâmico, ordenado e sistemático que geralmente envolve perióstio, cortical e medular do osso comprometido. O processo conta com a participação de células mesequimais totipotentes até chegar no estágio de formação de um tecido ósseo que irá reparar a lesão (SCHWARTSMANN, 2003).

A consolidação das fraturas de ossos tubulares pode ser dividida em cinco estágios, que não são delimitados de maneira muito nítida e que mais de um estágio pode ocorrer concomitantemente em diferentes áreas ósseas (ADAMS; HAMBLEN, 1994; SCHWARTSMANN, 2003):

- O primeiro estágio, também chamado de estágio de hematoma, é aquele em que ocorre extravasamento de sangue dos vasos rompidos para o perióstio, que o contém. Quando o perióstio é rompido, pode ocorrer o aporisma para partes moles. Este estágio acontece após

algumas horas e pode se estender por dias. Com o rompimento dos vasos que situam-se longitudinalmente no osso longo, as áreas adjacente a fratura tornam-se isquêmicas e sem o suprimento do sangue evoluem para a necrose. Células polimorfonucleares e pluripotenciais organizam o hematoma, substituindo o tecido fibrovascular do coágulo por fibras de colágeno (ADAMS; HAMBLEN, 1994; MENDES *et al*, 2001; SCHWARTSMANN, 2003).

- O segundo estágio, ou estágio de proliferação subperiosteal e endosteal, caracteriza-se pela formação de um exsudato serofibrinoso e pela liberação de pirógenos angiogênicos pelos tecidos necróticos. Neste estágio, ocorre também abaixo do periósteo o aumento das células antecessoras dos osteoblastos, que começam a reabsorver o tecido ósseo necrosado e sedimentar a substância intercelular. No canal medular também ocorre atividade celular, que é prejudicada pelo uso de hastes intramedulares. Há a formação de tecido de granulação que atua na angiogênese e na organização dos tecidos e estruturas e ocorre entre o segundo e décimo segundo dia após a fratura. (ADAMS; HAMBLEN, 1994; MENDES *et al*, 2001; SCHWARTSMANN, 2003; MORAES, 2007).

- O terceiro estágio é também denominado estágio do calo ósseo. Os osteoblastos depositam uma matriz intercelular de colágeno e polissacarídeos que saturada de sais de cálcio, dá origem ao osso imaturo do calo ósseo. Este osso primário é visível em estudos radiográficos, dando o primeiro indício que a fratura está sendo consolidada (ADAMS; HAMBLEN, 1994).

- Inicia-se no quarto estágio, o processo de consolidação óssea, que é evidente após a primeira semana, e pode durar vários meses. Nesta fase, o calo ósseo, ou osso primário, começa a se formar e vai se transformando gradativamente em osso maduro, adquirindo estrutura lamelar típica (ADAMS; HAMBLEN, 1994).

- No quinto estágio, chamado de estágio de remodelação, o osso maduro é substituído por tecido ósseo lamelar. O osso recém-formado geralmente forma um colar bulboso que circunda o osso e obstrui o canal medular, quando há um pino intramedular, esta reação é pequena. O calo ósseo excessivo é removido. Esse processo se dá em todos os indivíduos ao longo da vida, mas é mais evidente nos meses que sucedem uma fratura (ADAMS; HAMBLEN, 1994; SCHWARTSMANN, 2003).

Udupa e Prasad (1963) realizaram um estudo histoquímico com objetivo de classificar as fases da consolidação óssea em ratos, classificando em quatro fases:

- Na primeira semana inicia-se a fase fibroblástica, onde ocorre maior atividade celular. Estes fibroblastos, oriundos principalmente da região cortical das extremidades da fratura, se proliferam e produzem mucopolissacarídeos, contribuindo para a formação de fibras de colágeno. Os osteoblastos secretam mucopolissacarídeos que são rapidamente convertidas em fibras de colágeno. Ao final da primeira semana, pode-se perceber áreas de neoformação óssea.

- Todas as mudanças ocorridas na primeira semana, manifestam-se mais claramente na segunda, onde ocorre a fase do colágeno. O sangue coagulado que estava na lacuna entre os fragmentos é substituído por fibras de colágeno. As fibras do colágeno tornam-se maduras por juntarem-se umas as outras para formar densos feixes. Mesmo se o espaço entre as extremidades fraturadas for grande, a lacuna é preenchida por fibras de colágeno.

- Entre a terceira e quarta semanas compreende-se a fase osteogênica, onde os condroblastos se proliferam muito rapidamente, secretando fosfatase alcalina, que calcifica a substância intercelular.

- A fase de remodelação óssea ocorre entre a quinta e sexta semanas. O tecido ósseo formado não é compacto, mas contém trabéculas ósseas com muitos capilares. O osso novo cresce e as trabéculas se tornam cada vez menores, até o tecido atingir a estrutura de osso compacto. Nesta fase, o excesso de massa óssea é reabsorvido.

Existem vários fatores importantes para a consolidação das fraturas, entre eles, as influências mecânicas, celulares, idade, estado nutricional, afecções pregressas, presença ou ausência de infecção no foco. Tais fatores podem auxiliar ou dificultar o processo de consolidação (SCHWARTSMANN, 2003). O método de tratamento empregado deve criar condições favoráveis para que o processo de reparo ósseo seja otimizado (MÜLLER *et al.*, 2004).

Estudos demonstraram que algumas drogas atuam estimulando a regeneração óssea, como esteróides anabolizantes, hialuronidase, sulfato de condroitina, hormônio do crescimento, insulina, calcitonina e hormônios tiroidianos (GIORDANO *et al.*, 1999). E outros fármacos, retardam a consolidação, a citar corticosteróides, anticoagulantes e tiouracil (GIORDANO *et al.*, 1999).

A influência da enoxaparina foi estudada na consolidação de fraturas em ratos e observou-se que o fármaco estimulou a consolidação óssea em estágios intermediários (GIORDANO *et al.*, 1999).

Mendes *et al.* (2001) avaliaram o efeito do uso prolongado de corticóides na consolidação óssea de animais, concluindo que a administração prolongada deste fármaco causa retardo na consolidação óssea

Müller e *et al.* (2004) utilizaram diclofenaco sódico, concluindo que houve retardo na consolidação óssea do grupo tratado com o fármaco.

Em um modelo experimental de consolidação óssea em animais tratados com acetomifen, Castro *et al.* (2006) verificaram após análise radiográfica e histológica que este fármaco não interfere no processo de reparo ósseo.

Kupczik e *et al.* (2009) testaram a resistência óssea em animais tratados e em animais não tratados com ciprofloxacina e verificou que não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos.

A fosfodiesterase tipo 5 (PDE5) é enzima que atua principalmente no mecanismo da ereção peniana (ALBUQUERQUE *et al.*, 2005), hidrolisando o nucleotídeo monofosfato de guanosina cíclico (GMPc), inibindo sua ação (FRIES; SHARIAT; WILMOWSKY, 2005). Em resposta à estimulação sexual, fibras nervosas e células endoteliais do pênis liberam óxido nítrico, um potente vasodilatador, que estimula a atividade da guanilato ciclase e aumenta os níveis de GMPc que, quando acumulada nos corpos cavernosos, resulta na diminuição do cálcio intracelular e conseqüente relaxamento da musculatura lisa (GUIMARÃES *et al.*, 1999; ALBUQUERQUE *et al.*, 2005) (APÊNDICE 1).

O óxido nítrico é um radical livre reativo e atua em muitos processos fisiopatológicos, como artropatias inflamatórias, artrite reumatóide, consolidação de fraturas (AKGÜL; ALEMDAROĞLU, 2008). É um segundo mensageiro importante no corpo humano por atuar em processos distintos, ativando ou inibindo moléculas (BARRETO; CORREIA; MUSCARÁ, 2005). Têm efeitos significativos em osteoblastos, osteoclastos e osteócitos. Este radical livre estimula a guanilato ciclase solúvel e a conseqüente formação de monofosfato de guanosina cíclico, que resulta no relaxamento da musculatura vascular lisa (CERQUERIA; YOSHIDA, 2002). Ele apresenta três principais isoformas, óxido nítrico-sintase (NOS), neuronal, endotelial (eNOS) e induzível (iNOS) (AKGÜL; ALEMDAROĞLU, 2008; CERQUERIA; YOSHIDA, 2002). Em seu estudo envolvendo óxido nítrico e consolidação óssea, Diwan *et al.* (2000) concluíram que a diminuição de óxido nítrico prejudica a consolidação de fraturas, tanto em ratos quanto em seres humanos.

Uma vez que a PDE5 é bloqueada, os níveis de GMPc aumentam, potencializando o suas ações (BENTLIN *et al.*, 2005). Muitos efeitos do óxido nítrico são mediados pela GMPc, assim quando há o bloqueio da PDE5, os níveis de óxido nítrico aumentam nos tecidos (AKGÜL; ALEMDAROĞLU, 2008).

Apesar de ter sua concentração aumentada nas áreas genitais masculina e feminina (ATHANAZIO *et al.*, 2006), a PDE5 também é localizada nas plaquetas e em menor quantidade nos músculos esqueléticos (KURAHSHI *et al.*, 2001) e na musculatura lisa das artérias, vísceras, traquéia (GUIMARÃES *et al.*, 1999; RICACHINESKY; AMANTÉA, 2006) e em todo o tecido vascular (LATIES; ZRENNER, 2002).

Alguns fármacos atuam inibindo a ação da PDE5, e são utilizados principalmente no tratamento da disfunção erétil. A introdução comercial do sildenafil em 1998 (Viagra®) foi considerada uma revolução no tratamento para disfunção sexual masculina, (GIAMI, 2007) por ser um medicamento eficaz na população comum (ATHANAZIO *et al.*, 2006), livre de comorbidades, como insuficiência renal grave ou cirrose hepática (CAIROLI; CAMPOS, 2005).

Além do Viagra®, existem atualmente no mercado outros medicamentos usados para tratar disfunção erétil, como o Levitra®, Cialis®, cujos princípios ativos são respectivamente Vardenafila e Tadalafila (BECKER; ÜCKERT; STIEF, 2008). Em 2008, foi lançado pelo laboratório brasileiro Cristália® um fármaco comercializado com o nome Helleva®, desenvolvido no Brasil, sendo o princípio ativo o carbonato de lodenafil, (PENA, 2009) que assim como os demais, é um inibidor da fosfodiesterase 5 (BECKER; ÜCKERT; STIEF; 2008; TOQUE *et al.*, 2008), aprovado para o tratamento da disfunção erétil (TOQUE *et al.*, 2008).

O carbonato de lodenafil é uma pró-droga, um dímero que no organismo é cindido, transformando-se em duas moléculas de seu composto ativo, lodenafil, um inibidor seletivo da fosfodiesterase 5 (PDE5) (PENA, 2009). Este composto é análogo ao sildenafil, pois é sintetizado a partir de modificações na sua estrutura molecular (LORENZETTI, 2007).

Estudos demonstram que o carbonato de lodenafil é significativamente mais eficaz para o tratamento da disfunção erétil em indivíduos que receberam tratamento com o fármaco em comparação a indivíduos que receberam placebo (GLINA *et al.*, 2009).

Suas propriedades farmacocinéticas variam de acordo com a concentração (PENA, 2009) e suas características são da mesma natureza que o Sildenafil tanto *in vivo* quanto *in vitro* (TOQUE *et al.*, 2008).

O sildenafil é rapidamente absorvido, mesmo em más condições clínicas (PAEZ *et al.*, 2005), com sua máxima concentração plasmática ocorrendo aproximadamente uma hora após a administração oral. Sua meia vida é de aproximadamente três a cinco horas (SHINLAPAWITTAYATORN; CHATTIPAKORN; CHATTIPAKORN, 2005), iniciando a atividade erétil 12 minutos após a administração e tendo efeitos por até 12 horas (SOCIEDADE BRASILEIRA DE UROLOGIA, 2007).

Os inibidores da PDE são bem aceitos pela maioria dos pacientes (FREITAS *et al.*, 2008) e os efeitos adversos são de intensidade leve e de curta duração, tais como cefaléia, congestão nasal, dispepsia, visão anormal das cores e epigastralgia (LUCIO; PAGANI; AFIUNE, 2007; SOCIEDADE BRASILEIRA DE UROLOGIA, 2007; GLINA *et al.*, 2009).

