

LINCOLN PAIVA COSTA

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA MEMBRANA
DE QUITOSANA IMPREGNADA OU NÃO
COM CIPROFLOXACINO NA PROFILAXIA
DA OSTEOMIELEITE EM FRATURAS EXPOSTAS:
ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS.**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

BELO HORIZONTE

2014

LINCOLN PAIVA COSTA

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA MEMBRANA DE QUITOSANA IMPREGNADA OU NÃO COM CIPROFLOXACINO NA PROFILAXIA DA OSTEOMIELEITE EM FRATURAS EXPOSTAS: ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS.

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e Oftalmologia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Profa. Dra. Ivana Duval Araújo

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Eduardo Moreira
Teixeira

Área de Concentração: Resposta inflamatória à
agressão tecidual

Linha de Pesquisa: Inflamação e infecção

Belo Horizonte

2014

C837a Costa, Lincoln Paiva.
Avaliação da eficácia da membrana de quitosana impregnada ou não com ciprofloxacino na profilaxia da osteomielite em fraturas expostas [manuscrito]: estudo experimental em ratos. / Lincoln Paiva Costa. - - Belo Horizonte: 2014.
56f.: il.
Orientador: Ivana Duval Araújo.
Coorientador: Luiz Eduardo Moreira Teixeira.
Área de concentração: Ciências Aplicadas à Cirurgia e Oftalmologia.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.
1. Fraturas Expostas. 2. Osteomielite/prevenção & controle. 3. Anti-Infeciosos. 4. Quitosana/uso terapêutico. 5. Ciprofloxacino/uso terapêutico. 6. Epidemiologia Experimental. 7. Dissertações Acadêmicas. I. Araújo, Ivana Duval. II. Teixeira, Luiz Eduardo Moreira. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.
NLM: WE 182

AUTORIDADES

Prof. Dr. Clélio Campolina Diniz

Reitor

Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez

Pró-Reitor de Pós-Graduação

Prof. Dr. Francisco José Penna

Diretor da Faculdade de Medicina

Prof. Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha

Coordenador do Centro de Pós-Graduação

Prof. Dr. Marcelo Dias Sanches

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia

Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia

Prof. Dr. Alcino Lázaro da Silva

Profa. Dra. Ivana Duval de Araújo

Prof. Dr. Marcelo Dias Sanches

Prof. Dr. Márcio Bittar Nehemy

Prof. Dr. Renato Santiago Gomes

Prof. Dr. Tarcizo Afonso Nunes

Sumara Marques Barral

– Representante Discente

LINCOLN PAIVA COSTA

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA MEMBRANA DE QUITOSANA IMPREGNADA OU NÃO COM CIPROFLOXACINO NA PROFILAXIA DA OSTEOMIELEITE EM FRATURAS EXPOSTAS: ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS.

Dissertação apresentada e defendida perante a comissão examinadora em 31 de março de 2014, constituída pelos professores:

Profa. Dra. Ivana Duval de Araújo (orientadora)

Prof. Dr. Luiz Eduardo Moreira Teixeira (co-orientador)

Prof. Dr. Ubiratan Bruno de Castro

Prof. Dr. Carlos Roberto Galia

Resultado: Aprovado

*À meus queridos pais
Antônio Lincoln e
Sandra e à minha
esposa Eliza.*

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Ivana Duval Araújo, orientadora e pesquisadora exemplar.

Ao Prof. Dr. Luiz Eduardo Moreira Teixeira amigo e tutor de todas as horas.

Aos residentes Gustavo Silame Maranhão Lima, Marcelo Mendes Ferreira, Mateus Antunes de Andrade que muito colaboraram na parte experimental deste trabalho.

À Profa. Dra. Paula Vieira Teixeira Vidigal pesquisadora colaboradora no estudo histopatológico.

Ao Prof. Dr. André Augusto Gomes Faraco pesquisador colaborador responsável pela preparação das membranas de quitosana.

Aos técnicos do Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Marcelo e Derly por estarem sempre disponíveis e prestativos.

Ao Mestre José Carlos Souza Vilela por me estimular e apoiar desde o início desta caminhada.

“Crê em ti mesmo, age e verás os resultados. Quando te esforças a vida também se esforça para te ajudar.”

Chico Xavier

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 1 – Aparelho para indução de fratura em guilhotina	23
Figura 2 – Pata traseira esquerda preparada para cirurgia com campos estéreis após antissepsia adequada	24
Figura 3 – Incisão longitudinal na coxa da pata traseira esquerda	24
Figura 4 – Fixação da fratura com agulha 40 X 1,2 mm (A, B)	25
Figura 5 – Inoculação bacteriana no foco de fratura	26
Figura 6 – Colocação da membrana de quitosana pura nos animais do grupo Q e impregnada com ciprofloxacino nos animais do grupo QA	27
Figura 7 – Placas evidenciando crescimento bacteriano positivo (A e B) e negativo (C)	30
Figura 8 – Figura ilustrativa do exame de antibiograma e a sensibilidade da bactéria isolada ao ciprofloxacino (seta)	31

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Parâmetros histológicos microscópicos e sistema de pontuação.	32
TABELA 2 – Comparação do peso médio dos animais dos grupos controle sem tratamento (CI), tratamento com antibióticoprofilaxia sistêmica (CT), tratamento com quitosana (Q) ou quitosana impregnada com antibiótico (QA)	34
Tabela 3 – Resultados das culturas qualitativas nos grupos sem tratamento (CI) e tratados com antibioticoprofilaxia sistêmica (CT), com membrana de quitosana (Q) ou com membrana de quitosana impregnada com ciprofloxacino (QA).	35
TABELA 4 – Grau de inflamação de fragmento ósseo por meio do sistema de pontuação de Smeltzer nos grupos controle de infecção (CI) e tratados com antibióticoprofilaxia sistêmica (CT), com quitosana (Q) ou com quitosana impregnada com antibióticos (QA).	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

UFMG	- Universidade Federal de Minas Gerais
PMMA	- Polimetilmetacrilato
CEUA	- Comitê de Ética em Uso de Animais
g	- Gramas
CT	- Grupo Controle do Tratamento
CI	- Grupo Controle de Infecção
Q	- Grupo Quitosana
QA	- Grupo Quitosana com Antimicrobiano
dp	- Desvio Padrão
mm	- Milímetro
mL	- Mililitros
UFC/mL	- Unidade Formadora de Colônia por Mililitros
BHI	- Breat Heart Infusion
°C	- Graus Celcius

ÍNDICE

RESUMO	11
ABSTRACT	13
INTRODUÇÃO	15
RELEVÂNCIA	18
OBJETIVO	19
MATERIAIS E MÉTODO	20
Animais e cuidados dispensados	20
Delineamento experimental	21
Suspensão bacteriana	21
Preparação da membrana de quitosana	21
Técnica operatória	22
Pós operatório	27
Avaliação do grau de infecção	28
Análise Estatística	33
RESULTADOS	34
Peso	34
Infecção	34
Histologia	36
DISCUSSÃO	38
CONCLUSÃO	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
ANEXO	56

RESUMO

Introdução: A incidência de fraturas expostas está crescendo e apesar da utilização de protocolos de tratamento o índice de osteomielite é alto. Um dos passos do seu tratamento é a profilaxia antimicrobiana sistêmica. A aplicação tópica de antimicrobianos é uma alternativa proporcionando alta concentração do antimicrobiano na fratura, baixa concentração sistêmica e menos efeitos colaterais. O veículo mais utilizado para este fim é o polimetilmetacrilato, que tem seu uso restrito a drogas termoestáveis e com formulação em pó, além disso, não é biodegradável. A quitosana é bioabsorvível, bactericida, permite o armazenamento e distribuição de antimicrobianos, sendo uma alternativa ao polimetilmetacrilato. **Objetivo:** avaliar a eficácia da profilaxia da osteomielite em modelo experimental de fraturas expostas com a utilização do filme de quitosana impregnado ou não com ciprofloxacino. **Materiais e Método:** foram utilizados 24 ratos Holtzman divididos em 4 grupos. Grupo CT: modelo de fratura exposta tratado com antimicrobiano sistêmico, grupo CI: modelo de fratura exposta sem tratamento, grupo Q: modelo de fratura exposta tratado utilizando membrana de quitosana, grupo QA: modelo de fratura exposta tratado utilizando membrana de quitosana impregnada com antimicrobiano. Após 3 semanas os animais foram eutanasiados com sobredose de anestésicos e o fêmur traseiro esquerdo foi retirado para análise histológica e microbiológica. A classificação histológica utilizou o sistema de Smeltzer e a análise microbiológica utilizou a cultura qualitativa com antibiograma. As comparações entre os grupos foram realizadas considerando significativos valores de $p \leq 0,05$. **Resultados:** Quanto aos resultados das culturas dos animais do grupo CT, observou-se menor positividade quando comparados com os resultados das culturas do CI ($p=0,005$), grupo Q ($p=0,005$) e grupo QA ($p=0,009$). Avaliando grau de inflamação óssea por meio do sistema

de Smeltzer observou-se diferença significativa na pontuação total dos animais do grupo CT em comparação com os animais do grupo CI ($p=0,014$) grupo Q ($p=0,001$) e grupo QA ($p=0,007$). **Conclusão:** Neste modelo experimental de fratura exposta a membrana de quitosana pura ou impregnada com ciprofloxacino não mostrou eficácia na profilaxia de osteomielite.

