

Fratura em fêmur irradiado de rato: Descrição de um modelo experimental e avaliação de sua eficácia

Fracture in Irradiated Rat Femur: A Description of an Experimental Model and Evaluation of its Effectiveness

Cláudio Beling Gonçalves Soares¹ Ivana Duval de Araújo² Luiz Eduardo Moreira Teixeira²
Márcia Antoniazzi Michelin³ Carla Jorge Machado² Marcelo Peixoto Silveira⁴

¹Médico Preceptor, Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina Federal, Universidade de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil

²Professor, Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal, Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil

³Professor, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Instituto de Oncologia, Uberaba, MG, Brasil

Rev Bras Ortop 2023;58(4):e653–e658.

Endereço para correspondência Cláudio Beling Gonçalves Soares, MD, Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Professor Alfredo Balena, 190 - Santa Efigênia. Belo Horizonte, MG 30130-100, Brasil
(e-mail: claudiobeling@gmail.com).

⁴Médico Ortopedista, Departamento de Ortopedia, Faculdade de Medicina, Universidade de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil

Resumo

Objetivo Nosso objetivo é descrever um modelo experimental para estudo de fraturas de fêmur em ratos após exposição a radiação ionizante, demonstrando uma forma de aplicação de uma substância para análise, o método de padronização de fratura e irradiação e a forma de avaliação de sua eficácia com base em estudos radiográficos.

Métodos Utilizamos 24 ratos divididos em dois grupos de 12 animais cada. O grupo ESTUDO foi exposto à radiação ionizante e tratado com soro fisiológico, enquanto o grupo CONTROLE não foi exposto à radiação e foi tratado com soro fisiológico. Todos os animais foram submetidos à fratura padronizada do fêmur direito e sua fixação com fio intramedular. A eficácia da consolidação óssea foi determinada por exame radiográfico.

Resultados A cicatrização de fraturas foi mais eficiente em ossos não expostos à radiação ionizante ($p = 0,012$). Todas as fraturas atenderam aos critérios de serem simples, diafisárias, transversas ou oblíquas curtas.

Conclusão O modelo experimental apresentado é uma boa alternativa para o estudo de fraturas em ossos irradiados em ratos.

Palavras-chave

- ▶ consolidação da fratura
- ▶ efeitos da radiação
- ▶ fraturas espontâneas
- ▶ radioterapia

Abstract

Objective We aim to describe an experimental model for studying femoral fractures in rats after exposure to ionizing radiation, demonstrating a way to apply a substance for analysis, the method for patterning fracture and irradiation, and how to evaluate its effectiveness based on radiographic studies.

Methods We used 24 rats divided into 2 groups of 12 animals each. The STUDY group was exposed to ionizing radiation and treated with saline solution, and the CONTROL group was not exposed to radiation and was treated with saline solution. All animals were subjected to

Keywords

- ▶ fracture healing
- ▶ radiation effects
- ▶ radiotherapy
- ▶ fractures, spontaneous

recebido
02 de Junho de 2022
aceito
12 de Setembro de 2022

DOI <https://doi.org/10.1055/s-0042-1758359>.
ISSN 0102-3616.

© 2023. Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia. All rights reserved.
This is an open access article published by Thieme under the terms of the Creative Commons Attribution-NonDerivative-NonCommercial-License, permitting copying and reproduction so long as the original work is given appropriate credit. Contents may not be used for commercial purposes, or adapted, remixed, transformed or built upon. (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)
Thieme Revinter Publicações Ltda., Rua do Matoso 170, Rio de Janeiro, RJ, CEP 20270-135, Brazil

standardized fracture of the right femur that was fixed with intramedullary wire. The efficiency of the bone union was assessed by radiographic exam.

Results Fracture healing was more efficient in bones not exposed to ionizing radiation ($p = 0.012$). All fractures met the criteria of being simple, diaphyseal, transverse or short oblique.

Conclusion The experimental model presented is an efficient alternative for the study of fractures in irradiated bones in rats.