Algumas das reações adversas dos inibidores da fosfodiesterase 5 têm relação com seu poder vasodilatador, tais como rubor e cefaléia (KURAHASHI *et al.*, 2001). Efeitos colaterais mais graves estão relacionados com indivíduos com doença cardiovascular prévia, usuários de drogas de abuso ou nitratos (LUCIO; PAGANI; AFIUNE, 2007; FREITAS *et al.*, 2008). Esta classe de fármacos não aumenta a incidência de acidentes vasculares, também não altera de forma significativa a pressão arterial e a frequência cardíaca (SOCIEDADE BRASILEIRA DE UROLOGIA, 2007).

Os estudos são contundentes no que diz respeito à melhora da disfunção erétil após a administração do sildenafil, aprimorando em até 70% a qualidade da ereção. Alguns trabalhos, porém, buscam benefícios que o citrato de sildenafil possa ocasionar em outras afecções, tais como desnervação vesical (SUAID *et al.*, 2003), hipertensão pulmonar (BENTLIN *et al.*, 2005), circulação retrobulbar e campo visual (KURAHASHI *et al.*, 2001).

Recentemente o sildenafil foi aprovado pela “U.S. Food and Drug Administration (FDA)” como droga para o tratamento de hipertensão pulmonar (UTHAYATHAS *et al.*, 2007). A hipertensão arterial pulmonar (HAP) é uma afecção que provoca o aumento da resistência vascular na circulação pulmonar, por mecanismos que ainda não são claramente definidos e incluem vasoconstrição e remodelagem da parede arterial. (BARRETO *et al.*, 2005).

No relato de caso de Paez *et al.* (2005), um paciente submetido a um transplante cardíaco, em decorrência de uma cardiopatia dilatada idiopática, após 12 horas de pós-operatório, o paciente apresentava pressão arterial média de 63mmHg, quadro de hipertensão pulmonar, associado a vasoplegia, disfunção do ventrículo direito e piora clínica considerável. Foram

administradas 150mg de sildenafil via sonda nasogástrica, diminuindo significativamente a resistência vascular pulmonar. Foi mantida a administração deste fármaco a cada 8 horas, na dose de 50mg e após 1 dia, a pressão arterial pulmonar havia apresentado redução importante. Assim, os inibidores da fosfodiesterase podem ser adequados para o uso em pacientes em pós operatório de transplante cardíaco.

Lonzetti *et al.* (2008) usaram sildenafil em uma paciente com lúpus eritematoso sistêmico que se apresentava em grande sofrimento, após terem sido esgotadas todas as possibilidades terapêuticas. Foi administrado sildenafil em doses graduais, até 150mg/kg, todos os dias, durante 7 dias. A partir do quarto dia já podia ser observada uma melhora no quadro clínico da paciente, demonstrando uma excelente resposta da vasculopatia ao sildenafil.

Graça *et al.* (2008) demonstraram em modelo experimental que o sildenafil atrasa o trânsito intestinal, provavelmente por induzir a hipotensão.

Foi sugerido por Solis, Bethancourt e Britton (2008) em modelo experimental realizado em animais que o uso crônico de sildenafil pode diminuir a ansiedade tanto em animais castrados quanto em animais intactos.

Altabas *et al.* (2009) testaram o sildenafil para o tratamento de Fibro Edema Gelóide, concluindo que este fármaco pode exercer efeitos sobre a microcirculação, e nos tecidos em hipóxia.

Takasaki *et al.* (2009) demonstraram o crescimento do endométrio em pacientes submetidos a tratamento com sildenafil.

1.1 Justificativa

O suprimento sanguíneo fornecido pelos vasos do periósteo é a principal fonte para a consolidação (MORAES, 2007). Os fatores vasculares são extremamente importantes para a formação do calo ósseo. Zonas com vascularização reduzida como a diáfise, grandes lesões no envoltório de partes moles, bem como aterosclerose, podem comprometer a consolidação óssea com a formação de calo de má qualidade. A excessiva remoção do hematoma no foco de fratura durante o tratamento cirúrgico também pode acarretar resultados precários (SCHWARTSMANN, 2003).

Tendo em vista que o aumento do calibre dos vasos aumenta conseqüentemente o aporte sanguíneo e nutricional dos tecidos, e que as fraturas ósseas necessitam de uma circulação adequada para que haja uma consolidação regular compreende-se que os fatores vasculares são fundamentais para o tratamento das fraturas.

Considerando ainda que o carbonato de lodenafil, um inibidor da fosfodiesterase 5, age no endotélio vascular, na microvasculatura de vasos, na vasodilatação periférica, na inibição da ativação plaquetária (HALCOX; NOUR; ZALOS, 2002), inibindo a hidrólise da GMPc, aumentando a sua concentração e conseqüentemente potencializando o seu efeito, o relaxamento da musculatura lisa, é importante verificar se a vasodilatação causada pelo carbonato de lodenafil é satisfatória a ponto de acelerar o processo de consolidação de fraturas ósseas.

2 OBJETIVO

Verificar os efeitos do carbonato de lodenafil no processo de consolidação óssea em fraturas de fêmures de ratos submetidos a osteossíntese intramedular com fio de Kirshner.

3 MÉTODO

3.1 Aspectos éticos

O estudo foi realizado obedecendo os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

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

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Ceará (UFC), no protocolo número 52/09 (ANEXO 1).

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

3.2 Tipo de estudo

Estudo experimental controlado randomizado em ratos.

3.3 Local da pesquisa

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

3.4 Caracterização da amostra

Foram utilizados 36 ratos (*Rattus norvegicus albinus*) da raça Wistar, machos, adultos, da linhagem Wistar, com o peso médio de 300g, provenientes do biotério central da Faculdade de Medicina Christus.

3.5 Ambiente de experimentação

Os animais foram submetidos a ciclos de claro-escuro de 12h, em gaiolas adequadas contendo no máximo 6 animais, recebendo água *ad libitum* e ração da marca Fri-Ribe® balanceada. Permaneceram em ambiente climatizado, com a temperatura média de 25°C, com umidade relativa do ar em torno de 55% e iluminação adequada, no biotério central da Faculdade de Medicina Christus.

3.6 Delineamento do estudo

Os animais foram divididos em 2 grupos: o grupo lodenafil, composto de 18 animais que receberam tratamento com carbonato de lodenafil, via oral, 10mg/kg, por gavagem utilizando uma agulha especial para este fim, de acordo com os estudos de Derici *et al.* (2009) e Solis, Bethancourt e Britton (2008). O fármaco foi administrado diariamente, em dose única, desde o dia do procedimento cirúrgico até o dia do sacrifício. O grupo controle foi composto de 18 animais que não fizeram este tratamento.

Estes grupos foram subdivididos de acordo com o período de consolidação óssea em 7, 14, 28 dias, com seis animais cada. A [figura 1](#) ilustra esta divisão. Os animais foram sacrificados por inalação excessiva de éter nos respectivos grupos.

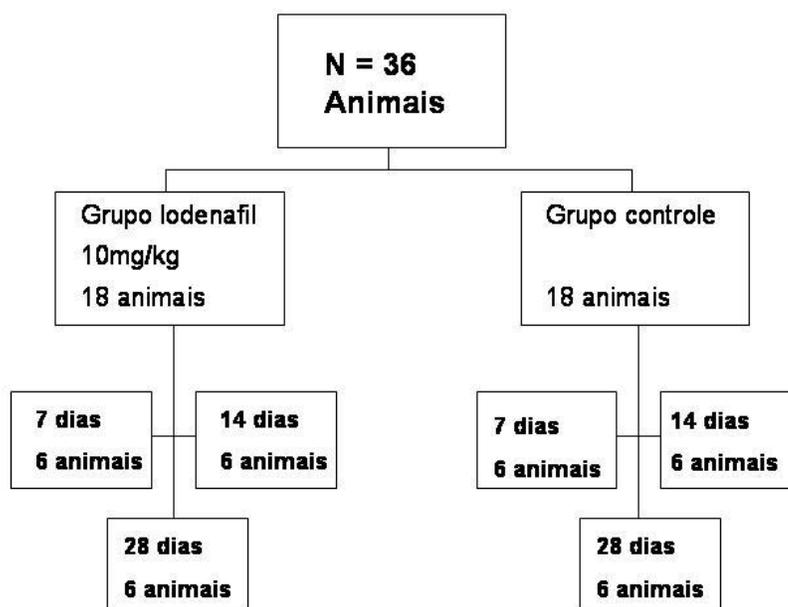


FIGURA 1 - Divisão dos animais entre os grupos

3.7 Procedimento cirúrgico

O procedimento foi padrão para todos os animais, tanto os animais do grupo controle, quanto os do grupo que recebeu tratamento com o carbonato de lodenafil. Todo o material utilizado no processo cirúrgico foi esterilizado e utilizado em apenas um animal por esterilização.

Os animais não foram submetidos a jejum pré-operatório. A anestesia utilizada foi cloridrato de cetamina (40mg/kg) e cloridrato de xilazina (5mg/kg) via intraperitoneal. Após devidamente testado para a anestesia, sendo considerado anestesiado quando se apresentava imóvel ao manuseio, com ausência de resposta a estímulos nociceptivos e mantendo frequência e amplitude respiratórias normais. O animal foi tricotomizado com aparelho de barbear elétrico, posicionado em decúbito dorsal no campo cirúrgico, foi realizada a anti-sepsia da área a ser submetida ao procedimento cirúrgico, aplicando-se Iodopovidona e foi posicionado o campo fenestrado sobre essa área.

Fez-se uma incisão longitudinal anterior na articulação do joelho direito do animal. A patela foi deslocada medialmente para localizar a região intercondiliana do fêmur. Utilizou-se um

iniciador de Haste Intramedular, para realizar orifício inicial entre os côndilos femorais e encontrar a região do canal medular (**FIGURA 2**).



FIGURA 2 – Localização do orifício de acesso ao canal medular entre os côndilos, animal em decúbito dorsal.

Foi introduzido no canal medular, por via retrógrada intercondiliana, um fio de Kirshner de 1mm de diâmetro com auxílio de um motor de suspensão mini de 130W, velocidade e 0 a 18.000rpm, até o fio ultrapassar o trocânter maior e exteriorizar-se na pele. O fio foi deixado no canal medular, sendo utilizado como uma haste intramedular, bloqueado no trocânter maior, curvando a extremidade do fio de Kirshner, para evitar migração (**FIGURA 3**) e sepultado abaixo da pele do animal. A patela foi reduzida e a incisão cirúrgica suturada com fios de sutura Mononylon 5.0.

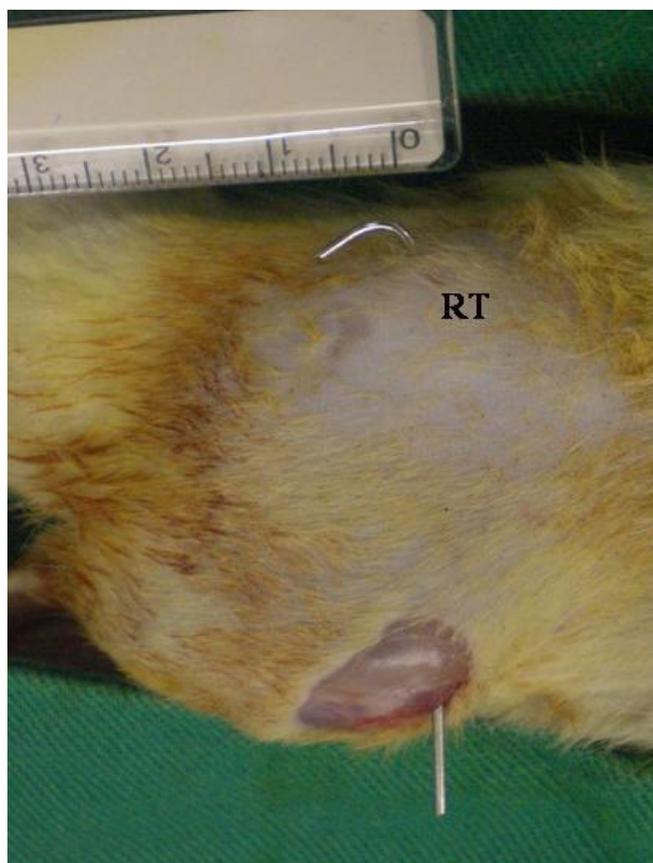


FIGURA 3 - Bloqueio do fio de Kirshner na região trocanteriana, animal em decúbito lateral.