Palavras-chave: Fratura exposta, profilaxia, osteomielite, quitosana, ciprofloxacino

ABSTRACT

Introduction: The incidence of open fractures is increasing and even with the use of treatment protocols, the osteomyelitis rate is high. One of the steps of its treatment is systemic antimicrobial prophylaxis. Topical application of antimicrobials is an alternative providing high concentration of antimicrobial at the fracture, low systemic concentration and less side effects. The most widely used vehicle for this purpose is the polymethylmethacrylate, which has its use restricted to thermostable drugs and with powder formulation, additionally it is not biodegradable. Chitosan is biodegradable, antibacterial, and allows the storage and distribution of antibiotics, being an alternative to polymethylmethacrylate. **Objective:** evaluate the efficacy of prophylaxis of osteomyelitis at models of open fractures using chitosan film with ciprofloxacin or pure. **Materials and Method:** 24 Holtzman rats were used divided into 4 groups. CT group: model of open fracture treated with systemic antimicrobial, IC group: model of open fracture without treatment, Q group: model of open fracture treated by chitosan film, QA group: model of open fracture treated by chitosan film with antimicrobial. After 3 weeks, the animals were underwent euthanasia through overdose of anesthetics and the left rear femur was removed to histological and microbiological analysis. The histological classification used Smeltzer system and microbiological analysis used qualitative culture. Comparisons between groups were carried out considering significant p values $\leq 0,05$. **Results:** The results of animals culture from CT group were less positive when compared with the results of the cultures of the CI group ($p = 0.005$), Q group ($p = 0.005$) and QA group ($p = 0.009$). Evaluating degree of bone inflammation through Smeltzer system showed significant difference in the total score of the CT group animals in comparison to animals from the CI group ($p = 0.014$) Q group ($p = 0.001$) and QA group ($p = 0.007$).

Conclusion: In this experimental model of open fracture pure chitosan film or chitosan film with ciprofloxacin were not effective for preventing osteomyelitis.

Keywords: Open fracture, prophylaxis, infection, chitosan, ciprofloxacin

INTRODUÇÃO

A incidência anual de fraturas expostas em ossos longos é estimada em 11,5 a cada 100.000 pessoas¹ e 40% dessas fraturas acometem os membros inferiores². Há evidências que em seres humanos existe risco aumentado de osteomielite após fraturas expostas e lesões de partes moles³⁻⁵. Mesmo com a utilização de protocolos de tratamento, o índice de osteomielite varia de 10 a 50%, dependendo da gravidade da lesão³⁻⁵. Há 150 anos o óbito consequente a fraturas expostas era frequente. Com a evolução da terapêutica a sobrevida melhorou consideravelmente^{6,7,8}.

As fraturas expostas são classificadas de acordo com Gustilo e Anderson (modificado por Gustilo *et al.*)⁴ em três tipos. As do tipo 1 são caracterizadas por ferida menor que um centímetro, com mínima contaminação e lesão de partes moles. As fraturas do tipo 2 apresentam ferida maior que um centímetro e lesão moderada de partes moles, mas a cobertura da ferida é adequada e a lesão do perióstio não é extensa. As fraturas do tipo 3 são divididas em três subtipos. O tipo 3A é caracterizada por trauma de alta energia, grande lesão de partes e contaminação significativa, mas a cobertura da ferida é adequada. O tipo 3B é similar ao tipo 3A mas a cobertura da ferida não é adequada, necessitando procedimentos adicionais para sua cobertura. O tipo 3C é a fratura exposta associada a lesão arterial que necessita de reparo⁴.

O objetivo do tratamento das fraturas expostas é prevenir infecção, promover a consolidação da fratura e restaurar a função⁸. Todos os pacientes com fratura exposta necessitam estabilização clínica inicial, profilaxia contra tétano, antimicrobiano sistêmico, desbridamento cirúrgico, irrigação copiosa da ferida, estabilização da fratura, fechamento de tecidos moles, reabilitação e

acompanhamento pós operatório adequado. Alguns pacientes podem se beneficiar de terapia com antimicrobiano local⁸.

A maioria das infecções pós fratura exposta são causadas por bastonetes gram negativos ou estafilococos gram positivos, e a antibióticoprofilaxia sistêmica é o padrão no tratamento das fraturas expostas desde 1974 quando Patzakis *et. al.* publicaram seu trabalho randomizado com uso da cefalotina, uma cefalosporina de primeira geração, como parte do tratamento das fraturas expostas^{4,9}. O benefício da antibióticoprofilaxia sistêmica foi confirmado por uma revisão da Cochrane onde foi observado que o uso de antibiótico após fraturas expostas reduz o risco de infecção em 59%¹⁰.

As evidências sugerem que a profilaxia antimicrobiana deve começar o mais cedo possível após a lesão¹¹, mas seu tempo de uso é controverso¹². Alguns autores recomendam a profilaxia inicial por três dias¹², enquanto outros recomendam seu uso por 24 horas¹³.

Na última década vem crescendo o interesse pelo uso da aplicação tópica de antimicrobianos para profilaxia de infecções secundárias às fraturas expostas¹⁴. O uso tópico proporciona alta concentração do antimicrobiano na ferida com baixa concentração sistêmica, reduzindo o risco de efeitos colaterais¹⁴. O veículo mais utilizado para a aplicação tópica do antimicrobino é o polimetilmetacrilato (PMMA), que é comercializado em pó e eleva a temperatura ao polimerizar, limitando seu uso a drogas termoestáveis e com formulação em pó¹⁴. Além disso, o PMMA deve ser retirado após a liberação do antimicrobiano por não ser biodegradável¹⁴. Desta forma outros veículos devem ser avaliados para viabilizar a aplicação tópica do antimicrobiano.

A quitosana, um produto biológico oriundo da quitina de crustáceos (camarão), é bioabsorvível¹⁵, bactericida¹⁶ e permite o armazenamento e distribuição de medicamentos¹⁷, incluindo antimicrobianos. É composta por uma cadeia linear de

polissacarídeos distribuídos em unidades randomizadas de β -(1-4)-2-amino-2-D-glucosamina (deacetilada) e β -(1-4)-2-acetamino-2-D-glucosamina. A Lisozima¹⁸ degrada o quitosana a sacarídeo e glicosamina através de produtos que são incorporados nos proteoglicanas ou metabolizados no ciclo de Krebs^{15, 19,20}. A quitosana é uma base catiônica fraca solúvel em soluções ácidas diluídas e exibe propriedades adesivas a superfícies carregadas com cargas negativas ^{21,22}. Filmes desidratados de quitosana têm a capacidade de reidratar rapidamente e absorver drogas²³. Deacetilação, solvente ácido, absorção de antimicrobianos e eluição podem afetar suas propriedades^{17, 23}. Manipulações das propriedades deste filme durante a produção podem melhorar a capacidade adesiva e a liberação local de antimicrobiano podendo auxiliar na profilaxia de infecções ^{17,23}.

Baseado neste conhecimento, poderia-se supor que o uso da quitosana associada a antimicrobiano aplicado próximo ao local da fixação de uma fratura exposta poderia reduzir o grau de contaminação, com consequente redução na incidência de infecções após fratura exposta.

RELEVÂNCIA

Trata-se do primeiro trabalho na literatura que utiliza a membrana de quitosana impregnada ou não com cirpofloxacino na profilaxia de osteomielite em modelo experimental de fratura exposta.

OBJETIVO

Avaliar a eficácia da profilaxia da osteomielite em fraturas expostas em modelo experimental com a utilização do filme de quitosana impregnado ou não com ciprofloxacino, comparando com o tratamento padrão realizado por meio da antibióticoprofilaxia sistêmica.

MATERIAIS E MÉTODO

Animais e cuidados dispensados

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) sob o protocolo 240/2011.

Foram utilizados 24 ratos machos, da raça Holtzman, adultos, com aproximadamente três meses de vida e peso médio de $261,95 \pm 20,82$ gramas (g) (variando de 216 a 310 gramas). Os ratos foram alocados em gaiolas com três animais do mesmo grupo no Biotério da Faculdade de Medicina da UFMG, em local arejado com oferta de água e ração especial para ratos Nuvilab® (Sogorb Indústria e Comércio Ltda., São Paulo, SP, Brasil) em livre demanda, controle de temperatura, ventilação e ciclo natural dia-noite sob monitorização diária dos pesquisadores e técnicos do biotério.

O tamanho da amostra foi calculado com auxílio do *software* Minitab® versão 14.1 (Minitab Inc., State College, PA, EUA), considerando $\alpha = 0,05$, poder do teste $> 0,80$ e desvio máximo entre os resultados igual ao valor da média, resultando em amostras de seis animais por grupo. Os valores da média e desvio padrão foram estabelecidos após realização de projeto piloto.

Delineamento experimental

Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos:

Grupo Controle do Tratamento (CT): (n = 6) modelo animal de fratura exposta tratados com antimicrobiano sistêmico

Grupo Controle de Infecção (CI): (n = 6) modelo animal de fratura exposta sem tratamento

Grupo Quitosana (Q): (n = 6) modelo animal de fratura exposta tratado com filme de quitosana pura

Grupo Quitosana com Antimicrobiano (QA): (n = 6) modelo animal de fratura exposta tratado com filme de quitosana impregnado com ciprofloxacino

Suspensão bacteriana

Foram utilizadas cepas de *Staphylococcus aureus* cultivados no Laboratório Central da Faculdade de Medicina da UFMG. As colônias das bactérias cultivadas em ágar sangue foram suspensas em solução salina até a concentração de 1×10^2 UFC / 0,1 mL mensurada por meio da escala de McFarland²⁴.

Preparação da membrana de quitosana

A membrana de quitosana em dimensões de 0,5 X 0,5 cm, ou associada com ciprofloxacino (Shaanxi New Leader Trading Co. Ltda., Shaanxi, China) na concentração de 10%, foi preparada na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais. O

tamanho de 0,5 X 0,5 cm da membrana foi escolhida por possibilitar a cobertura de todo o foco da fratura do fêmur da pata traseira esquerda dos animais. A concentração de 10% do peso molecular de ciprofloxacino foi determinada de forma aleatória já que não existem trabalhos na literatura utilizando a membrana de quitosana pura ou impregnada com ciprofloxacino para profilaxia de osteomielite em modelo experimental de fratura exposta.