Introdução

A radioterapia é uma importante ferramenta terapêutica principalmente para o controle local de tumores. É utilizada no tratamento de diversas patologias oncológicas, contribuindo para sua cura. No entanto, não é isenta de complicações. Os tecidos saudáveis expostos ao campo de ação sofrem alterações fisiológicas que podem provocar complicações de difícil resolução.¹

Especificamente no tecido esquelético, a radioterapia pode causar necrose, osteíte actínica, osteomielite e fraturas patológicas que podem evoluir para a ausência de consolidação. Embora estas complicações sejam descritas com frequência, pouco se sabe sobre sua etiologia e resolução.¹

Alguns estudos abordam fraturas em ossos irradiados.^{2,3} Tais pesquisas, porém, não descrevem o método utilizado para a irradiação e criação das fraturas. Um modelo experimental deve ser reprodutível e padronizar tanto quanto possível as variáveis a serem estudadas.

Nosso objetivo é descrever um modelo experimental para estudo de fraturas de fêmur em ratos após exposição a radiação ionizante, demonstrando uma forma de aplicação da substância para análise, o método de padronização da fratura e da irradiação e a avaliação de sua eficácia com base em estudos radiográficos.

Método

O presente estudo começou após a autorização do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA). Esta autorização é identificada pelo protocolo 40/2014.

Nosso estudo utilizou 24 ratas Wistar fêmeas, com 3 meses de idade, que foram divididas em 2 grupos de 12 animais. Os animais do grupo ESTUDO foram submetidos a uma sessão de radioterapia e receberam 0,3 mL de solução fisiológica no local da fratura. O grupo CONTROLE não foi submetido à radioterapia e recebeu 0,3 mL de soro fisiológico no foco da fratura.

Qualquer procedimento que pudesse causar sofrimento físico ou emocional aos animais foi realizado sob anestesia. A anestesia foi composta pela administração intraperitoneal de cloridrato de cetamina em dose de 60 mg/kg e cloridrato de xilazina em dose de 15 mg/kg.

Irradiação

A irradiação foi realizada no Laboratório de Irradiação Gama do Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear/

Comissão Nacional de Energia Nuclear (LIG-CDTN/CNEN). O laboratório utiliza um irradiador panorâmico multiuso de categoria II, fabricado por MDS Nordion (Canadá), modelo/número de série IR-214 e tipo GB-127, equipado com fonte de armazenamento a seco de Cobalto-60 (60Co) com atividade máxima de 2.200 TeraBequerel (TBq) ou 60.000 Curio (Ci) (►Fig. 1)

O foco do feixe radioativo foi direcionado para a área do fêmur direito. A dose de radiação, com exposição da área a ser estudada à fonte de 60Co, foi de 18 Gy(2), em dose única em profundidade de 1,5 cm. Os animais foram colocados a 30 cm de distância da fonte radioativa e expostos por 77 segundos.

Como esse é um irradiador panorâmico, a radiação foi direcionada para o fêmur direito das ratas por meio de blindagens de chumbo desenvolvidas especificamente para esta finalidade. Estas blindagens possuíam orifícios de 5 cm de diâmetro que direcionavam a radiação exclusivamente para o fêmur direito dos animais (►Fig. 1).

Fratura da Diáfise do Fêmur

Duas semanas após a irradiação, os animais foram submetidos a fratura diafisária do fêmur direito. Para padronizar o tipo de fratura, usamos uma guilhotina desenvolvida especificamente para este fim, que produziu uma fratura diafisária transversa ou oblíqua curta, semelhante em todos os animais (►Fig. 2).

A guilhotina era composta por um peso de aço inoxidável de 1,3 kg que percorria um trilho de 50 cm, acelerado pela força da gravidade. O impacto era amortecido por uma mola, também em aço inoxidável, com 6,0 cm de altura. O impacto era transmitido ao fêmur dos animais pela lâmina da guilhotina, que possuía ponta romba. O fêmur era posicionado sobre suportes, também de aço, espaçados a cada 2,5 cm.

Fixação da Fratura Femoral

Os animais foram anestesiados e submetidos a redução cirúrgica da fratura diafisária do fêmur. Depois da anestesia, realizamos a tricotomia do sítio cirúrgico e a assepsia cutânea com solução alcoólica de digluconato de clorexidina a 5%. O acesso cirúrgico longitudinal foi realizado na face lateral da coxa, com abertura da pele e da musculatura da coxa do animal. A abertura da musculatura expôs a fratura.