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.

3.8 Técnica de indução da fratura

A técnica utilizada para a indução das fraturas foi a estabilização do fêmur do animal em uma guilhotina romba (**FIGURA 4**), 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 a 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 das 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.

Na [figura 4](#) a barra de aço está destrava, para melhor visualização. A depressão (H) no dispositivo preso à base é onde o fêmur do animal é estabilizado para ser submetido a fratura.

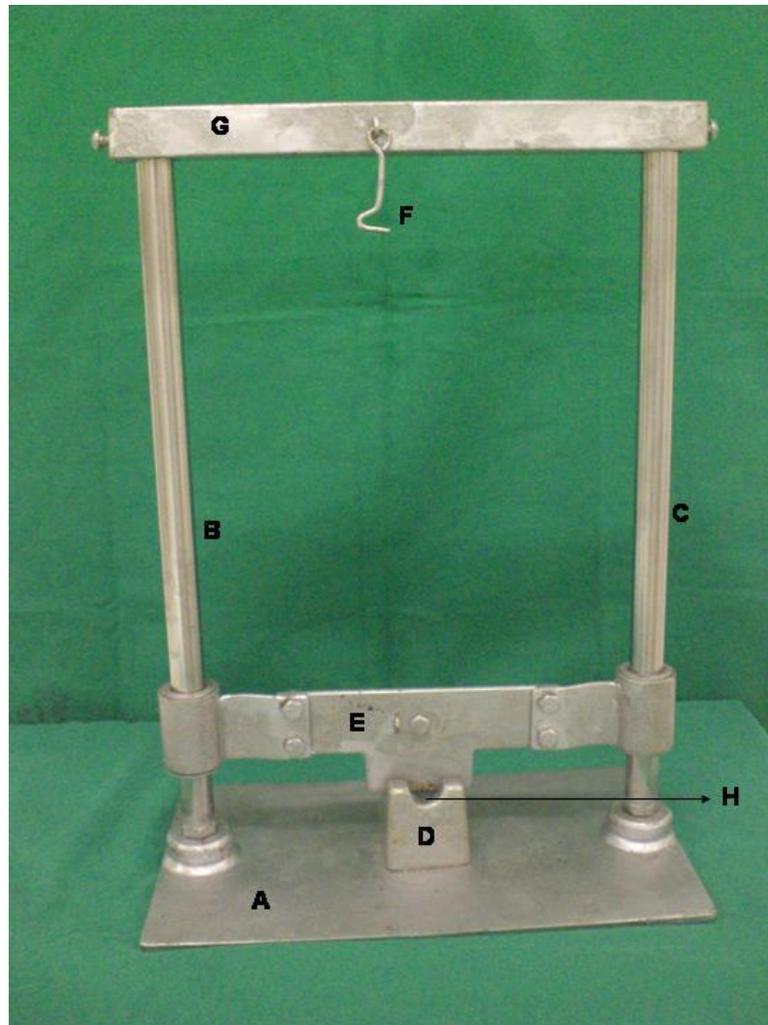


FIGURA 4 - Guilhotina romba.

Para que o fêmur fique posicionado corretamente nesta depressão ([FIGURA 4 - H](#)), o animal deve ser colocado em diagonal em relação à base da guilhotina romba, com a articulação do joelho em flexão e o quadril rotação interna ([FIGURA 5](#)). Antes da barra de aço ser destrava, o pesquisador tem que se certificar que a cauda do animal não será exposta à 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.



FIGURA 5 - Estabilização do fêmur na guilhotina romba.

Para ilustrar melhor o posicionamento do animal na guilhotina, foi retirada na figura 6 a mão do pesquisador da foto, que está em outro ângulo.



FIGURA 6 – Posicionamento do animal na guilhotina romba.

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 colocados 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 lodenafila nos tempos estudados, 7, 14 e 28 dias de consolidação óssea.

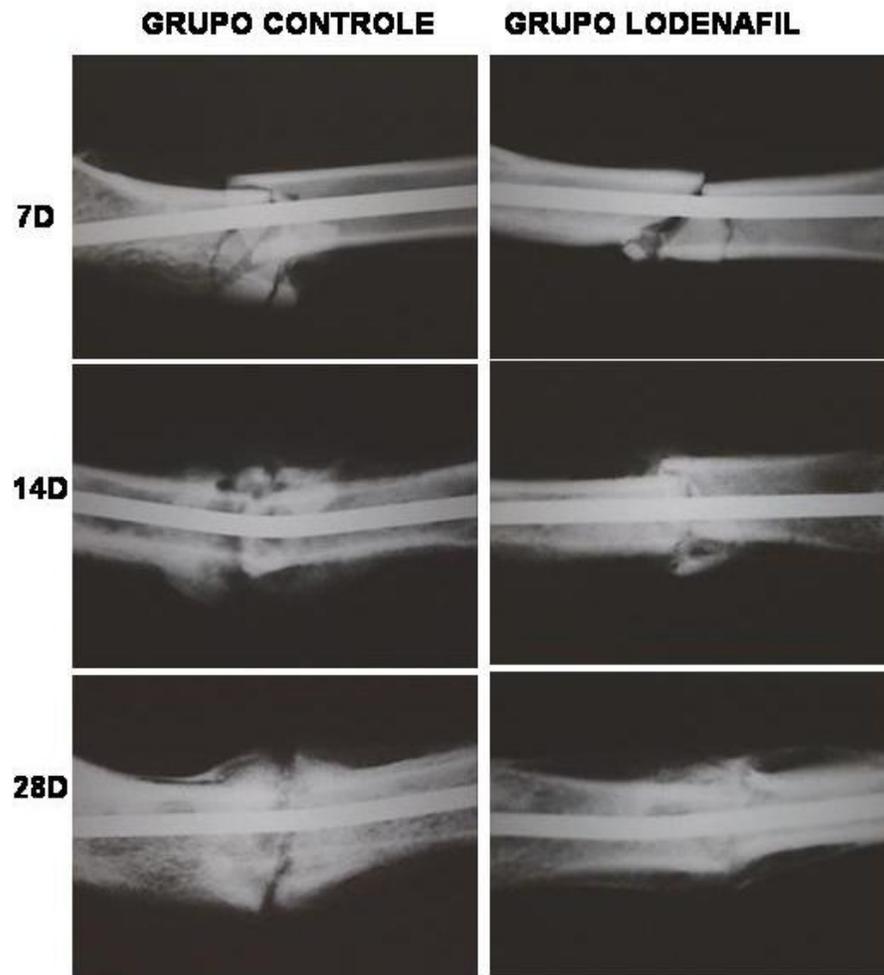


FIGURA 7 – Imagens radiográficas nos tempos de 7, 14 e 28 dias de consolidação óssea nos grupos controle e lodenafil

A densidade óptica, quantificada através da média dos níveis de cinza, e o tamanho da área do calo ósseo em mm^2 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 mm^2 e a média dos níveis de cinza. Níveis de cinza é uma escala utilizada na computação, onde o preto absoluto é 0 e o branco absoluto é 255, e cada número neste intervalo corresponde a um tom de cinza, não há unidade de medida para esta quantificação. A média destes níveis de cinza foi calculada pelo programa em

toda a área de interesse, o que corresponde à densidade óptica do calo ósseo, quanto mais perto do branco (255) esta média se encontra, mais radiopaco é o exame radiográfico, ou seja, mais consolidado o calo ósseo está.

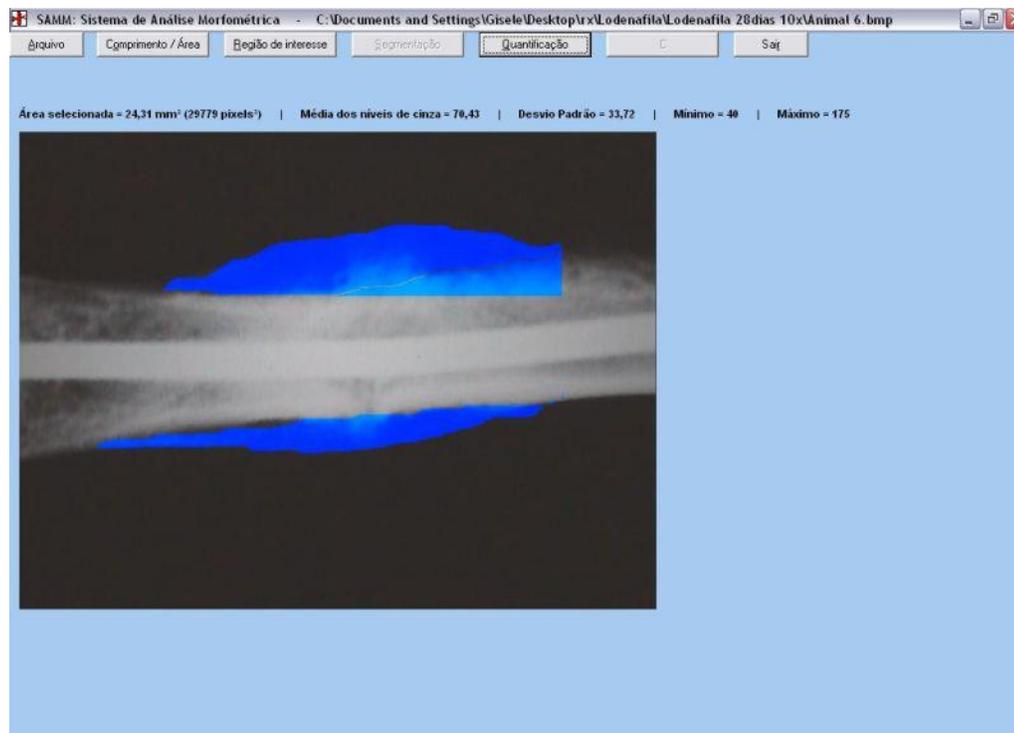


FIGURA 8 – Quantificação, com aumento de 10x, da área do calo em mm² e da densidade óptica, definida como média dos níveis de cinza.

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 este 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 as corticais do fêmur próxima 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 dos colágenos tipo I e tipo III entre os grupos controle e lodenafila 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 este 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).

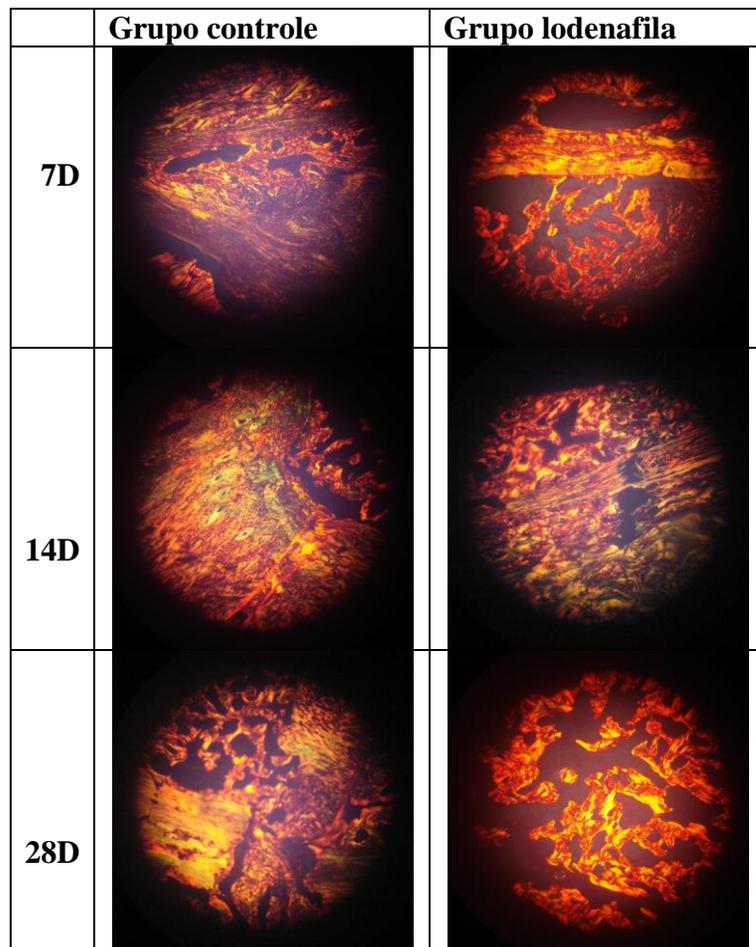


FIGURA 9 - Imagens histológicas nos tempos de 7, 14 e 28 dias de consolidação óssea nos grupos controle e lodenafil