Após sua preparação, as membranas foram esterilizadas em óxido de etileno e utilizadas em até 15 dias após sua esterilização²⁵.

Técnica operatória

Os animais foram anestesiados e mantidos em sedação por meio de injeção intra-peritoneal de xilazina e cetamina (Agener União Saúde Animal, São Paulo, SP, Brasil) nas doses de 15mg/kg e 60mg/kg, respectivamente. Realizou-se a fratura do fêmur da pata traseira esquerda do animal por meio de um aparelho em guilhotina. O fêmur da pata traseira esquerda do animal foi colocado apoiando suas extremidades proximal e distal nos dois suportes da base do aparelho em guilhotina, o peso do aparelho foi elevado até seu batente no alto do guia de metal e em seguida foi solto, ao colidir com a parte mais baixa do guia de metal o peso projetou a lâmina romba em guilhotina contra o fêmur traseiro esquerdo do animal proporcionando fratura com padrão similar em todos os animais (Figura 1). Em seguida, após tricotomia na pata posterior esquerda, foi feita antissepsia com polivinilpirrolidona-iodo (Povidine® - Johnson & Johnson do Brasil Indústria e Comércio de Produtos para Saúde Ltda., São José dos Campos, SP, Brasil) em solução degermante, seguida da solução alcoólica. O animal foi colocado em decúbito lateral direito sobre a bancada de cirurgia e realizou-se a proteção da área com campos estéreis, mantendo exposta apenas a pata a ser operada (Figura 2).

Figura 1 – Aparelho para indução de fratura em guilhotina

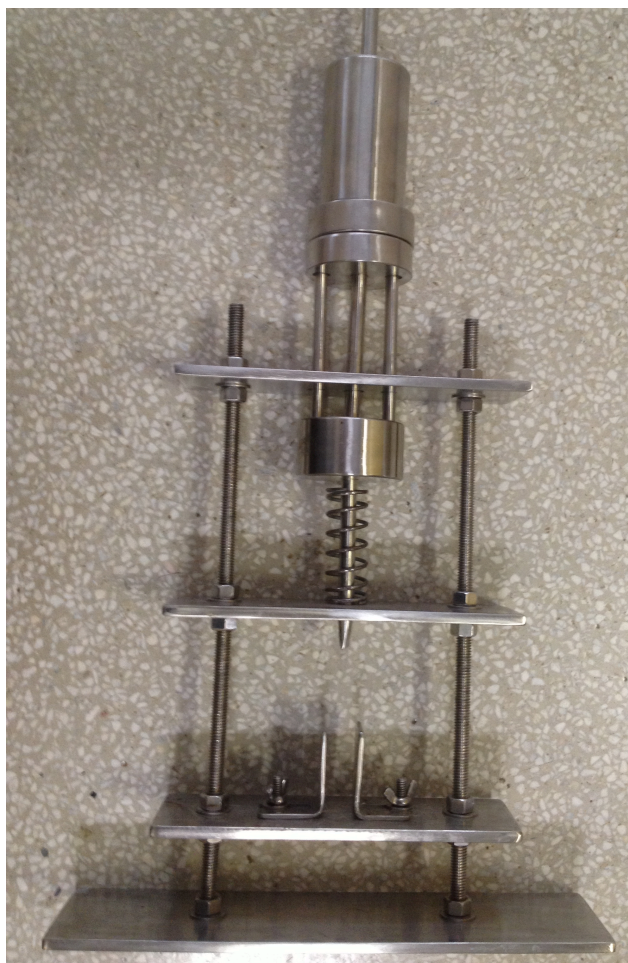


Figura 2 – Pata traseira esquerda preparada para cirurgia com campos estéreis após antissepsia adequada



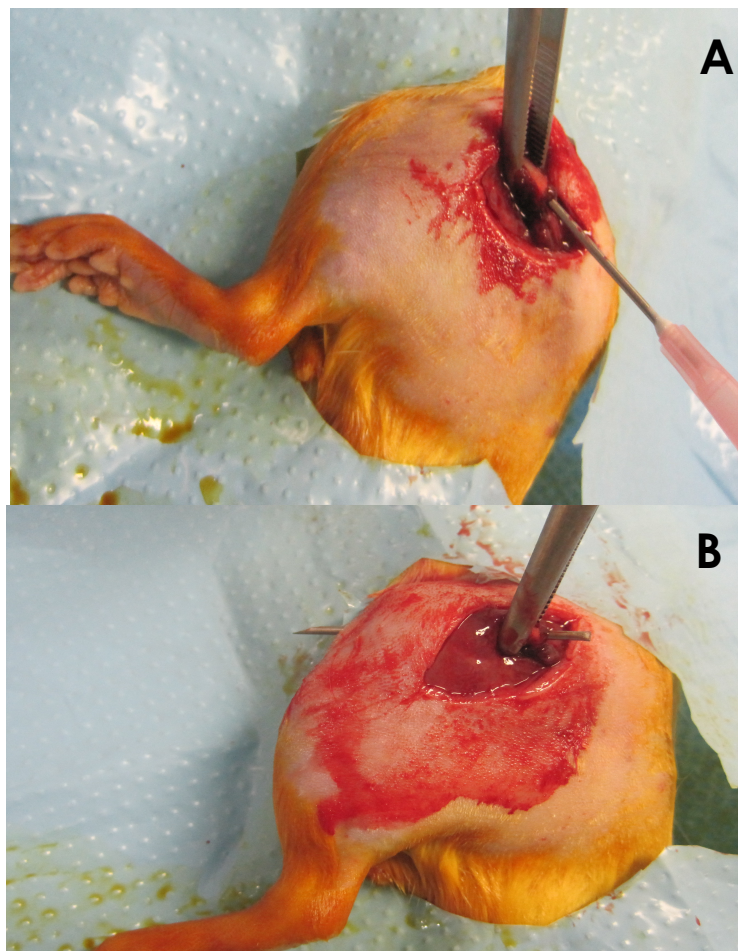
Após paramentação do pesquisador, realizou-se incisão longitudinal no nível da coxa esquerda, com dissecção por planos até a exposição da fratura diafisária do fêmur (Figura 3).

Figura 3 – Incisão longitudinal na coxa da pata traseira esquerda



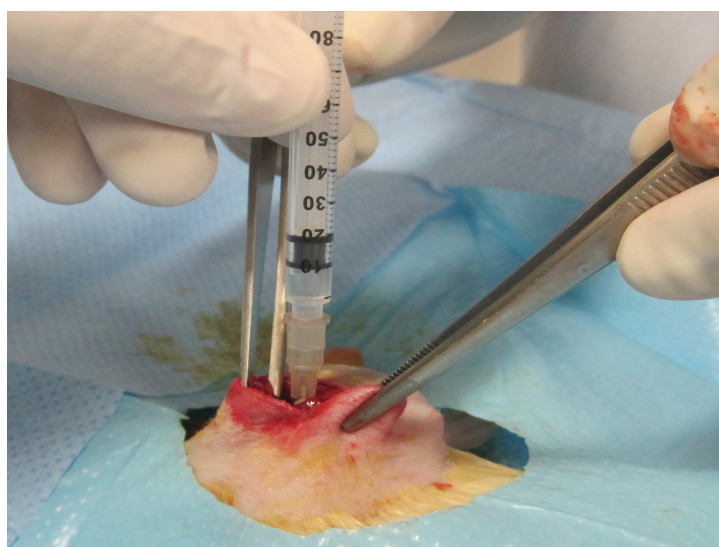
Em seguida, foi realizada a fixação da fratura utilizando agulha de aspiração 40 X 1,2 milímetros (mm) a semelhança de haste intramedular. A agulha foi introduzida intramedular no foco de fratura do fragmento distal do fêmur da pata traseira esquerda do animal e deslizada em sentido anterógrado até sua exposição no joelho, na sequência sua extremidade proximal foi introduzida intramedular no foco de fratura do fragmento proximal do fêmur da pata traseira esquerda do animal e deslizada em sentido retrógrado até se fixar na parte mais proximal do fêmur. O excesso de metal saliente ao nível do joelho foi cortado com alicate especial para cortar fios de aço (Figura 4).

Figura 4 – Fixação da fratura com agulha 40 X 1,2 mm (A, B)



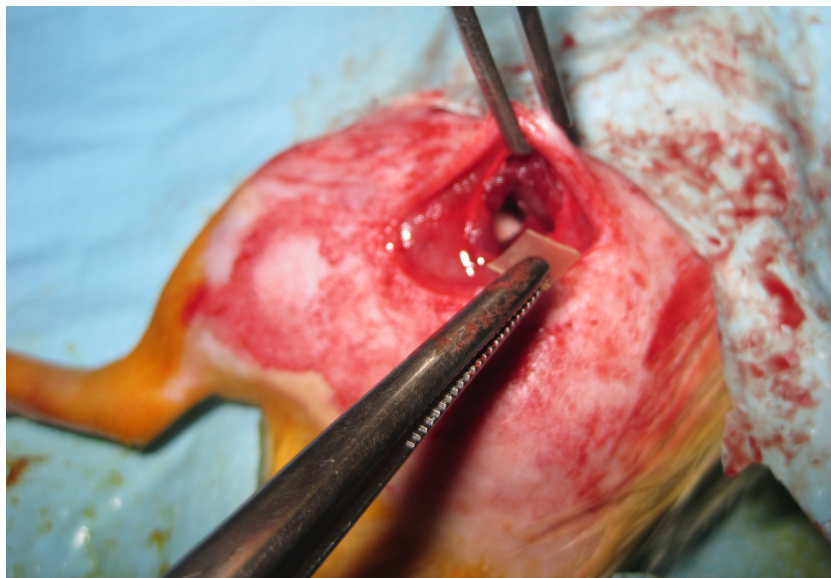
Após a fixação da fratura foi realizada a inoculação de 0,1 mililitros (mL) da suspensão de *Staphylococcus aureus* com concentração de 10^2 unidades formadoras de colônia por mililitros (UFC/mL) definida pela escala de McFarland, aplicada no leito da fratura (Figura 5) ²⁴.