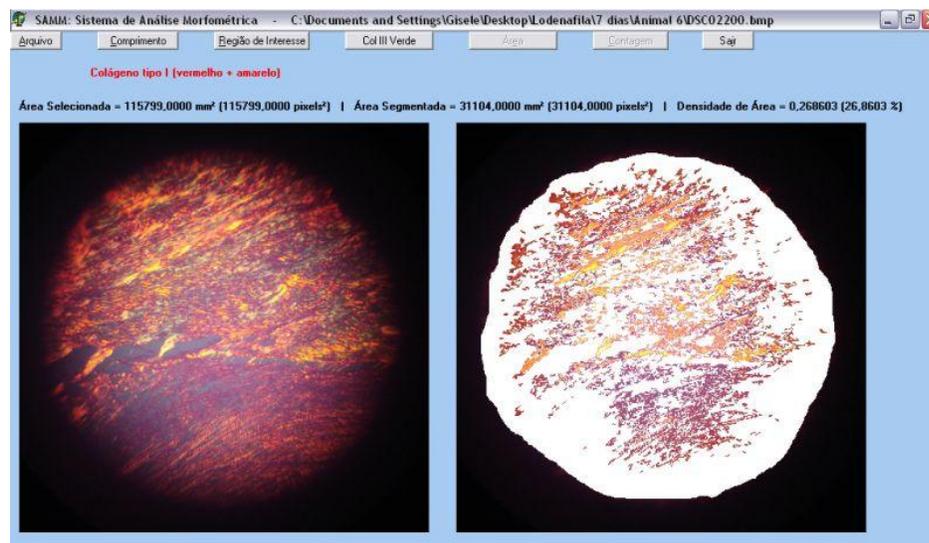


FIGURA 10 - Quantificação da percentagem do colágeno tipo I, em lâmina com aumento de 10x.

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 mínimo e máximo (dados não paramétricos). Comparações intergrupos (controle *versus* lodenafil) 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) num 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). Variáveis qualitativas nominais, por sua vez, foram expressas como frequência absoluta e relativa e analisadas pelo teste exato de Fisher (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 significativo um valor *P* menor que 0,05.

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

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 Formação de calo ósseo no sétimo dia de consolidação

Os dados foram analisados pelo teste exato de Fisher, que não evidenciou diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e lodenafil em relação à proporção de animais nos quais foi observada a formação de calo ósseo ($P = 1,0000$) (TABELA 1).

TABELA 1 – Formação de calo ósseo, conforme a imagem radiológica, nos animais dos grupos controle e lodenafil no sétimo dia de consolidação óssea.

Grupo	Calo ósseo		Total
	Presente	Ausente	
Controle	4 (80,00%)	1	5
Lodenafil	4 (66,67%)	2	6
Total	8	3	11

4.1.2 Densidade óptica do calo ósseo

Dados apresentados como média e desvio padrão das medições efetuadas em fêmures de 4 (D7), 6 (D14) e 5 (D28) animais do grupo controle e 4 (D7), 5 (D14) e 4 (D28) ratos do grupo lodenafil estão apresentados na tabela 2.

Houve uma tendência a diminuição na média da densidade óptica do grupo lodenafil de 7, 14 e 28 dias de consolidação óssea, quando comparado com o respectivo grupo controle. Entretanto, na análise intergrupos, não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos de tratamento em nenhum dos tempos.

Quando feitas comparações entre os tempos do mesmo grupo, observa-se uma tendência ao aumento da densidade óptica no tempo de 14 dias de consolidação óssea, relação aos demais, tanto no grupo controle quanto no grupo lodenafil. No grupo de 28 dias de consolidação óssea, houve uma tendência a redução em comparação ao tempo de 14 dias, mas a uma tendência ao aumento quando comparado ao grupo de 7 dias de consolidação óssea, embora nestas comparações dentro do mesmo grupo, não tenham sido verificadas diferenças estatisticamente significantes entre os tempos estudados ([FIGURA 11](#)).

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

Tempo de consolidação (dias)	Controle		Lodenafil		Significância (intergrupos)
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	
7	78,75	11,05	72,13	15,93	P=0,5201
14	97,08	11,03	91,32	18,43	P=0,5360
28	93,49	12,46	87,00	21,60	P=0,5868
Significância (intragrupo)	F=3,2105	P=0,0764	F=1,2336	P=0,3320	

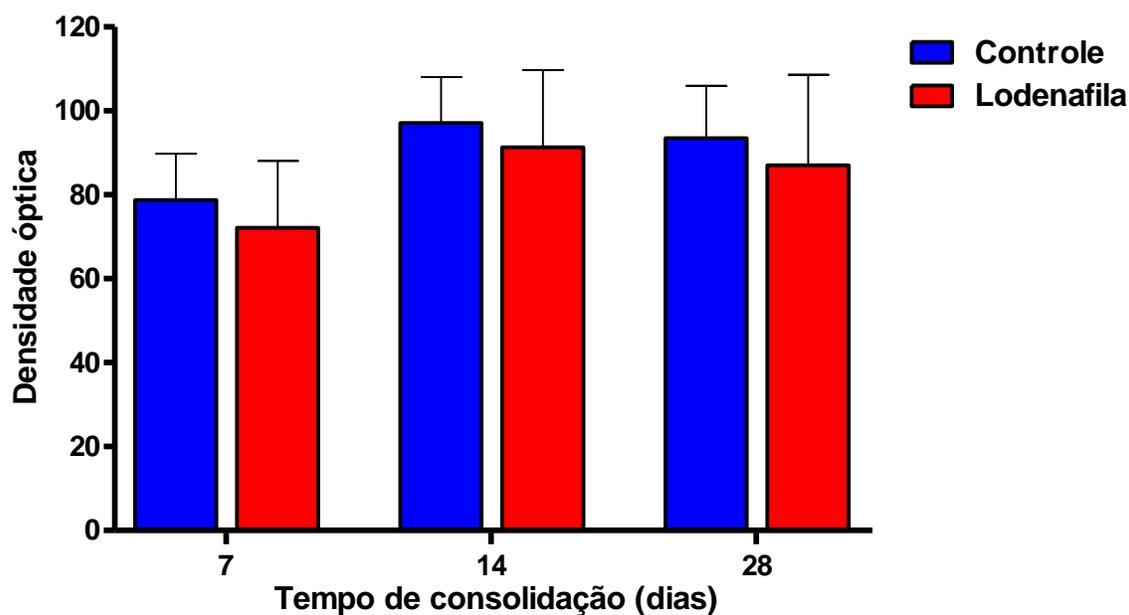


FIGURA 11 – Densidade óptica do calo ósseo. Dados expressos como média e desvio padrão.

4.1.3 Área do calo ósseo em mm²

A tabela 3 expressa os valores dos dados da média e desvio padrão das medições efetuadas da área do calo ósseo mensurada em mm² em fêmures de 4 (D7), 6 (D14) e 5 (D28) animais do grupo controle e 4 (D7), 5 (D14) e 4 (D28) fêmures de animais do grupo lodenafil.

Com base nos resultados, observa-se uma tendência ao decréscimo relativo da área do calo mensurada em mm² nos três tempos de consolidação, 7, 14 e 28 dias quando comparado com grupo lodenafil com o grupo controle na análise intergrupos, embora não tenham sido constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos de tratamento em nenhum dos tempos.

Nas comparações dentro do mesmo grupo, verificou-se que, no grupo controle, a área do calo mensurada no dia 14 de consolidação óssea foi significativamente maior (#P < 0,05) que a observada no dia 7; ademais, a área do calo verificada no dia 28 foi significativamente maior que a mensurada nos dias 7 (+++P < 0,001) e 14 (+P < 0,05). Similarmente, no grupo lodenafil, a área do calo medida no dia 28 foi significativamente maior que a mensurada nos dias 7 (***P < 0,001) e 14 (**P < 0,01) (FIGURA 12).

Observa-se ainda uma linearidade dos dados da figura 12, a área do calo ósseo aumenta quando comparado o tempo de 7, 14 e 28 dias, tanto para o grupo lodenafila, quanto para o grupo controle.

TABELA 3 – Valores da média e desvio padrão da área do calo ósseo referentes às medições efetuadas nos animais dos grupos controle e lodenafil nos três tempos estudados (7, 14 e 28 dias de consolidação).

Tempo de consolidação (dias)	Controle		Lodenafil		Significância (intergrupos)
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	
7	5,25	2,89	2,22	1,98	P=0,1341
14	19,13	6,10	14,42	4,80	P=0,1954
28	34,04	9,77	32,98	10,76	P=0,8816
Significância (intragrupo)	F=18,8170	P=0,0002	F=21,3068	P=0,0002	

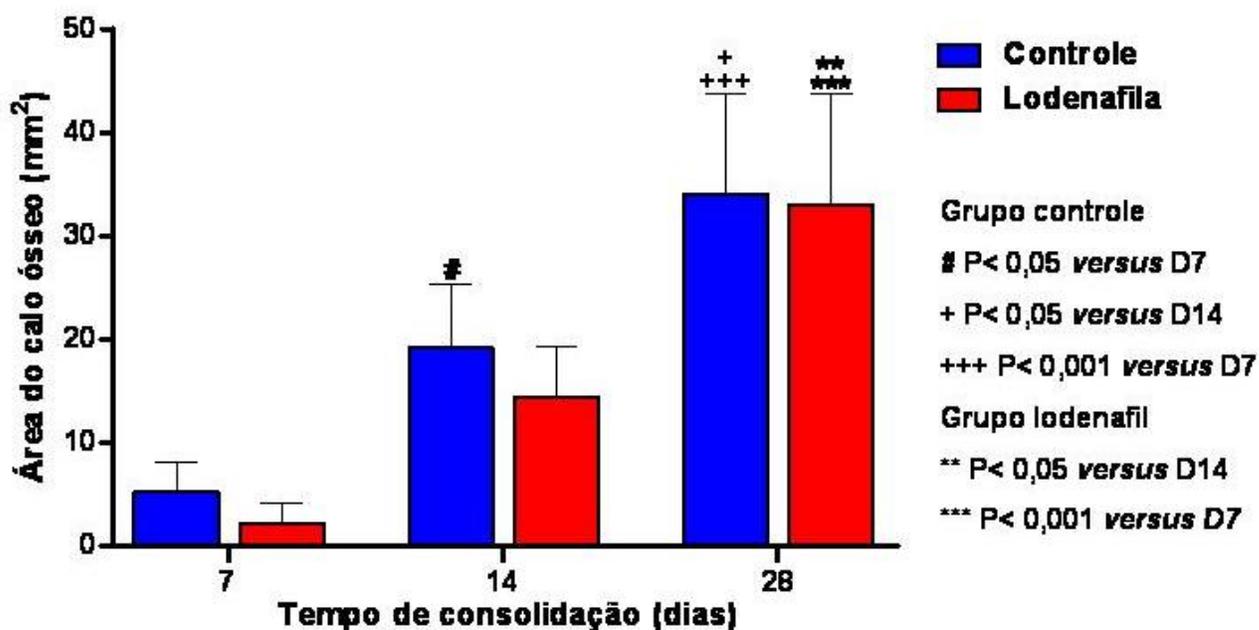


FIGURA 12 – Área do calo ósseo em mm² mensurada nos grupos controle e lodenafil. Os dados apresentados como média e desvio padrão.

4.2 Estudo histológico

Foi observada a formação de colágeno, tanto do colágeno tipo I quanto do colágeno tipo III, na cortical próxima ao local da fratura e no calo ósseo e avaliada sua proporção em percentagem em relação aos outros elementos presentes na região analisada.

4.2.1 Densidade do colágeno tipo I no calo ósseo

A tabela 4 apresenta os dados correspondentes à média e desvio padrão das medições efetuadas em preparados histológicos de 5 (D7), 6 (D14) e 5 (D28) animais do grupo controle e 5 (D7, D14 e D28) ratos do grupo lodenafil.