Figura 5 – Inoculação bacteriana no foco de fratura



Em seguida, realizou-se a sutura com fio não absorvível monofilamentar de nylon 5-0 (Mononylon Ethicon® - Johnson & Johnson do Brasil Indústria e Comércio de Produtos para Saúde Ltda., São José dos Campos, SP, Brasil) em planos nos animais do grupo CT e CI. Realizou-se a colocação da membrana de quitosana pura nos animais do grupo Q e posterior fechamento da ferida como nos grupos anteriores, enquanto no grupo QA realizou-se a colocação da membrana de quitosana impregnada com ciprofloxacino e posterior fechamento da ferida em planos com fio não absorvível monofilamentar de nylon 5-0 (Figura 6).

Figura 6 – Colocação da membrana de quitosana pura nos animais do grupo Q e impregnada com ciprofloxacino nos animais do grupo QA



Pós operatório

Os animais foram mantidos em gaiolas contendo três animais do mesmo grupo no Biotério Central da Faculdade de Medicina da UFMG, com livre oferta de água e ração padrão para ratos. A analgesia foi realizada por meio de solução de meloxicam (Movatec® - Boehringer Ingelheim do Brasil Química e Farmacêutica Ltda, São Paulo, Brasil) na dose de 0,2 mg/kg por via subcutânea no pós-operatório imediato. Os animais do grupo CT foram tratados com ciprofloxacino (Ciprodez® - Laboratório Bio-Vet S/A, Vargem Grande Paulista, SP, Brasil) intraperitoneal na dose de 2,5mg/Kg de peso corpóreo por dia, durante três dias. Os animais do grupo CI não receberam tratamento para a fratura exposta. Os animais do grupo Q não receberam tratamento adicional para a fratura exposta, mas receberam a membrana de quitosana pura no foco da fratura. O

grupo QA recebeu tratamento com liberação local de antimicrobiano pela membrana de quitosana impregnada. A ferida foi avaliada diariamente e os pontos de sutura foram retirados após 10 dias de pós-operatório. Após três semanas os animais foram eutanasiados por meio de sobredose anestésica. Em condições assépticas, o fêmur traseiro esquerdo foi retirado e o material enviado para exame de cultura qualitativa no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Madre Teresa (Belo Horizonte – Brasil) e análise histológica da inflamação local no Laboratório do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (Belo Horizonte – Brasil).

Avaliação do grau de infecção

A presença de infecção foi avaliada por meio da cultura qualitativa de fragmento ósseo retirado do fêmur, cultura qualitativa de esfregaço da ferida operatória e exame histopatológico.

As culturas foram realizadas em meio ágar sangue, sendo consideradas positivas as culturas que apresentaram crescimento bacteriano em 72 horas, com o mesmo microorganismo inoculado no leito medular (*Staphylococcus aureus*).

Em todos os grupos foram realizadas culturas qualitativas da suspensão com *Staphylococcus aureus* para certificar-se da presença de bactérias no foco de fratura do fêmur esquerdo dos animais estudados.

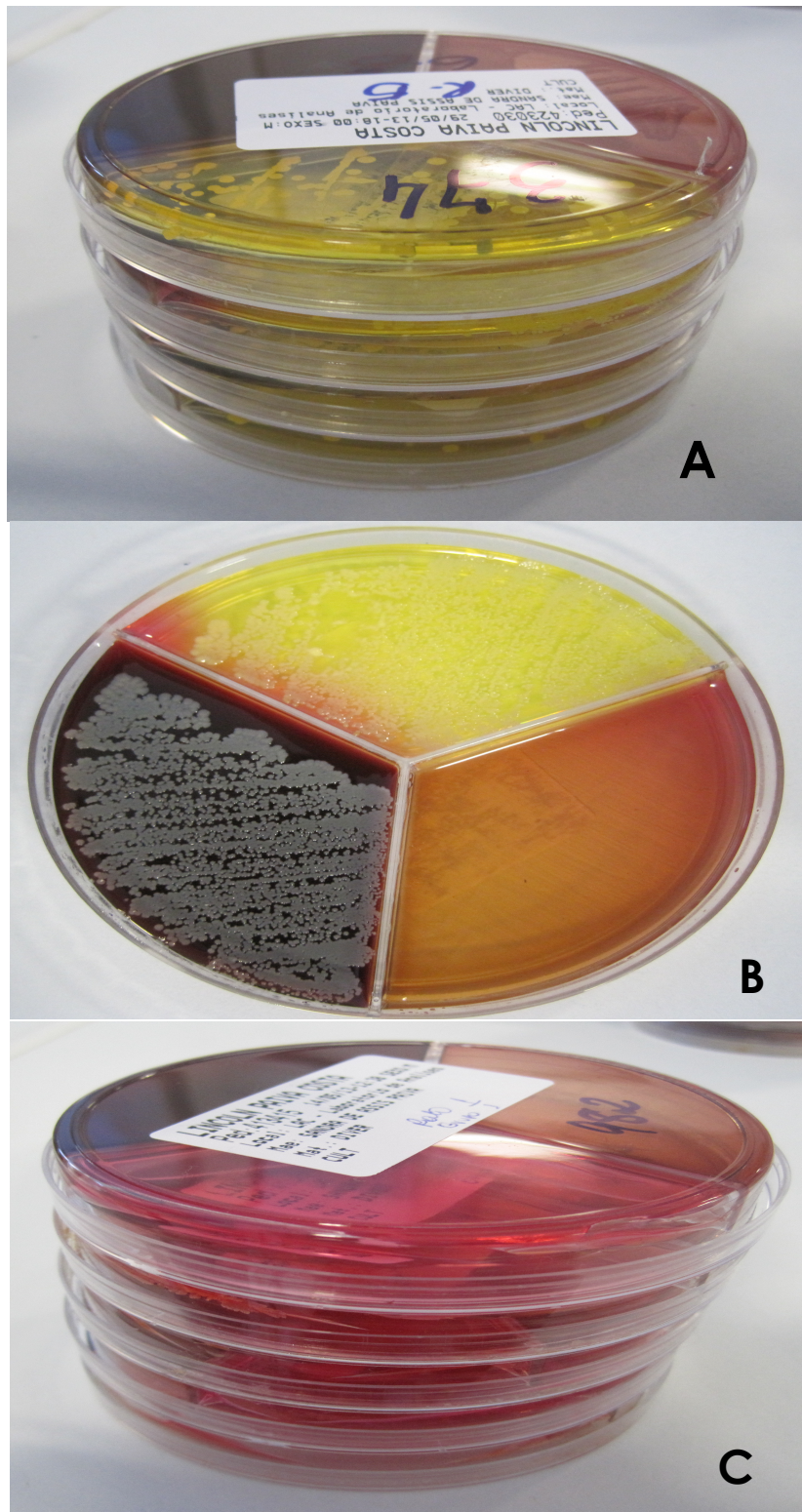
O fragmento de osso foi transportado do Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (Belo Horizonte – Brasil) até o Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Madre Teresa (Belo Horizonte – Brasil) em tubo estéril contendo solução salina e foi colocado em caldo enriquecido Breat Heart Infusion (BHI) logo

da chegada a este local, em quantidade suficiente para recobrir todo o material enviado.

O esfregaço foi transportada do Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (Belo Horizonte – Brasil) até o Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Madre Teresa (Belo Horizonte – Brasil) em tubo estéril coberto por caldo enriquecido BHI, sendo semeado em placas de cultura contendo os meios de enriquecimento ágar sangue, ágar manitol e ágar Mac Conkey, as quais foram incubada em estufa microbiológica convencional por 24 horas a 35 graus celcius ($^{\circ}\text{C}$) $\pm 2^{\circ}\text{C}$, logo da chegada a este local.

No caso de crescimento bacteriano nas primeiras 24 horas de incubação, (FIGURA 7A e 7B), o microorganismo foi isolado e identificado. Em caso de crescimento negativo (FIGURA 7C), o procedimento de repique foi repetido a cada 24 horas até completar 72 horas da incubação inicial. Caso o crescimento tenha sido negativo, as tentativas de recuperação bacteriana foram finalizadas e o resultado liberado como não havendo crescimento de microorganismos.

Figura 7 – Placas evidenciando crescimento bacteriano positivo (A e B) e negativo (C)



Todas as cepas isoladas de *Staphylococcus aureus* foram submetidas a análise de antibiograma para verificar sua sensibilidade ao ciprofloxacino (FIGURA 8).

Figura 8 – Figura ilustrativa do exame de antibiograma e a sensibilidade da bactéria isolada ao ciprofloxacino (seta)



As peças de fêmur dos animais estudados foram dissecadas, retiradas e colocadas em frascos contendo formol a 10% permitindo preservação e transporte das peças do Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (Belo Horizonte – Brasil) até o Laboratório de Patologia da Universidade Federal de Minas Gerais (Belo Horizonte – Brasil) onde foi realizado o estudo histopatológico. As lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina e avaliadas sempre pelo mesmo patologista em microscopia ótica convencional para pesquisa de osteomielite em atividade. A classificação histológica foi realizada baseando-se nos dados relativos a inflamação intraóssea aguda, inflamação intraóssea crônica, inflamação periosteal e necrose óssea utilizando o sistema de Smeltzer *et al*²⁶. Cada parâmetro foi graduado em uma escala de cinco níveis (zero a quatro), e a soma dos respectivos parâmetros histológicos calculado como uma pontuação histológica total (tabela 1).

TABELA 1 – Parâmetros histológicos microscópicos e sistema de pontuação.

Inflamação intraóssea aguda

0 – Ausente

1 – Inflamação mínima, sem abscesso intramedular

2 – Inflamação moderada a intensa, sem abscesso intramedular

3 – Inflamação mínima, com abscesso intramedular

4 – Inflamação moderada a intensa, com abscesso intramedular

Inflamação óssea crônica

0 – Ausente

1 – Inflamação crônica mínima, sem fibrose intramedular

2 – Inflamação crônica moderada a intensa, sem fibrose intramedular

3 – Inflamação crônica Mínima, com fibrose intramedular

4 – Inflamação crônica moderada a intensa, com fibrose intramedular

Inflamação periosteal

0 – Ausente

1 – Inflamação mínima, sem abscesso subperiosteal

2 – Inflamação moderada a intensa, sem abscesso subperiosteal

3 – Inflamação mínima, com abscesso subperiosteal

4 – Inflamação moderada a intensa, sem abscesso subperiosteal

Necrose óssea

0 – Sem evidência de necrose

1 – Foco único de necrose, sem formação de sequestro

2 – Foco múltiplo de necrose, sem formação de sequestro

3 – Foco único de necrose, com formação de sequestro

4 – Foco múltiplo de necrose, com formação de sequestro

Adaptado de Smeltzer et al²⁶

Análise Estatística

Os dados foram analisados com auxílio do software EPI INFO™ 7.1.2.0 para Windows® (Atlanta, Estados Unidos). Os resultados foram avaliados através do teste de Fisher para comparação de variáveis qualitativas e do teste de Mann-Whitney para comparação de variáveis quantitativas. Para todos os resultados as diferenças foram consideradas significativas quando o valor de p foi menor ou igual a 0,05 ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS

Peso

O peso médio dos animais foi de 252,50 g \pm 20,29 (mínimo 216 g e máximo 270 g) no grupo controle de tratamento (CT), 258,26 g \pm 16,55 (mínimo 250 g e máximo 296 g) no grupo controle de infecção (CI), 259,50 g \pm 20,40 (mínimo 230 g e máximo 283 g) no grupo quitosana pura (Q) e 270 g \pm 26,13 (mínimo 242 g e máximo 310 g) no grupo quitosana com antimicrobiano (QA) (Tabela 2).

Não houve diferença entre os grupo.

TABELA 2 – Comparação do peso médio dos animais dos grupos controle sem tratamento (CI), tratamento com antibióticoprofilaxia sistêmica (CT), tratamento com quitosana (Q) ou quitosana impregnada com antibiótico (QA)

	PESO MÉDIO	PESO MÍNIMO	PESO MÁXIMO	VALOR P
GRUPO CT	252,50 g \pm 20,29	216 g	270 g	-
GRUPO CI	258,26 g \pm 16,55	250 g	295 g	NS
GRUPO Q	259,50 g \pm 20,40	230 g	283 g	NS
GRUPO QA	270,00 g \pm 26,13	242 g	310 g	NS

NS – não significativo

Infecção

No grupo controle de tratamento (CT) os exames de cultura qualitativa apresentaram resultado negativo em todos os animais, no grupo controle de infecção (CI) os exames de cultura qualitativa apresentaram resultado positivo em cinco animais e negativo em um animal, taxa de infecção óssea de 83,33%, no grupo quitosana pura

(Q) os exames de cultura qualitativa apresentaram resultado positivo em todos os animais estudados, no grupo quitosana com antimicrobiano (QA) os exames de cultura qualitativa apresentaram resultado positivo em cinco animais e negativo em um animal (Tabela 3).

Observou-se diferença entre os resultados das culturas dos animais do grupo controle de tratamento (grupo CT), quando comparados com os resultados das culturas do grupo sem tratamento, do grupo tratado apenas com membrana de quitosana e do grupo tratado com membrana de quitosana impregnada com ciprofloxacino (grupos CI, Q e QA)

Tabela 3 – Resultados das culturas qualitativas nos grupos sem tratamento (CI) e tratados com antibioticoprofilaxia sistêmica (CT), com membrana de quitosana (Q) ou com membrana de quitosana impregnada com ciprofloxacino (QA).

RESULTADOS DOS EXAMES DE CULTURA			
	POSITIVO	NEGATIVO	VALOR P
GRUPO CT	0	6	-
GRUPO CI	5	1	0,005
GRUPO Q	6	0	0,009
GRUPO QA	5	1	0,005

A cultura qualitativa da suspensão bacteriana inoculada no foco da fratura apresentou resultado positivo e o germe isolado foi o *Staphylococcus aureus* em todos os grupos estudados.

Em todas as culturas com resultado positivo a bactéria isolada foi o *Staphylococcus aureus*, mesma bactéria inoculada no foco de fratura no início do experimento e o antibiograma evidenciou sensibilidade das bactérias isoladas ao ciprofloxacino.

No grupo controle de tratamento um dos animais apresentou deiscência de sutura e morreu após dois dias, sendo substituído por um novo animal. No grupo quitosana com antimicrobiano (QA) dois animais apresentaram sinais de infecção local através de fístula ativa com secreção purulenta.

Histologia

Segunda a classificação de Smeltzer et al²⁶ no grupo controle de tratamento (CT) a análise histológica apresentou pontuação média de $2,66 \pm 1,96$, no grupo controle de infecção (CI) a análise histológica apresentou pontuação média de $5,83 \pm 1,72$, no grupo quitosana pura (Q) a análise histológica apresentou pontuação média de $10,5 \pm 3,08$ e no grupo quitosana com antimicrobiano (QA) a análise histológica apresentou pontuação média de $6,66 \pm 2,16$ (Tabela 4).

Na análise histológica observou-se diferença na pontuação total dos animais submetidos ao tratamento com antibióticoprofilaxia sistêmica (grupo CT) em comparação aos demais grupos. Foi visto também que, quando avaliados os parâmetros desse sistema de pontuação de forma isolada, a maior diferença entre os animais do grupo tratado com antibióticoprofilaxia sistêmica (grupo CT) e os demais foi no grau de inflamação intraóssea crônica.

TABELA 4 – Grau de inflamação de fragmento ósseo por meio do sistema de pontuação de Smeltzer nos grupos controle de infecção (CI) e tratados com antibióticoprofilaxia sistêmica (CT), com quitosana (Q) ou com quitosana impregnada com antibióticos (QA).

RESULTADOS DA HISTOLOGIA ÓSSEA		
	PONTUAÇÃO MÉDIA	VALOR P
GRUPO CT		
Inflamação intraóssea aguda	0 ± 0	-
Inflamação óssea crônica	1,00 ± 0,63	-
Inflamação periosteal	1,50 ± 1,64	-
Necrose óssea	1,66 ± 0,40	-
Total	2,66 ± 1,96	-
GRUPO CI		
Inflamação intraóssea aguda	0,33 ± 0,81	NS
Inflamação óssea crônica	3,66 ± 0,51	0,001
Inflamação periosteal	0 ± 0	0,049
Necrose óssea	1,83 ± 1,16	NS
Total	5,83 ± 1,72	0,014
GRUPO Q		
Inflamação intraóssea aguda	2,00 ± 1,89	0,027
Inflamação óssea crônica	3,66 ± 0,51	0,001
Inflamação periosteal	2,00 ± 1,09	NS
Necrose óssea	2,83 ± 1,47	NS
Total	10,5 ± 3,08	0,001
GRUPO QA		
Inflamação intraóssea aguda	1,5 ± 1,22	NS
Inflamação óssea crônica	3,5 ± 0,54	0,000025
Inflamação periosteal	0,83 ± 0,40	NS
Necrose óssea	0,83 ± 0,40	0,005
Total	6,66 ± 2,16	0,007

NS – não significativo P ≤ 0,05 – significativo

DISCUSSÃO

Uma fratura é considerada exposta quando ocorre uma ruptura da pele e das partes moles adjacentes resultando em comunicação do foco da fratura com o meio externo^{4,27}.

A classificação de Gustilo e Anderson permite boa correlação entre o tipo da fratura e o risco de osteomielite. Vários estudos reportam índice de osteomielite de 0% a 2% para as fraturas do tipo 1, 2% a 5% para as fraturas do tipo 2, 5% a 10% para as fraturas do tipo 3A, 10% a 50% para as fraturas do tipo 3B e 25% a 50% para as fraturas do tipo 3C^{4,11,27, 28}.

A osteomielite é uma das complicações mais devastadoras das fraturas expostas. Ela ocorre em uma alta porcentagem dos casos e depende do tipo da fratura, do grau de contaminação, da extensão da perda óssea, da presença de síndrome de compartimento, da associação com lesões vasculares, do grau de acometimento das partes moles e se a terapia antimicrobiana local ou sistêmica foi administrada²⁹.