Na análise intergrupos, não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos de tratamento em nenhum dos tempos, embora tenha havido um intenção ao aumento da média da porcentagem do colágeno tipo I do grupo tratado com lodenafil em relação ao grupo controle dos animais com 7 e 14 dias de consolidação. No grupo de 28 dias de consolidação, observa-se uma tendência ao decréscimo desta média.

Nas comparações dentro do mesmo grupo, há uma tendência a redução da densidade do colágeno tipo I no grupo controle, quando comparado o tempo de 7 dias de consolidação óssea com o tempo de 14 dias e tendência ao aumento desta densidade quando comparado o grupo de 28 dias com os de 7 e 14 dias. No grupo lodenafila, observa-se uma tendência ao acréscimo na média da densidade do colágeno tipo I no tempo de 7 dias, quando comparado aos grupos de 14 e 28 dias de consolidação óssea, assim como quando é comparado o grupo de 28 dias como de 14 dias.

A [figura 13](#) ilustra que há, por tanto, uma linearidade decrescente da densidade do colágeno tipo I no grupo lodenafil. Porém, também não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes entre os tempos estudados.

TABELA 4 – Valores da média e desvio padrão da densidade de colágeno tipo I no calo ósseo referente às medições efetuadas nos animais dos grupos controle e lodenafil nos três tempos estudados (7, 14 e 28 dias de consolidação).

Tempo de consolidação (dias)	Controle		Lodenafil		Significância (intergrupos)
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	
7	24,63	12,65	26,71	4,51	P=0,7381
14	24,41	13,33	25,56	6,99	P=0,8667
28	28,06	7,57	23,04	12,53	P=0,4649
	F=0,1611	P=0,8529	F=0,2335	P=0,7953	

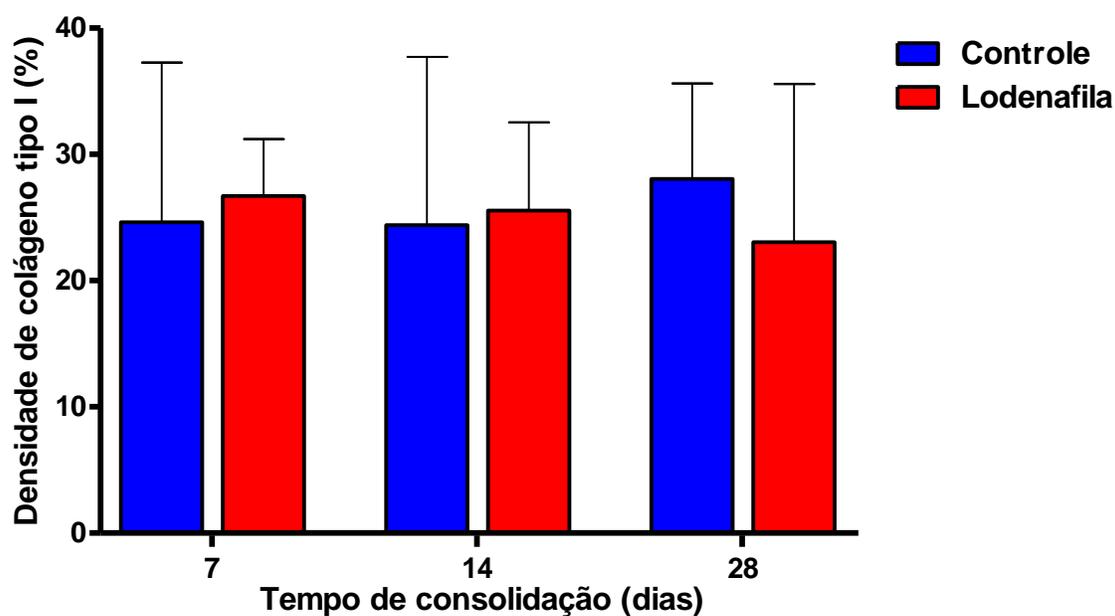


FIGURA 13 – Densidade de colágeno tipo I, expressa em termos percentuais, mensurada no calo ósseo nos grupos controle e lodenafil nos dias 7, 14 e 28 de consolidação óssea. Dados expressos em média e desvio padrão.

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

Os dados da tabela 5 correspondem à média e desvio padrão das medições efetuadas em preparados histológicos de 5 (D7), 6 (D14) e 5 (D28) animais do grupo controle e 5 (D7, D14 e D28) do grupo lodenafil.

Na análise intergrupos, constatou-se que a densidade de colágeno tipo I verificada no grupo lodenafil foi significativamente menor que a observada no grupo controle com 28 dias de consolidação óssea (**P = 0,0028).

Embora tenha sido observado uma intenção de aumento da média da porcentagem de colágeno tipo I nas corticais do calo ósseo do grupo tratado com lodenafil em relação ao grupo controle com 7 e 14 dias de tempo de consolidação, não foi estatisticamente significativo.

Ademais, nas comparações dentro do mesmo grupo, verificou-se que, no grupo lodenafil, a densidade de colágeno tipo I no período de consolidação de 28 dias foi significativamente menor que a observada nos períodos de 7 (+++P < 0,001) e 14 (+++P < 0,001) dias de consolidação. No grupo controle, embora a diferença não seja estatisticamente significativa, observa-se que há aumento da média da densidade de colágeno tipo I na porção cortical do fêmur próximo a fratura nos tempos de 7 e 28 dias de consolidação óssea quando comparado ao tempo de 14 dias, como pode ser observado na [figura 14](#).

Observa-se linearidade decrescente no grupo lodenafil das médias da densidade de colágeno tipo I quando comparado os tempos de 7, 14 e 28 dias de consolidação óssea.

TABELA 5 – 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 lodenafil nos três tempos estudados (7, 14 e 28 dias de consolidação).

Tempo de consolidação (dias)	Controle		Lodenafil		Significância (intergrupos)
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	
7	59,38	18,34	64,43	8,06	P=0,5879
14	42,82	18,15	55,20	6,22	P=0,1821
28	53,83	17,96	17,41†	6,74	P=0,0028
Significância (intragrupo)	F=1,1987	P=0,3328	F=62,4901	P<0,0001	

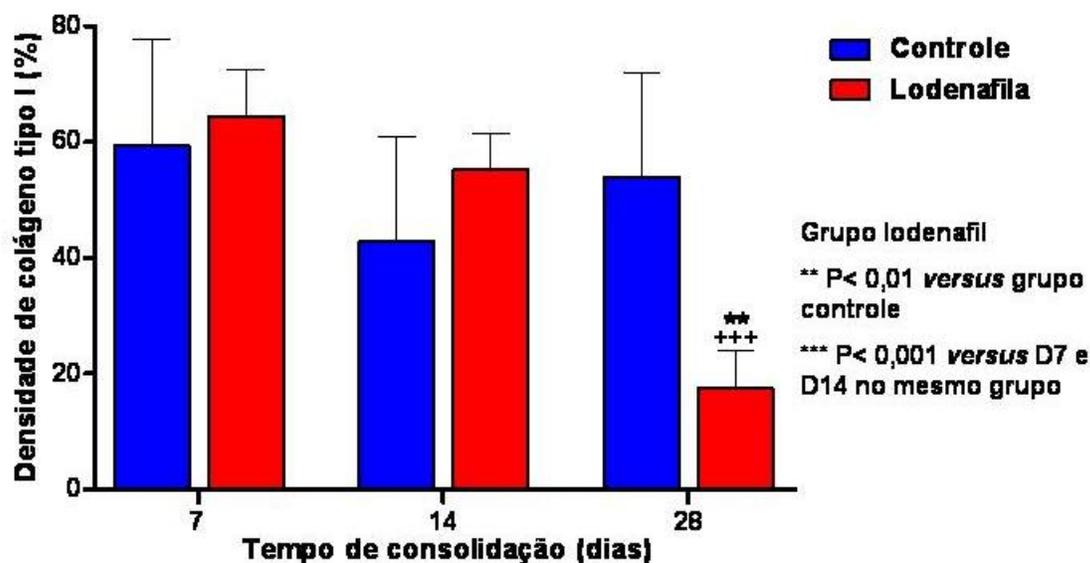


FIGURA 14 – Densidade de colágeno tipo I, expressa em termos percentuais, mensurada na porção cortical do fêmur próximo a fratura nos grupos controle e lodenafil nos dias 7, 14 e 28 de consolidação óssea. Os dados correspondem à média e desvio padrão.

4.2.3 Densidade de colágeno tipo III no calo ósseo

Os dados apresentados na tabela 6 correspondem à média e desvio padrão das medições efetuadas em preparados histológicos de 5 (D7), 6 (D14) e 5 (D28) animais do grupo controle e 5 (D7, D14 e D28) ratos do grupo lodenafil.

Na análise intergrupos, não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos de tratamento em nenhum dos tempos, embora tenha sido observado uma tendência ao decréscimo nos valores referentes ao grupo tratado com lodenafil em relação ao grupo controle nos períodos de 7 e 14 dias de consolidação e ao aumento destes valores no período de 28 dias.

Não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes entre os tempos estudados dentro do mesmo grupo (FIGURA 15).

Na análise entre os tempos dentro de um mesmo grupo, observa-se no grupo controle, uma tendência a diminuição da média da densidade de colágeno tipo III no calo ósseo no tempo de 7 dias de consolidação óssea quando comparado aos tempos de 14 e 28 dias. Quando se compara o tempo de 14 dias em relação ao de 28 dias, observa-se uma tendência ao decréscimo desta densidade de colágeno, não havendo diferença estatisticamente significativa.

Observando o grupo lodenafil, nota-se que a média da densidade de colágeno tipo III é menor, tanto quando comparado os tempos de 7 e 14 dias de consolidação óssea, quanto quando se compara os tempos de 14 e 28 dias de consolidação óssea. Havendo uma linearidade crescente na figura 15.

TABELA 6 – Valores da média e desvio padrão da densidade de colágeno tipo III no calo ósseo referentes às medições efetuadas nos animais dos grupos controle e lodenafil nos três tempos estudados (dias 7, 14 e 28).

Tempo de consolidação (dias)	Controle		Lodenafil		Significância (intergrupos)
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	
7	2,06	2,13	1,57	1,44	P=0,6814
14	2,57	1,95	2,09	2,45	P=0,7221
28	1,14	1,05	2,13	3,07	P=0,5157
Significância (intragrupo)	F=0,8767	P=0,4394	F=0,0847	P=0,9194	

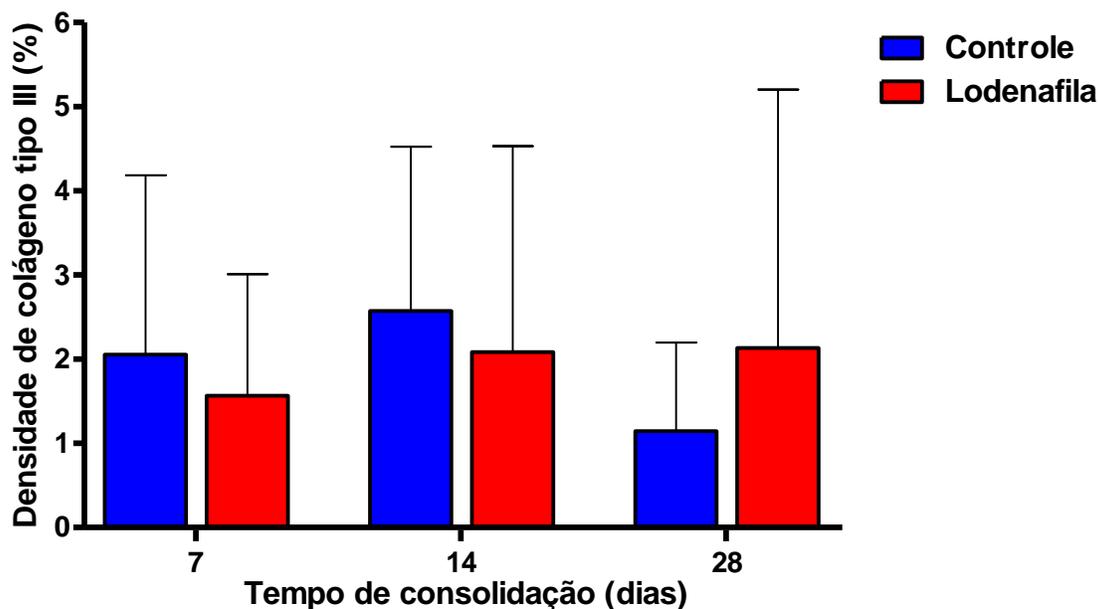


FIGURA 15 – Densidade de colágeno tipo III, expressa em termos percentuais, mensurada no calo ósseo nos grupos controle e lodenafil nos dias 7, 14 e 28 de consolidação óssea. Os dados correspondem à média e desvio padrão das medições efetuadas em preparados histológicos.