Este estudo reproduziu um modelo experimental de fratura exposta tipo 3A de Gustilo e Anderson para avaliar a eficácia da profilaxia da infecção em cada um dos grupos experimentados, avaliando como desfecho a ocorrência ou não de osteomielite. Vários modelos de fratura exposta e osteomielite são descritos na literatura^{24,30,31}. Seguimos o modelo sugerido por Lindsey *et al.*²⁴, onde os autores comprovaram um índice de osteomielite reprodutível de 90% a 100% após 21 dias da realização da fratura experimental, exposição da ferida, inoculação de uma solução contendo *Staphylococcus aureus* na concentração de 1×10^2 UFC / 0,1 mL e fixação óssea com haste intramedular. Utilizou-se o *Staphylococcus aureus* por ser esta bactéria uma das causadoras mais frequentes de osteomielite, como descrito por Lew e Waldvogel³². A escolha de

ratos como animais de experimentação baseou-se na necessidade de animais mais resistentes, evitando ocorrência de infecções agudas ou sistêmicas como descrito por Southwood *et al.*³³, que observaram sinais de sepse em 38,5% dos animais infectados em experimento com próteses metálicas em coelhos. Através dos resultados encontrados pode-se dizer que o modelo proposto neste estudo funcionou de maneira adequada, já que cinco dos seis animais do grupo sem tratamento (grupo CI), evoluíram com infecção após um período de 21 dias da cirurgia, apresentando taxa de infecção óssea de 83,33%.

O tratamento das fraturas expostas envolve vários aspectos como o uso de antibiótico, o tempo entre a fratura e o tratamento cirúrgico, a irrigação da ferida operatória, a cobertura cutânea, o fechamento da ferida e as terapias adjuvantes⁸.

O uso de antimicrobiano vem sendo considerado o padrão de tratamento desde 1974, quando Patzakis *et al.* observaram que pacientes tratados com cefalotina apresentaram menores taxas de osteomielite do que pacientes tratados com penicilina e estreptomicina (2,3% contra 9,7%)⁹. Benson *et al.* realizaram um estudo duplo cego prospectivo onde observaram que a clindamicina foi tão eficaz quanto a cefazolina na prevenção de osteomielite secundária a fraturas expostas³⁴. O ciprofloxacino também foi considerado no tratamento das fraturas expostas em função de sua ação contra organismos gram positivos e gram negativos. Patzakis *et al.*, em um estudo prospectivo, duplo cego, randomizado compararam a monoterapia com ciprofloxacino com a terapia combinada com cefamandol e gentamicina e observaram que os dois tipos de terapia foram equivalentes para profilaxia de osteomielite nas fraturas expostas³⁵. Apesar da existência ampla de dados validando o uso de antimicrobianos na profilaxia de osteomielite nas fraturas expostas, faltam evidências de qual seria o melhor antimicrobiano e a melhor forma de administração⁸.

Os dados de trabalhos prévios sugerem que o tratamento com antimicrobiano deve se iniciar o mais precocemente possível após a lesão⁸. Em um estudo de 1104 fraturas expostas conduzido por Patzakis e Wilkins, observou-se que o índice de osteomielite nas fraturas expostas foi de 4,7% quando o antimicrobiano era administrado nas primeiras três horas após a lesão contra 7,4% quando era administrado após três horas da lesão¹¹. O tempo ideal para o tratamento com antimicrobianos também é incerto⁸. Vários autores recomendam seu uso por até três dias após a lesão¹².

Neste estudo procurou-se reproduzir nos animais do grupo CT o tratamento padrão para as fraturas expostas, que é a antibióticoprofilaxia sistêmica. O antimicrobiano utilizado foi o ciprofloxacino por via intraperitoneal, pois este atua adequadamente na profilaxia das infecções secundárias às fraturas expostas e é muito estável quando associado à membrana de quitosana, devido sua forma molecular. O tempo de uso do antimicrobiano foi de três dias após a lesão, como recomendado por vários autores.

O interesse pela antibióticoprofilaxia local nas fraturas expostas vem crescendo, pois proporciona alta concentração de antimicrobiano na ferida e mantém baixa concentração sistêmica, reduzindo o risco de efeitos colaterais¹⁴. O PMMA é o material mais utilizado como veículo de liberação local de antimicrobianos em cirurgia ortopédica^{36,37,38}. Porém tem algumas desvantagens, como elevação da temperatura ao polimerizar, necessitando antimicrobianos termoestáveis, e a liberação não ser controlada do antimicrobiano. Também, o PMMA deve ser retirado após a liberação do antimicrobiano por não ser biodegradável¹⁴. Ostermann *et al.* conduziram estudo retrospectivo em 1085 pacientes com fraturas expostas e observaram que os pacientes tratados com pérolas de PMMA com tobramicina no local da fratura apresentaram índice de osteomielite menor do que os pacientes sem tratamento local³⁸.

Keating *et al.* realizaram estudo retrospectivo analisando 81 fraturas expostas da tíbia e observaram que a utilização de pérolas de PMMA com tobramicina no local da fratura estava associada a menor risco de osteomielite, mas sem diferença significativa, talvez pelo pequeno tamanho da amostra³⁹. Moehring *et al.* fizeram estudo prospectivo, randomizado, controlado, comparando antibióticoprofilaxia local e sistêmica no tratamento das fraturas expostas tipo 2A, 3A e 3B de Gustilo e Anderson. Os pacientes foram randomizados após o tratamento inicial na sala de urgência para receber antibióticoprofilaxia local por meio de pérolas de PMMA com tobramicina ou antibióticoprofilaxia sistêmica com uma cefalosporina de segunda geração. Índices semelhantes de osteomielite foram observadas nos dois grupos, mas este trabalho apresentava uma amostra pequena⁴⁰.

Recentemente, uma série de estudos experimentais vêm sugerindo o uso de outras formas de antibióticoprofilaxia local incluindo o uso de antimicrobiano impregnado em enxerto ósseo⁴¹, antimicrobiano impregnado em substitutos de enxerto ósseo^{42,43}, antimicrobiano revestindo hastes intramedulares⁴³ e antimicrobiano impregnado na membrana de quitosana^{45,46,47}.

Neste estudo buscou-se avaliar a eficácia da profilaxia de osteomielite em fraturas expostas utilizando tratamento local por meio da membrana de quitosana pura nos animais do grupo Q e da membrana de quitosana impregnada com ciprofloxacino nos animais do grupo QA em comparação com o tratamento padrão realizado nos animais do grupo CT.

Utilizou-se a quitosana, pois esta substância possui a capacidade de transportar drogas à semelhança ao PMMA, com o benefício adicional de possuir atividade antibacteriana e antifúngica⁴⁸ e ser biodegradável¹⁵ não sendo necessária sua remoção com um segundo procedimento cirúrgico. Além disso, a

quitosana não aumenta a temperatura durante seu processo de fabricação, como ocorre na fase de polimerização do PMMA podendo ser combinada com qualquer tipo de antimicrobiano, não necessitando de medicamentos que tenham estabilidade térmica.

A quitosana é obtida através da deacetilação alcalina da quitina e é um dos mais abundantes polissacarídeos na natureza ficando atrás apenas da celulose, e tem dois tipos de propriedade antibactericida. Primeiramente sua carga positiva reage com as moléculas de carga negativa na superfície das células, alterando a permeabilidade celular e, dessa forma prevenindo a entrada de substâncias no espaço intracelular. Além disso a quitosana é capaz de se ligar ao DNA para inibir a síntese de RNA⁴⁹.

A liberação das drogas incorporadas à quitosana é determinada pela quantidade de ligações cruzadas, pelo tamanho do implante e pela quantidade de droga presente inicialmente na membrana. A velocidade com que a membrana de quitosana com ligações cruzadas se degrada é muito mais lenta do que a membrana de quitosana sem ligações cruzadas⁵⁰, manipulações nessa propriedade podem fazer com que a droga seja liberada de forma mais rápida ou lenta no foco da fratura exposta.

Apesar de Aimin *et al.*⁵¹ descreverem a redução do índice de infecção por *Staphylococcus aureus* em modelo experimental de osteomielite utilizando a quitosana pura, não obtivemos a mesma resposta neste trabalho. Os animais do grupo Q receberam como tratamento para o modelo de fratura exposta a membrana de quitosana pura e apresentaram alto índice de osteomielite quando comparados ao grupo controle de tratamento (grupo CT) que receberam antibióticoprofilaxia sistêmica com diferença significativa ($p=0,005$). A avaliação histológica também mostrou maior grau de inflamação óssea crônica nos animais do grupo tratado com membrana de quitosana pura (grupo Q) quando comparados ao

grupo controle de tratamento (grupo CT) que receberam antibióticoprofilaxia sistêmica com diferença significativa ($p=0,001$). Tal resultado pode ter sido decorrente do tamanho pequeno da membrana utilizada em nosso trabalho ou da grande lesão de partes moles causada pelo aparelho para indução de fratura em guilhotina que resulta em ambiente mais favorável à infecção.

Smith *et al.*⁴⁶ realizaram trabalho *in vitro* para avaliar a eficácia do filme de quitosana impregnado com antimicrobiano na profilaxia de infecção de partes moles e concluíram que o filme de quitosana com nível de deacetilação de 80% é potencialmente vantajoso como adjuvante no tratamento de lesões músculo esqueléticas diminuindo ou prevenindo infecções. Orhan *et al.*⁴⁵ avaliaram a eficácia de microesferas de quitosana e pectina impregnadas com ciprofloxacino no tratamento local de um modelo de osteomielite e concluíram que este tipo de tratamento foi superior ao tratamento equivalente com antimicrobiano intramuscular. Neste estudo foram observados resultados diferentes. Os animais do grupo QA submetidos ao tratamento do modelo de fratura exposta por meio da membrana de quitosana impregnada com ciprofloxacino apresentaram alta taxa de osteomielite em comparação com a antibióticoprofilaxia sistêmica (grupo CT) com diferença significativa ($p=0,009$). A avaliação histológica demonstrou maior grau de inflamação intraóssea crônica no grupo tratado com membrana de quitosana impregnada com ciprofloxacino (grupo QA) quando comparado ao grupo tratado com antibióticoprofilaxia sistêmica (grupo CT) com diferença significativa ($p=0,007$). Tal resultado pode se justificar pela pouca quantidade de antibiótico associado à quitosana utilizada neste estudo onde a preparação apresentava 10% do peso molecular da membrana em antimicrobiano. Estudos posteriores serão necessários para avaliar se a membrana de quitosana impregnada com antimicrobiano em doses mais altas pode ser tão eficaz quanto a antibióticoprofilaxia sistêmica

para a profilaxia de infecções em modelo experimental de fratura exposta.