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

A tabela 7 apresenta os dados correspondentes à média e desvio padrão das medições efetuadas em preparados histológicos de 5 (D7), 6 (D14) e 5 (D28) animais do grupo controle e 5 (D7, D14 e D28) ratos do grupo lodenafil.

Observa-se uma tendência a diminuição da média do grupo tratado com carbonato de lodenafil em relação ao grupo controle nos três tempos de consolidação óssea estudados, embora na análise entre estes grupos, não tenham sido constatadas diferenças estatisticamente significantes em nenhum dos tempos.

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

No grupo controle, pode-se observar uma tendência ao aumento da densidade do colágeno tipo III na cortical do fêmur próxima a área da fratura no tempo de 14 dias, em relação aos tempo de 7 e 28 dias de consolidação óssea, assim como no grupo lodenafila ([FIGURA 16](#)).

TABELA 7 – 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 lodenafil nos três tempos estudados (dias 7, 14 e 28).

Tempo de consolidação (dias)	Controle		Lodenafil		Significância (intergrupos)
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	
7	2,65	1,52	1,60	1,54	P=0,3091
14	5,06	4,96	4,14	4,14	P=0,7512
28	3,48	3,97	2,90	2,80	P=0,7963
Significância (intragrupo)	F=0,5513	P=0,5891	F=0,8861	P=0,4376	

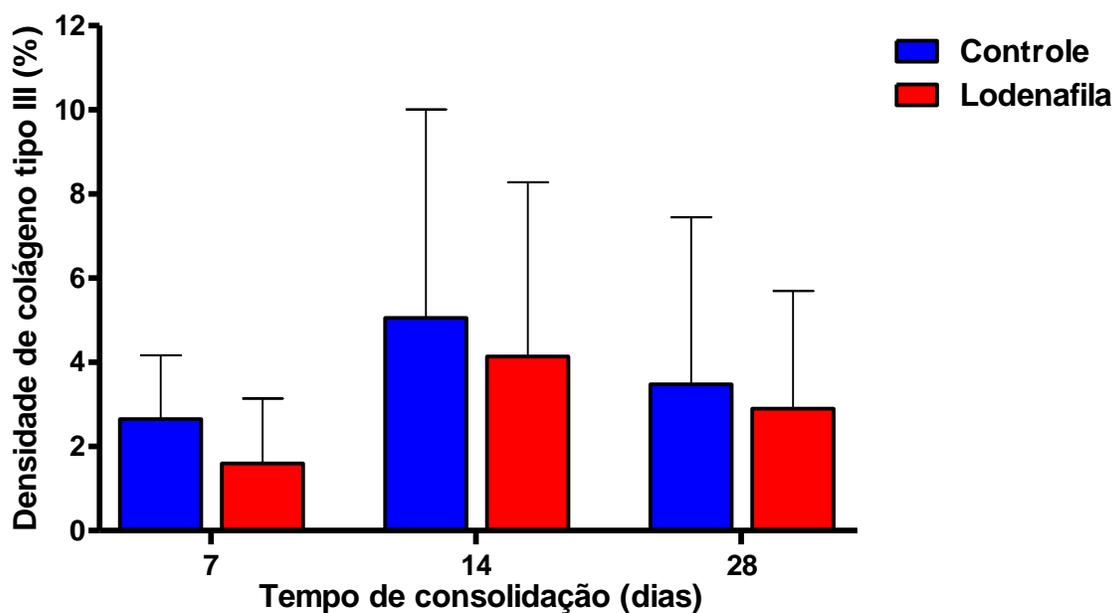


FIGURA 16 – Densidade de colágeno tipo III, expressa em termos percentuais, mensurada na porção cortical próxima à fratura do fêmur nos grupos controle e lodenafil nos dias 7, 14 e 28 de consolidação óssea. Os dados correspondem à média e desvio padrão das medições efetuadas em preparados histológicos.

5 DISCUSSÃO

Este estudo foi realizado para verificar os efeitos do carbonato de lodenafil no processo de consolidação óssea nos fêmures de ratos reduzidos com fio de Kirschner. É um modelo experimental inédito, não tendo sido encontrado nenhum estudo que tenha testado inibidores da fosfodiesterase tipo 5 na consolidação óssea.

Akgül e Alemdaroğlu (2008) levantaram a hipótese que os inibidores da fosfodiesterase podem exercer efeitos sobre a consolidação óssea, atuando nos mecanismos desencadeados pelo óxido nítrico que culminam na ativação do monofosfato de guanosina cíclico, que promove um relaxamento da musculatura lisa das paredes dos vasos.

O carbonato de Lodenafile foi o fármaco escolhido porque, embora seja novo no mercado e não haja muitas pesquisas relacionadas a este medicamento, ele é análogo ao sildenafil, uma droga já bastante estudada, o que dá embasamento científico para comparações.

A técnica de redução da fratura, o fio de Kirshner foi selecionado por se aproximar das hastes intramedulares usadas em humanos, o que permite a deambulação e reduz o índice de não consolidação. Esta técnica também foi utilizada por Azuma *et al.* (2001), estudo que avaliou os efeitos do ultra-som pulsado de baixa intensidade na consolidação óssea e por Kupczik *et al.* (2009).

Os animais selecionados foram os ratos Wistar, por serem animais de pequeno porte, de fácil aquisição e padronização no que diz respeito à idade, peso, estado de saúde, alojamento, alimentação, cuidados com a limpeza, manipulação, resistência a infecções e por apresentarem um baixo índice de mortalidade. Optou-se pelo sexo masculino por não haver variações hormonais, em relação às fêmeas. Dois animais neste estudo morreram antes do dia de serem sacrificados, um sem causa conhecida e o outro foi sacrificado por ter apresentado um foco de infecção no pescoço, provavelmente por algum ferimento no esôfago, na hora em que se realizou a gavagem.

O procedimento anestésico se mostrou satisfatório, pela relativa facilidade de obtenção dos fármacos, por não serem necessários cálculos complicados para a dose anestésica, por não haver necessidade de utilizar grandes volumes dos fármacos e pela facilidade de indução. Após o domínio da técnica do ato anestésico deste experimento, não houve complicações ou dificuldades. Foi utilizada a via intraperitoneal, por ser eficaz e amplamente empregada neste tipo

de animal. Não havia necessidade jejum pré-operatório, com o objetivo de proteger a condição normal da mucosa gastrointestinal e simular uma fratura, de emergência, onde os indivíduos estão alimentados. A recuperação pós-operatória foi rápida e satisfatória.

A epilação foi realizada com um aparelho de barbear elétrico, para reduzir os pelos a um tamanho que não causava danos ao procedimento cirúrgico, mas mantinha a proteção da pele do animal.

A incisão de aproximadamente 2cm na articulação do joelho do animal foi executada para inserir o fio de Kirshner de 1mm de diâmetro no canal medular do fêmur, por via retrógrada. A escolha deste modelo foi feita pela facilidade do método e obtenção do material. Houve falso trajeto do fio em dois animais, e por este motivo, eles foram excluídos do estudo.

A técnica empregada na execução da fratura foi semelhante à utilizada por Azuma *et al.* (2001) Mussi Filho *et al.* (2006) e Kupczik *et al.* (2009), que realizaram trabalhos com a guilhotina romba para realizar as fraturas na diáfise femoral. Embora a mesma técnica tenha sido aplicada a todos os animais, em três, não foi estabelecida a fratura, ou seja, quando o fêmur foi dissecado, estava intacto, sendo excluídos do estudo.

A administração do fármaco foi feita por gavagem, semelhante à utilizada por Derici *et al.* (2009), com a mesma dosagem, 10mg/kg, para o grupo tratado, pois a lodenafil é administrada em humanos por via oral. Não foi relatado no estudo a administração de placebo aos animais do grupo controle. O grupo controle não recebeu nenhum placebo, não tendo sido exposto aos mesmos níveis de estresse do grupo lodenafila, assim como no estudo realizado por Huddleston *et al.* (2000).

A escolha dos tempos de consolidação óssea foi baseada nos achados de Udupa e Prasad (1963), que dividiram em quatro fases consolidação óssea em ratos. Na primeira semana, fase fibroblástica; segunda semana, fase do colágeno; entre a terceira e quarta semanas, fase osteogênica e entre a quinta e sexta semanas ocorre a fase de remodelação óssea. Esta última fase não entrou nos tempos estudados porque o tempo estimado para consolidação da fratura em animais é de 28 dias (MÜLLER *et al.*, 2004).

O estudo radiográfico foi feito utilizando películas de mamógrafo, por ter a qualidade superior à encontrada nos aparelhos de radiografia costumeiramente utilizados para este fim, proporcionando maior nitidez e conseqüentemente melhor visualização da consolidação óssea.

Mendes *et al.* (2001) utilizaram o mesmo procedimento, embora tenham empregado outra técnica, 30mAs, 25Kv.

A análise histológica foi realizada utilizando a coloração *Picrosirius red*, coloração utilizada para avaliar a formação de colágeno (GIORDANO *et al.*, 1999). O colágeno é a proteína encontrada em maior abundância na matriz extracelular e no tecido conjuntivo (CUTTLE *et al.*, 2005; VARGAS; AUDÍ; CARRASCOSA, 1997). Existem aproximadamente 18 tipos de colágeno e sub-unidades cuja principal função é fornecer estrutura. No tecido ósseo é encontrado principalmente colágeno tipo I (VARGAS; AUDÍ; CARRASCOSA, 1997). A coloração das lâminas com *Picrosirius Red* associado à microscopia polarizada é um método barato, simples, bastante sensível e específico para marcar as fibras do colágeno, distinguindo-as em padrões de cores. As fibras de colágeno tipo I são espessas e adquirem uma coloração entre o amarelo e o vermelho. As fibras do colágeno tipo III são finas e apresentam uma cor que varia entre o verde e o amarelo esverdeado (CUTTLE *et al.*, 2005; PEREIRA, 2006). Mesquita *et al.* (2010) em seu estudo envolvendo queimaduras de pele em animais, utilizou a mesma análise, com objetivo de quantificar a deposição de colágeno.

Embora a maioria dos estudos pesquisados utilize a análise radiológica e histológica na avaliação dos fármacos na consolidação óssea em modelos experimentais em ratos, alguns utilizam outros meios de avaliação destes efeitos, distintos dos utilizados neste estudo, tais como avaliação clínica (GIORDANO, *et al.*, 1999) e análise biomecânica (MÜLLER *et al.*, 2004).

Por ser um trabalho original, não existem outros estudos envolvendo este fármaco na consolidação óssea, entretanto vários estudos envolvendo modelos experimentais em ratos vem sendo realizados com objetivo de avaliar os efeitos de diversos fármacos na consolidação óssea.

Giordano, *et al.* (1999) realizou um estudo experimental em animais para avaliar os efeitos da enoxaparina, uma heparina de baixo peso molecular, na formação de calo ósseo. As tíbias eram fraturadas manualmente nas diáfises e após vinte e quatro horas era iniciado o uso da enoxaparina sódica na dose de 0,857 miligramas (mg) por kg de peso por dia (0,3mg/dia), dividida em duas vezes. Após 1, 2, 3 e 6 semanas os animais foram sacrificados. Foram realizadas avaliações clínica, laboratorial, radiográfica e histológica, concluindo que a enoxaparina estimulou a formação do calo em suas fases intermediárias.

Utilizando a mesma droga, enoxaparina, Mussi Filho *et al.* (2006) realizaram um estudo experimental dos seus efeitos na formação de calo ósseo em fêmures de ratos. Os fêmures

foram fraturados com guilhotina romba, após ter sido introduzido fio de Kirschner para fixação. Os animais do grupo tratado recebiam diariamente enoxaparina subcutânea (1mg/Kg) desde o ato cirúrgico até o sacrifício, que ocorria 28 dias após a fratura. Após as análises macroscópica e histológica, concluiu-se que a enoxaparina não influenciou o processo de formação de calo ósseo em fraturas de fêmures em ratos.

Mendes *et al.*, 2001 avaliaram a consolidação da fratura após o uso prolongado de corticóides. Os animais do grupo tratado, receberam doses diárias de hidrocortisona, via subcutânea (0,4/100g). Após 30 dias, as fraturas da tíbia e fíbula foram provocadas manualmente. Os animais foram sacrificados com 3, 7, 14, 21 e 35 dias após a fratura. Realizaram estudos histológico e radiográfico, concluindo que o hidrocortisona promove um certo retardo na consolidação óssea.

Müller *et al.* (2004) concluíram que houve retardo na consolidação óssea no grupo de animais tratados com diclofenaco sódico em relação ao grupo controle em um estudo experimental em animais submetidos a fratura aberta de tíbia. O calo ósseo dos animais tratados com diclofenaco sódico teve suas propriedades mecânicas alteradas, diminuindo a carga máxima e a rigidez e aumentando a deformação. A administração da droga foi via intramuscular, dose única diária por 28 dias. Foi realizada análise clínica observando peso semanal, comportamento dos animais e eventual presença de complicações e a análise biomecânica.

Castro *et al.* (2006) avaliaram radiologicamente e histologicamente o processo de consolidação óssea em ratos tratados com acetaminofen. Eram realizadas fraturas da tíbia e da fíbula manualmente e os animais do grupo tratado recebiam por gavagem diariamente acetaminofen (42mg/kg). Os animais eram sacrificados ao final da primeira, segunda, quarta e sexta semanas após a indução da fratura. Após a análise dos resultados, concluíram que o fármaco não interfere no processo de consolidação óssea.

A influência da ciprofloxacina na resistência do calo ósseo foi verificada em um modelo experimental em ratos Wistar machos submetidos a fratura padronizada de fêmur, por meio de análise radiográfica e estudo mecânico da força de flexão de três pontos (KUPCZIK *et al.*, 2009). Doze horas após o procedimento cirúrgico, foi administrado na dose de 50mg/kg, de 12 em 12h, durante seis semanas, quando os animais eram sacrificados. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa do grupo tratado com a ciprofloxacina em relação ao grupo controle.

No estudo radiográfico observando a densidade óptica, nota-se um decréscimo relativo na média desta densidade no tempo de 28 dias de consolidação óssea tanto para o grupo tratado quanto para o grupo controle, o que diverge do resultado encontrado por Udupa e Prasad (1963), que concluíram que a partir da terceira semana, há calcificação da substância intercelular da região da fratura.

Adams e Hamblen (1994) descrevem que no quinto estágio das fraturas, que ocorre no final da consolidação óssea, o calo ósseo aumenta de tamanho, formando anel bulboso ao redor no foco de fratura. Os resultados encontrados estão de acordo com esta descrição, em que o calo ósseo no tempo de 28 dias é significativamente maior que o observado nos demais tempos, tanto para o grupo lodenafil quanto para o grupo controle.

A densidade de colágeno tipo I diminuiu de forma relativa no tempo de 14 dias de consolidação em relação aos demais tempos estudados no calo ósseo. Na região cortical próxima a fratura, também houve um decréscimo da densidade do colágeno tipo I no tempo de 14 dias de consolidação óssea, comparado ao tempo de 7 dias. Estes achados diferem dos resultados encontrados por Udupa e Prasad (1963), que afirmaram em seu estudo que na segunda semana observa-se a fase do colágeno na consolidação óssea, onde a lacuna existente entre os fragmentos da fratura é preenchida por fibras de colágeno. Na terceira e quarta semanas, deve haver uma diminuição das fibras de colágeno tipo I, pois estas são substituídas por condroblastos e osteoblastos (UDUPA; PRASAD, 1963). Verifica-se esta redução no grupo tratado com carbonato de lodenafil no calo ósseo e na região cortical próxima a fratura, onde este decréscimo foi estatisticamente significativo, quando comparado ao tempo de 14 dias.

Ao contrário do que foi observado no colágeno tipo I, a densidade do colágeno tipo III aumentou no grupo controle no tempo de 14 dias de consolidação óssea em relação aos demais tempos estudados dentro do mesmo grupo, tanto no calo ósseo quanto na região cortical próxima a fratura, em acordo com o descrito por Udupas e Prasad (1963).

Esperava-se que o carbonato de lodenafil, por ser um vasodilatador, ajudasse no processo de consolidação óssea, no entanto, quando analisada a densidade de colágeno tipo I na região cortical próximo à fratura, pode-se observar que esta densidade diminuiu de maneira estatisticamente significativa, comparando o grupo lodenafil ao grupo controle no tempo de 28 dias de consolidação óssea. Este fato não é suficiente para afirmar que o fármaco influencia no processo de consolidação óssea, pois há vários outros parâmetros que foram avaliados, sem

resultados estatisticamente significantes, talvez por a amostra ser pequena, ou não ter havido padronização do local da fratura, ocorrendo uma alta variabilidade dos dados. No entanto, este resultado indica que pesquisas devem ser desenvolvidas, abordando este tema sobre outros aspectos.

Os resultados não foram definitivos, este trabalho pode ser melhorado e pode ter prosseguimento. Estudos futuros serão necessários para haver um maior conhecimento a respeito do novo fármaco utilizado, um teste de resistência do calo ósseo poderia ser empregado, a fim de saber se o calo ósseo dos animais tratados com o medicamento tem o mesmo torque dos fêmures dos animais que não receberam o mesmo tratamento. Novos trabalhos poderão pesquisar doses do medicamento, com períodos variáveis e diferentes formatos de quantificação do calo ósseo, com aumento do número de animais. Além disso, um aparelho de raios-X portátil poderia verificar no pós-operatório imediato se houve falso trajeto do fio, se houve fratura e se ocorreu no terço médio da diáfise femoral. Poderia ainda ser administrada por gavagem água destilada aos animais do grupo controle, para ambos os grupos serem submetidos ao mesmo nível de estresse.

6 CONCLUSÃO

Concluiu-se que o carbonato de lodenafil na dose utilizada não influenciou no processo de consolidação óssea em fraturas de fêmures de ratos tratados com osteossíntese intramedular com fio de Kirshner.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, J.C.; HAMBLEM, D.L. **Manual de fraturas**. Artes Médicas: São Paulo, 1994. 313p.
- AKGÜL, T.; ALEMDAROĞLU, B. Phosphodiesterase 5 inhibitors may facilitate bone fracture recovery. **Med Hypotheses**. v. 70, n.2, p. 461-462, 2008
- ALBUQUERQUE, D.C.; MIZIARA, L.J.; SARAIVA, J.F.K.; RODRIGUES, U.S.; RIBEIRO, A.B.; WAJNGARTEN, M. Efficacy, safety and tolerability of sildenafil in Brazilian hypertensive patients on multiple antihypertensive drugs. **Int Braz J Urol**. v. 31, n.4, p. 342-353, 2005.
- ALTABAS, K.; ALTABAS, V.; BERKOVIĆ, M.C.; ROTKVIĆ, V.Z. From cellulite to smooth skin: is Viagra the new dream cream? **Med Hypotheses**. v. 73, p. 118-119, 2009
- ARMITAGE, P.; BERRY, G. **Statistical methods in medical research**. 3. ed. Oxford: Blackwell, 1994. 620 p.
- ATHANAZIO, R.A.; FREITAS, D.M.; ALMEIDA, D.B.; DANTAS, N.; REIS, F. Resposta pressórica de pacientes com miocardiopatia chagásica ante o uso do sildenafil. **Arq Bras Cardiol**. v. 88, n. 3, p 367 – 370, 2006.
- 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. **Journal Of Bone And Mineral Research**. v. 16, n. 4, p 371-380, 2001.
- BARRETO, A.C.; FRANCHI, S.M.; PEREIRA, A.C.; LOPES, A.A. Hipertensão arterial pulmonar. Fisiopatologia, aspectos genéticos e resposta ao uso crônico do sildenafil. **Arq Bras Cardiol**. v. 85, n.2, p 157 -171, 2005.
- BARRETO, R.L.; CORREIA, C.R.D.; MUSCARÁ, M.N. Óxido nítrico: propriedades e potenciais usos terapêuticos/Nitric oxide: properties and therapeutic use. **Quím. Nova**. v.28, n.6, 2005
- BECKER, A.J.; ÜCKERT, S.; STIEF, C.G. The basics of phosphodiesterase type 5 (PDE5) inhibition in urology. **Der Urologe A**. v. 47, n. 12, p. 1582-1587, 2008

BENTLIN, M.R.; SAITO, A.; LUCA, A.K.C.; BOSSOLAN, G.; BONATTO, R.C.; MARTINS, A.S.; RUGOLO, L.M.S.S. sildenafil no tratamento da hipertensão pulmonar após cirurgia cardíaca. **J Pediatr.** v. 81, n. 2, p 175 – 178, 2005.

CAIROLI, C.; CAMPOS, R.M. Farmacodinâmica e farmacocinética dos inibidores da fosfodiesterase tipo 5 (PDE5). **Int Braz J Urol.** v. 31, p 17 – 20, 2005.

CASTRO, P. C. F.; HOSHINO, A.; BRITO, R. B. DIAS JÚNIOR, L. B.; BRITO, J.A. F.; BARROS, R. S.M.; SANTILI, C. Estudo do processo de consolidação óssea em ratos tratados com acetaminofen: avaliações radiográfica e histológica / Study of bone healing in rats treated with acetaminophen: radiographic and histological evaluations. **Rev. bras. Ortop.** v.40, n.10, p. 614-620, 2006.

CERQUEIRA, N.F.; YOSHIDA, W.B. Óxido nítrico: revisão. **Acta Cir Bras.** v. 17, n.6, 2002.

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

DERICI, H.; KAMER, E.; UNALP, H.R.; DINIZ, G.; BOZDAG, A.D.; TANSUG, T.; ORTAC, R.; ERBIL, Y. Effect of sildenafil on wound healing: an experimental study. **Langenbecks Arch Surg.** [Epub ahead of print], 2009.

DIWAN, A.D.; WANG, M.X.; JANG, D.; ZHU, W.; MURRELL, G.A. Nitric oxide modulates fracture healing. **J Bone Miner Res.** V. 15, N.2, P.342-51, 2000.

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.

FREITAS, V.M.; MENEZES, F.G.; ANTONIALLI, M.M.S; NASCIMENTO, J.W.L. Frequência de uso de inibidores de fosfodiesterase-5 por estudantes universitários. **Rev Saúde Públ.** v. 42, n. 5, p. 965-967, 2008.

FRIES, R.; SHARIAT, K.; WILMOWSKY, H. Sildenafil in the treatment of Raynaud`s phenomenon resistant to vasodilatory therapy. **Circulation.** v. 112, p. 2980-2985, 2005.

GIAMI, A. Permanência das representações do gênero em sexologia: as inovações científica e médica comprometidas pelo esteriótipo de gênero. **Physis: Revista de Saúde Coletiva**. v.17, n. 2, p 301 – 320, 2007

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

GLINA, S.; TOSCANO, I.; GOMATZKY, C.; DE GÓES, P.M.; JÚNIOR, A.N.; CLARO, J.F.; PAGANI, E. Efficacy and tolerability of Lodenafil carbonate for oral therapy in erectile dysfunction: a phase II clinical trial. **J Sex Med**. v. 6, n. 2, p. 553-557, 2009.

GRAÇA, J.R.; MACEDO, G.M.; PALHETA JR., R.C.; GONDIM, F.A.; NOGUEIRA, R.O.; CORREIA, J.M.; ROLA, F.H.; OLIVEIRA, R.B.; SOUZA, M.A.; SANTOS, A.A. Sildenafil delays the intestinal transit of a liquid meal in awake rats. **Braz J Med Biol Res**. V.41, p 78-81, 2008

GUIMARÃES, A.C.; MALACHIAS, M.V.B.; COELHO, O.R.; ZILLI, E.C.; LUNA, R.L. Uso do sildenafil em pacientes com doença cardiovascular. **Arq Bras Cardiol**. v. 73, n. 6, p 515 – 520, 1999.