Segundo Kanu Okike *et al.*⁸, além do uso de antimicrobiano sistêmico ou local, outros fatores colaboram para reduzir o índice de osteomielite após fraturas expostas. O tempo entre a lesão e o início do tratamento parece ser menos importante do que o fechamento da ferida e seu desbridamento adequado.

A irrigação da ferida é outro ponto chave no tratamento das fraturas expostas, pois ajuda na redução da carga bacteriana local e na remoção de contaminantes. Ainda não há consenso na literatura se a lavagem deve ser feita com solução salina sob pressão (lavagem pulsátil) ou não⁸.

Solução salina estéril ou associada a aditivos é comumente utilizada na irrigação das feridas de fraturas expostas. Os aditivos podem ser divididos em três categorias: antissépticos como povidine, clorexidine e hexaclorofeno; antimicrobianos como bacitracina; e detergentes que atuam removendo os microorganismos e não os matando⁸. No estudo de Anglen *et al.*⁵² soluções detergentes se mostraram mais eficazes na remoção do muco produzido pelas bactérias e aderido aos implantes, ao passo que soluções com antimicrobianos não foram significativamente melhores do que as soluções salinas ($p < 0,05$). Bhandari *et al.*⁵³ compararam várias soluções para irrigação em um modelo *in vitro* e observaram que enquanto soluções antissépticas e detergentes são mais eficazes na remoção da bactéria do osso, os detergentes produzem menor dano à função dos osteoblastos e osteoclastos. Mas até o momento não há evidência para a recomendação de qualquer aditivo para a irrigação de fraturas expostas⁸. Neste estudo não foi realizada a irrigação da ferida em nenhum dos animais pois no modelo de fratura exposta proposto por Buxton *et al.* os autores não observaram diferença no índice de infecção nos animais submetidos à irrigação da

ferida em comparação com os animais onde a irrigação não foi realizada³¹.

A fixação da fratura exposta apresenta uma série de benefícios, incluindo proteção de partes moles de lesão adicional, melhora dos cuidados com a ferida e promoção de mobilização e reabilitação, reduzindo o índice de osteomielite⁵⁴. Neste estudo todos os animais foram submetidos a fixação da fratura exposta do fêmur esquerdo com haste intramedular diminuindo a possibilidade de lesão de partes moles adicionais. Dessa maneira, o único fator que passou a influenciar a evolução das fraturas para osteomielite era o tratamento sistêmico ou local com antimicrobiano implementado.

Algumas terapias adjuvantes como o uso da proteína morfogenética do osso apresentaram redução no risco de uma segunda intervenção nas fraturas expostas de tibia em um estudo conduzido por Govender *et al.*⁵⁵. Pacientes que receberam este tipo de tratamento apresentaram menor taxa de falha do implante, consolidação mais rápida da fratura e cicatrização mais rápida da ferida⁵⁵, mas este não foi o foco deste estudo. Sendo assim, nenhum dos nossos animais receberam tratamento adjuvante para as fraturas expostas do fêmur traseiro esquerdo.

Apesar da biópsia óssea com estudo histopatológico ser o padrão, ela pode ser associada ao exame microbiológico (cultura) para o diagnóstico de osteomielite⁵⁶. Neste estudo, realizou-se os exames de cultura qualitativa e biópsia óssea com estudo histopatológico em todos os animais para avaliar a presença ou ausência de osteomielite. Existem poucos estudos relacionando a concentração da inoculação bacteriana e as alterações histológicas. Smeltzer *et al.*²⁶ observaram diferenças na histologia usando um modelo de osteomielite em coelhos com diversas concentrações de *Staphylococcus aureus*, eles documentaram e desenvolveram uma classificação histológica com os sinais de doença. Este sistema de

classificação foi utilizado neste trabalho para quantificar a inflamação óssea nos modelos de fratura exposta dos grupos estudados.

Como a consolidação das fraturas ósseas pode ser influenciada por uma série de fatores e não apenas pela presença ou ausência de infecção, neste trabalho esta variável não foi avaliada.

Novos estudos serão necessários para avaliar se a membrana de quitosana impregnada com ciprofloxacino em concentração maior de antimicrobiano ou em dimensões maiores do que a utilizada neste estudo será eficaz na profilaxia de osteomielite secundária à fraturas expostas.

CONCLUSÃO

Neste modelo experimental de fratura exposta a membrana de quitosana pura ou impregnada com ciprofloxacino não mostrou eficácia na profilaxia de osteomielite.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 – Court-Brown CM, Rimmer S, Prakash U, McQueen MM. The epidemiology of open long bone fractures. *Injury*. 1998; 29:529-34.
- 2 – Howard M, Court-Brown CM. Epidemiology and management of open fractures of the lower limb. *Br J Hosp Med*. 1997; 57:582-7.
- 3 – Zalavras CG, Patzakis MJ. Open fractures: evaluation and management. *J Am Acad Orthop Surg*. 2003; 11:212-219.
- 4 – Gustilo RB, Anderson JT. Prevention of infection in the treatment of one thousand and twenty five open fractures of long bones. *Journal of Bone and Joint Surgery*. 1976; 58A:453-458.
- 5 – DeLong WG Jr, Born CT, Wei SY, et. al. Aggressive treatment of 119 open fracture wounds. *J Trauma*. 1999; 46:1049-1054.
- 6 – Lister J. On a new method of treating compound fracture, abcess, etc. *The Lancet*. 1987;1:326, 357, 387, 507.
- 7 – Patrick JH, Smelt GJ. Surgical progress-100 years ago. An assesmente of Listerism at St Thomas Hospital, London. *Ann R Coll Surg Engl*. 1977;59:456-62.
- 8 – Kanu Okike BA, Bhattacharyya T. Current concepts review. Trends in the management of open fractures. *The Journal of Bone and Joint Surgery*. 2006; 88-A(12); 2739-2748.

9 – Patzakis MJ, Harvey JP Jr, Ivler D. The role of antibiotics in the management of open fractures. *Journal of Bone and Joint Surgery Am.* 1974; 56:532-41.

10 – Gosselin RA, Roberts I, Gillespie WJ. Antibiotics for preventing infection in open limb fractures. *Cochrane Database Syst Rev.* 2004; 1:CD003764.

11 – Patzakis MJ, Wilkins J. Factors influencing infection rate in open fractures wounds. *Clin Orthop Relat Res.* 1989; 243:36-40.

12 – Zalavras CG, Patzakis MJ, Holton PD, Sherman R. Management of open fractures. *Infec Dis Clin North Am.* 2005; 19:915-29.

13 – Dellinger EP, Caplan ES, Weaver LD, et al. Duration of preventive antibiotic administration for open extremity fractures. *Arch Surg.* 1988; 123:333-9.

14 – Eckman JB, Henry SL, Mangino PD, Seligson D. Wound and serum levels of tobramycin with the prophylactic use of tobramycin-impregnated polymethyl-methacrylate beads in compound fractures. *Clin Orthop Relat Res.* 1988; 237:213-15.

15 – Mi F, Tan Y, Liang H, Sung H. In vivo biocompatibility and degradability of a novel injectable-chitosan-based implant. *Biomaterials.* 2002; 23:181-191.

16 – Fujimoto T, Tsuchiya Y, Terao M, Nakamura K, Yamamoto M. Antibacterial effects of chitosan solution against *Leggionella pneumophila*, *Echerichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Int J Food Microbial.* 2006; 112:96-101.

17 – Khor E, Lim LY. Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials*. 2003; 24:2339-2349.

18 – Yshimura K, Toibana A, Nakahama K. Human Lysozyme: Sequencing of a cDNA, and expression of secretion by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998; 150:794-801.

19 – Dhanikula A, Panchagnula R. Development and characterization of biodegradable chitosan films for local delivery of paclitaxel. *AAPS J*. 2004; 6.

20 – Di Martino A, Sittlinger M, Risbud MV. Chitosan: A versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. *Biomaterials*. 2005; 26:5983-5990.

21 – Puttipipatkachorn S, Nunthanid J, Yamamoto K, Peck GE. Drug physical state and drug-polymer interaction on drug release from chitosan matrix films. *J Control Release*. 2001; 75:143-153.

22 – Frank A, Rath SK, Venkatran SS. Controlled release from bioerodible polymers: Effect of drug type and polymer composition. *J Control Release*. 2005; 102:333-344.

23 – Nunthanid J, Puttipipatkachorn S, Yamamoto K, Peck GE. Physical properties and molecular behavior of chitosan films. *Drug Dev Ind Pharm*. 2001; 27:143-157.

24 – Lindsey BA, Clovis NB, Smith ES, et al. An Animal Model for Open Fracture and Osteomyelitis: Part I. *Journal of Orthop Res*. 2010; 28:38-42.

25 – Yang YM, Zhao YH, Liu XH et al. The effect of Different Sterilization Procedures on Chitosan Dried Powder. *Journal of Applied Polymer Science*. 2006; 104:1968-1972.

26 – Smeltzer MS, Thomas JR, Hickmon SG, et al. Characterization of rabbit model of staphylococcal osteomyelitis. *F Orthop Res*. 1997; 15:414-21.

27 – Gustilo RB, Mendoza RM, Williams DN. Problems in the management of type III (severe) open fractures: a new classification of type III open fractures. *J Trauma*. 1984; 24:742-6.

28 – Gustilo RB, Gruninger RP, Davis T. Classification of type III (severe) open fractures relative to treatment and results. *Orthopedics*. 1987; 10: 1781-8.

29 – Suedkamp NP, Barbey N, Veuskens A, et al. The incidence of osteitis in open fractures: An analysis of 948 open fractures (a review of the Hannover experience). *J Orthop Trauma*. 1993; 7:473-82.

30 – Fukushima N, Yokoyama K, Sasahara T, Yoh Dobashi. Establishment of rat model of acute staphylococcal osteomyelitis: relationship between inoculation dose and development of osteomyelitis. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2005; 125:169-176.

31 – Buxton TB, Travis MT, O'Shea KJ, et al. Low-Dose Infectivity of *Staphylococcus aureus* (SMH Strain) in Traumatized Rat Tibiae Provides a Model for Studying Early Events in Contaminated Bone Injuries. *Comparative Medicine*. 2005; 55(2):123-128.

32 – Lew DP, Waldvogel FA. Osteomyelitis. *N Engl J Med.* 1997; 336:260-66.

33 – Southwood RT, Rice JL, McDonald PJ, Hakendorf PH, Rozenbils MA. Infection in experimental hip arthroplasties. *J Bone Joint Surg.* 1985; 67-B (2): 229-231.

34 – Benson DR, Riggins RS, Lawrence RM. Treatment of open fractures: a prospective study. *J Trauma.* 1983; 23:25-30.

35 – Patzakis MJ, Bains RS, Lee J et al. Prospective, randomized, double-blind study comparing single-agent antibiotic therapy, ciprofloxacin, to combination antibiotic therapy in open fracture wounds. *J Orth Trauma.* 2000; 14:529-33.

36 – Joseph TN, Chen AL, D Cesare PE. Use of antibiotic impregnated cement in total joint arthroplasty. *L Am Acad Orthop Surg.* 2003; 2:38-47.

37 – Klemm KW. Antibiotic bead chains. *Clin Orthop.* 1993; 295:63-79.

38 – Ostermann PA, Seligson D, Henry SL. Local antibiotic therapy for severe open fractures. A review of 1085 consecutive cases. *J Bone Joint Surg Br.* 1995; 77:93-7.

39 – Keating JF, Blachut PA, O'Brien PJ, et al. Reamed nailing of open tibial fractures: does the antibiotic bead pouch reduce the deep infection rate? *J Orthop Trauma.* 1996; 10:298-303.

40 – Moehring HD, Gravel C, Chapman MW, Olson SA. Comparison of antibiotic beads and intravenous antibiotics in open fractures. *Clin Orthop Relat Res.* 2000; 372: 254-61.

41 – Lindsey RW, Probe R, Miclau T, Alexander JW, Perren SM. The effects of antibiotic-impregnated autogenic cancellous bone graft on bone healing. *Clin Orthop Res.* 1993; 91:303-12.

42 – Beardmore AA, Brooks DE, Wenke JC, Thomas BD. Effectiveness of local antibiotic delivery with an osteoinductive and osteoconductive bone-graft substitute. *J Bone and Joint Surg Am.* 2005; 87:107-12.

43 – Thomas DB, Brooks DE, Bice TG, et al. Tobramycin-impregnated calcium sulfate prevents infection in contaminated wound. *Clin Orthop Relat Res.* 2005; 441: 366-71.

44 – Darouiche RO, Farmer J, Chaput C, et al. Anti-infective efficacy of antiseptic-coated intramedullary nails. *J Bone Joint Surg Am.* 1998; 80:1336-40.

45 – Orhan Z, Cevher E, Mulazimoglu L, et al. The preparation of ciprofloxacin hydrochloride-loaded chitosan and pectin microspheres. *J Bone Joint Surg Br.* 2006; 88-B: 270-5.

46 – Smith JK, Bumgardner JD, Courtney HS, et al. Antibiotic-loaded chitosan film for infection prevention: A preliminary in vitro characterization. *J Biomedical Material Research B: Applied Biomaterials.* 2010; 94B (1): 203-11.

47 – El-Husseiny M, Patel S, MacFarlane RJ, Haddad FS. Aspects of current management. Biodegradable antibiotic delivery systems. *J Bone Joint Surg Br.* 2011; 93-B:151-57.

48 – Muzzarelli R, Tarsi R, Fillippini O, et al. Antimicrobial properties of N-carboxybutyl chitosan. *Antimicrob Agents Chemother.* 1990; 34:2019-23.

49 – Illum L. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. *Pharm Res.* 1998; 15: 1326-31.

50 – Tikhonov VE, Yamskov IA, Varlamov VP, et al. Chitinolytic digestibility of cross-linked chitosan gels by an enzyme complex from *Streptomyces Kurssanovii*. *Biotechnol Appl Biochem.* 1993; 17:251-6.

51 – Aimin C, Chunlin H, Juliang B, et al. Antibiotic loaded chitosan bar. An in vitro, in vivo study as a possible treatment for osteomyelitis. *Clin Orthop Relat Res.* 1999; (366):239-47.

52 – Anglen JO, Apostoles S, Christensen G, Gainor B. The efficacy of various irrigation solutions in removing slime-producing *Staphylococcus*. *J Orthop Trauma.* 1994; 8:390-6.

53 – Bhandari M, Adili A, Schemitsch EH. The efficacy of low-pressure lavage with different irrigating solutions to remove adherent bacteria from bone. *J Bone Joint Surg Am.* 2001; 83:412-9.

54 – Worlock P, Slack R, Harvey L, MAwhinney R. The prevention of infection in open fractures: an experimental study of the effect of fracture stability. *Injury.* 1994; 25:31-8.

55 – Govender S, Csimá C, Genant HK, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients. *J Bone Joint Surg Am.* 2002; 84:2123-34.

56 – Butalia S, Palda VA, Sargeant RJ, et al. Does this patient with diabetes have osteomyelitis of the lower extremity? *J Am Med Assoc.* 2008; 299:806-13.

ANEXO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 240/2011**, relativo ao projeto intitulado "**Avaliação da eficácia do tratamento de fraturas expostas através da liberação do local de antibiótico utilizando o filme de quitosana: estudo experimental "in vivo"**", que tem como responsável(is) **Ivana Duval de Araujo**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **7/ 12/2011**.

Este certificado expira-se em **7/ 12/ 2016**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 240/2011**, related to the project entitled "**Evaluating the effectiveness of treatment of open fractures with antibiotics local liberation using chintosan film: an experimental study "in vivo"**", under the supervisors of **Ivana Duval de Araujo**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **December 7, 2011**.


This certificate expires in **December 7, 2016**.

Belo Horizonte, 12 de Dezembro de 2011.

Profª. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite
Coordenadora do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

ANEXO

	<p style="text-align: center;">UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA</p>	<p style="text-align: center;">UFMG</p>
---	--	--

ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DO ALUNO LINCOLN PAIVA COSTA


Realizou-se, no dia 31 de março de 2014, às 14:00 horas, Faculdade de Medicina da UFMG, sala 333, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de dissertação, intitulada *AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA MEMBRANA DE QUITOSANA IMPREGNADA OU NÃO COM CIPROFLOXACINO NA PROFILAXIA DA OSTEOMIELEITE EM FRATURAS EXPOSTAS: ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS.*, apresentada por LINCOLN PAIVA COSTA, número de registro 2012655372, graduado no curso de MEDICINA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Ivana Duval de Araujo - Orientador (UFMG), Prof(a). Luiz Eduardo Moreira Teixeira (UFMG), Prof(a). Ubiratan Brum de Castro (UFMG), Prof(a). Carlos Roberto Galia (UFRGS).

A Comissão considerou a dissertação:


Aprovada

Reprovada


Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.
Belo Horizonte, 31 de março de 2014.


Prof(a). Ivana Duval de Araujo (Doutor)

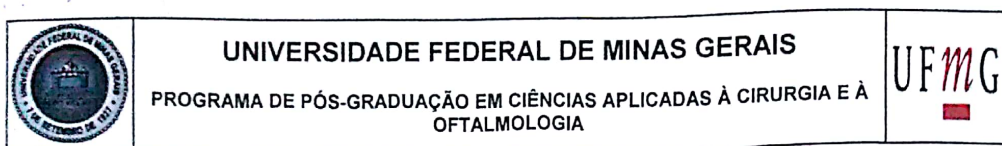

Prof(a). Luiz Eduardo Moreira Teixeira (Doutor)


Prof(a). Ubiratan Brum de Castro (Doutor)


Prof(a). Carlos Roberto Galia (Doutor)


CONFÉRE O VOTO ORIGINAL
Centro de Pós-Graduação
Faculdade de Medicina - UFMG

ANEXO



FOLHA DE APROVAÇÃO

AValiação DA EFICÁCIA DA MEMBRANA DE QUITOSANA IMPREGNADA OU NÃO COM CIPROFLOXACINO NA PROFILAXIA DA OSTEOMIELEITE EM FRATURAS EXPOSTAS: ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS.

LINCOLN PAIVA COSTA

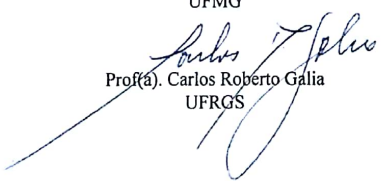
Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA, como requisito para obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA, área de concentração CICATRIZAÇÃO, linha de pesquisa Fatores

Aprovada em 31 de março de 2014, pela banca constituída pelos membros:


Prof(a). Ivana Duval de Araujo - Orientador
UFMG


Prof(a). Luiz Eduardo Moreira Teixeira
UFMG


Prof(a). Ubiratan Brum de Castro
UFMG


Prof(a). Carlos Roberto Galia
UFRGS

Belo Horizonte, 31 de março de 2014.