HALCOX, J; NOUR,K; ZALOS, G. The effect of sildenafil on human vascular function, platelet activation and myocardial ischemia. **J Am Coll Cardiol**. v. 40, p. 1232-1240, 2002.

HUDDLESTON, P.M.; STECKELBERG, J.M.; HANSEN, A.D.; ROUSE, M.S.; BOLANDER, M.E.; PATEL, R. Ciprofloxacin inhibition of experimental fracture-healing. **J Bone Joint Surg Am**. v.82, p.161-73, 2000.

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

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

KURAHASHI, A.; NASCIMENTO, M.; MARCONDES, A. M.; MACCHIAVERNI FILHO, N.; BARACAT, J.; COSTA, V.P. Estudo da circulação retrobulbar e do campo visual após dose única de citrato de sildenafil (Viagra®). **Arq Bras Oftalmol.** v. 64, p 341 – 345, 2001.

LATIES, A.; ZRENNER, E. Viagra (sildenafil citrate) and ophthalmology. **Prog Retin Eye Res.** v. 21, n.5, p.485-506, 2002.

LORENZETTI, R. **Método de quantificação de nucleotídeos por HPLC-MS/MS e avaliação da atividade de análogos de sildenafil sobre a fosfodiesterase**, 2007, 100p. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

LONZETTI, L.S.; KRÜGER, F.D.; MORANDI, P.; LOPES, M.L.L.; TOURINHO, T.F. Necrose digital em pacientes com lúpus eritematosos sistêmico e esclerose sistêmica tratada com inibidores da fosfodiesterase. **Rev Bras Reumatol.** v. 48, n. 5, p.306-308, 2008.

LUCIO, L.A.G.; PAGANI, E.; AFIUNE, J.B. Carbonato de lodenafil no tratamento da disfunção erétil. **Rev Bras Med.** v. 64, n. 9, p. 426-432, 2007.

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

MORAES, F.B. **Avaliação epidemiológica e radiológica das fraturas diafisárias do fêmur: estudo de 200 casos**, 2007, 90p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde. Universidade de Brasília, Convênio Rede Centro-Oeste (UnB, UFG, UFMS), Brasília.

MORAES, F.B.; SILVA, L.L.; FERREIRA, F.V.; FERRO, A.M.;ROCHA, V.L.; TEIXEIRA, 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. 386 p.

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.

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

PAEZ, R.P.; ARAÚJO, W.F.; HOSSE JUNIOR, N.A.; NEVEZ, A.L.; VARGAS, G.F.; AGUIAR, L.F.; BRANCO, J.N.R.; CATANI, R.; BUFFOLO, E. Sildenafil melhora a função ventricular direita no receptor de transplante cardíaco. **Arq. Bras. Cardiol.** v.84, n.2, p. 176-178, 2005.

PENA, C.B. **Associação do carbonato de lodenafil (Helleva) e treinamento físico na ereção peniana de ratos**, 2009, 87p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

PEREIRA, M.C. **Efeito da mitomicina c tópica sobre os depósitos de colágeno total na submucosa das pregas vocais íntegras de suínos**. 2006, 62p. Dissertação (Mestrado em Clínica Cirúrgica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

RICACHINEVSKY, C.P.; AMANTÉA, S.L. Manejo farmacológico da hipertensão arterial pulmonar. **J Pediatr.** v. 82, n. 5, p. 153-165, 2006.

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.

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

SHINLAPAWITTAYATORN, K.; CHATTIPAKORN, S.; CHATTIPAKORN, N. Effect of sildenafil citrate on the cardiovascular system. **Braz J Med Biol Res.** v. 38, n. 9, p 1303-1311, 2005.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE UROLOGIA. Disfunção erétil: tratamento com drogas inibidoras da fosfodiesterase tipo 5. **Rev Assoc Med Bras.** v. 53, n. 2, p. 95-107, 2007.

SOLIS, A.A.; BETHANCOURT, J.A.; BRITTON, G.B. Chronic sildenafil (Viagra) administration reduces anxiety in intact and castrated male rats. **Psicothema**. v. 20, n.4, p.812-817, 2008.

SUAID, H.J.; COLOGNA, A.J.; MARTINS, A.C.P.; TUCCI JR., S.; RODRIGUES, A.A.; DIAS NETO, J.A. A ação do citrato de sildenafil sobre a função uretral de ratas com deservação cervical. **Acta Cir Bras**. v.18, n.5, p. 27-29, 2003.

TAKASAKI, A.; TAMURA, H.; MIWA, I.; TAKETANI, T.; SHIMAMURA, K.; SUGINO, N. Endometrial growth and uterine blood flow: a pilot study for improving endometrial thickness in the patients with a thin endometrium. **Fertil Steril**. [Epub ahead of print], 2009.

TOQUE, H.A.; TEIXEIRA, C.E.; LORENZETTI, R.; OKUYAMA, C.E.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G. Pharmacological characterization of a novel phosphodiesterase type 5 (PDE5) inhibitor Lodenafil carbonate on human and rabbit corpus cavernosum. **Eur J Pharmacol**. v. 591, n. 1-3, p 189 -195, 2008.

UDUPA, K.N.; PRASAD, G.C. Chemical and histochemical studies of organic constituents in fracture repair in rats. **J Bone Joint Surg**. v.45, p. 770-779, 1963.

UTHAYATHAS, S.; KARUPPAGOUNDER, S.S.; TAMER, S.I.; PARAMESHWARAN, K.; DEGIM, T.; SUPPIRAMANIAM, V.; DHANASEKARAN, M. Evaluation of neuroprotective and anti-fatigue effects of sildenafil. **Life Sci**. v. 81, n. 12, p. 988-992, 2007.

VARGAS, D.M.; AUDÍ, L.; CARRASCOSA, A. Peptídeos derivados do colágeno: novos marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo. **Rev. Assoc. Med. Bras**. v.43, n.4, p.367-370, 1997.

ANEXO 1 – Declaração de aprovação do Comitê de Ética Animal



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

DECLARAÇÃO

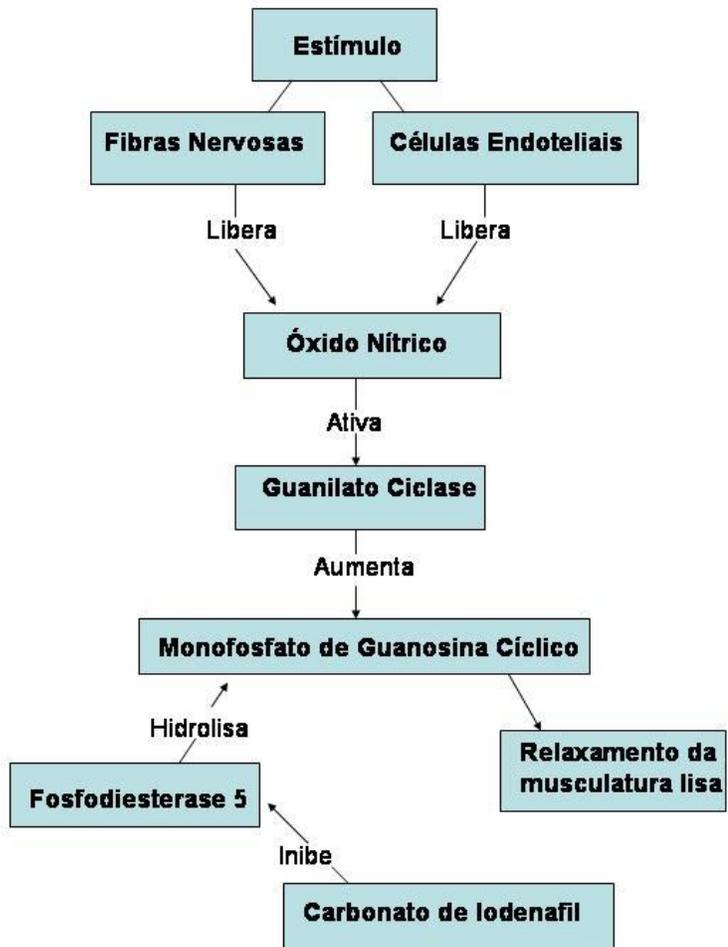
Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 52/09, sobre o projeto intitulado: **“EFEITOS DO CARBONATO DE LODENAFILA NA CONSOLIDAÇÃO DE FRATURAS DA DIÁFISE DE FÊMURES DE RATOS TRATADOS COM HASTE INTRAMEDULAR**, de responsabilidade de *GISELE FAÇANHA DIÓGENES TEIXEIRA* e está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

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

Fortaleza, 01 de outubro de 2009.

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

APÊNDICE 1 - Mecanismo de ação do Inibidor da Fosfodiesterase 5 (carbonato de lodenafil).



APÊNDICE 2 – Dados Brutos da pesquisa

Animal	Grupo	Tempo	Peso	Col.III Corticais	Col. I Calo	Col. I Corticais	Col. I Calo	Densidade óptica	Área do calo
1	Controle	7	315g	4,43	1,37	61,34	21	77,09	1,42
2	Controle	7	305g	2,89	0,47	76,26	46,04	94,84	4,77
3	Controle	7	285g	1,31	2,06	36,69	17,99	71,99	6,72
4	Controle	7	290g	3,73	0,68	44,94	24,65	Excluído	Excluído
5	Controle	7	385g	0,9	5,7	77,65	13,46	71,06	8,09
6	Controle	7	355g	Excluído	Excluído	Excluído	Excluído	Excluído	Excluído
1	Lodenafil	7	375g	2,33	1,09	65,13	32,67	83,08	1,2
2	Lodenafil	7	400g	1,37	3,16	59,51	22,07	Excluído	Excluído
3	Lodenafil	7	305g	Excluído	Excluído	Excluído	Excluído	Excluído	Excluído
4	Lodenafil	7	345g	0,02	0,03	77,15	29,37	50,3	1,53
5	Lodenafil	7	370g	0,43	0,53	64,52	22,57	70,3	0,98
6	Lodenafil	7	340g	3,85	3,02	55,86	26,86	84,82	5,16
1	Controle	14	385g	1,75	0,13	58,38	40,43	102,22	20,23
2	Controle	14	280g	1,83	1,4	61,48	29,62	78,41	8,66
3	Controle	14	330g	0,84	4,04	50,63	32,8	88,96	22,95
4	Controle	14	410g	3,26	1,04	45,21	27,2	106,36	15,77
5	Controle	14	350g	12,3	3,92	19,65	7,7	104,73	21,39
6	Controle	14	350g	10,35	4,9	21,54	8,7	101,8	25,77
1	Lodenafil	14	270g	1,46	0,09	45,31	25,78	108,67	10,54
2	Lodenafil	14	240g	10,28	3	56,55	24,8	87,15	8,17
3	Lodenafil	14	260g	0,43	0,25	62,39	36,71	93,4	19,34
4	Lodenafil	14	260g	2,05	1,15	56,97	17,58	62,26	16,64
5	Lodenafil	14	290g	Excluído	Excluído	Excluído	Excluído	Excluído	Excluído
6	Lodenafil	14	385g	6,49	5,94	54,79	22,91	105,13	17,41
1	Controle	28	410g	5,06	0,27	39,88	20,23	74,73	36,94
2	Controle	28	385g	9,73	1,45	51,67	33,03	101,45	38,11
3	Controle	28	355g	0,31	0,91	82,16	23,26	87,58	17,1
4	Controle	28	400g	1,69	2,81	37,39	25,17	97,9	35,88
5	Controle	28	450g	0,6	0,28	58,04	38,62	105,78	42,17
6	Controle	28	480g	Excluído	Excluído	Excluído	Excluído	Excluído	Excluído
1	Lodenafil	28	315g	1,7	0,03	26,6	36,76	Excluído	Excluído
2	Lodenafil	28	350g	2,34	1,24	16,84	9,93	Excluído	Excluído
3	Lodenafil	28	345g	1,07	1,63	21,38	33,89	67,18	27,55
4	Lodenafil	28	350g	1,54	0,26	11,98	23,81	101,03	39,78
5	Lodenafil	28	355g	Excluído	Excluído	Excluído	Excluído	109,8	43,94
6	Lodenafil	28	405g	7,84	7,5	10,23	10,8	69,98	20,66