A fratura foi fixada com fio de Kirschner de 1 mm de diâmetro e fechada por sutura em planos. Primeiro, fechamos a musculatura e, depois, procedemos à sutura da pele. A

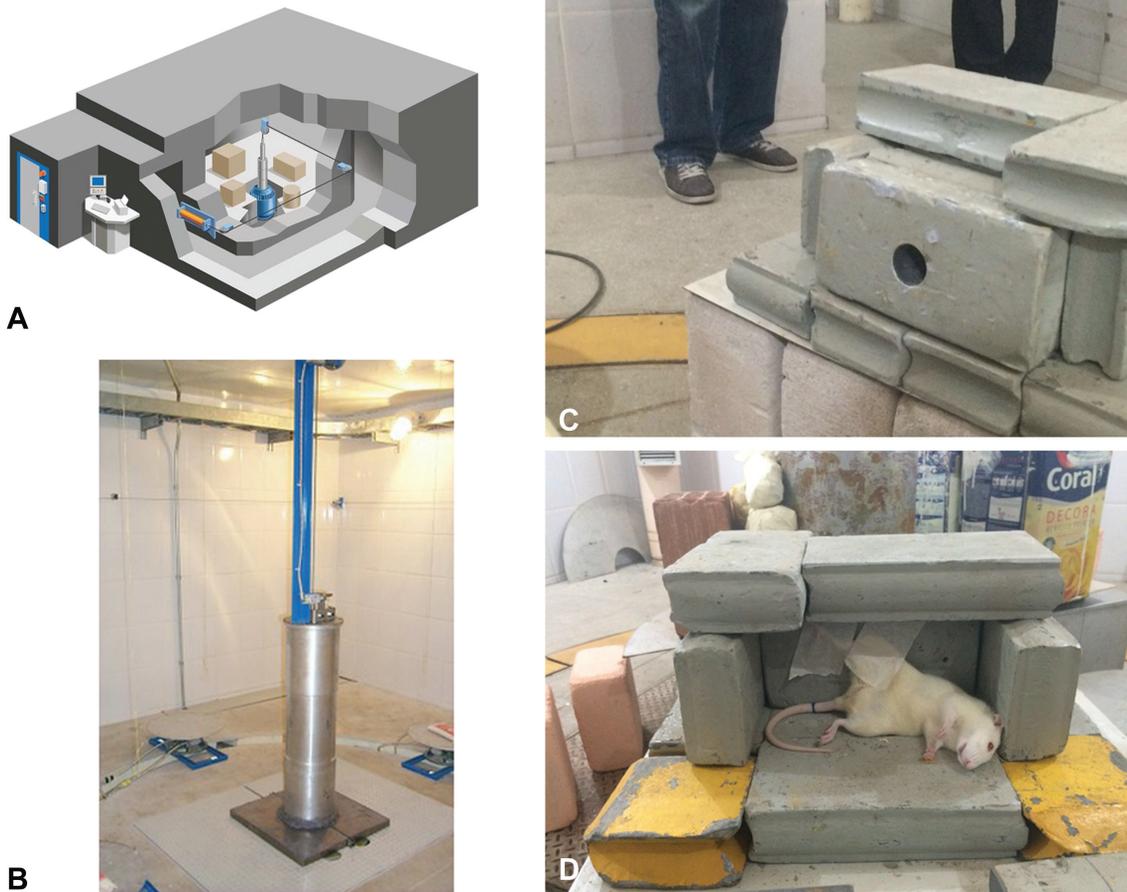


Fig. 1 Método de irradiação. (A) Planta tridimensional da sala do colimador; (B) Fonte de cobalto-60; (C) Blindagens de chumbo para direcionamento do feixe radioativo; (D) Animal anestesiado e posicionado para o procedimento.



Fig. 2 Guilhotina desenvolvida para fraturas diafisárias do fêmur. À esquerda, toda a estrutura pode ser vista. No centro, um detalhe do peso no final do trilho. À direita, a ponta da guilhotina com simulação da geração de fraturas.

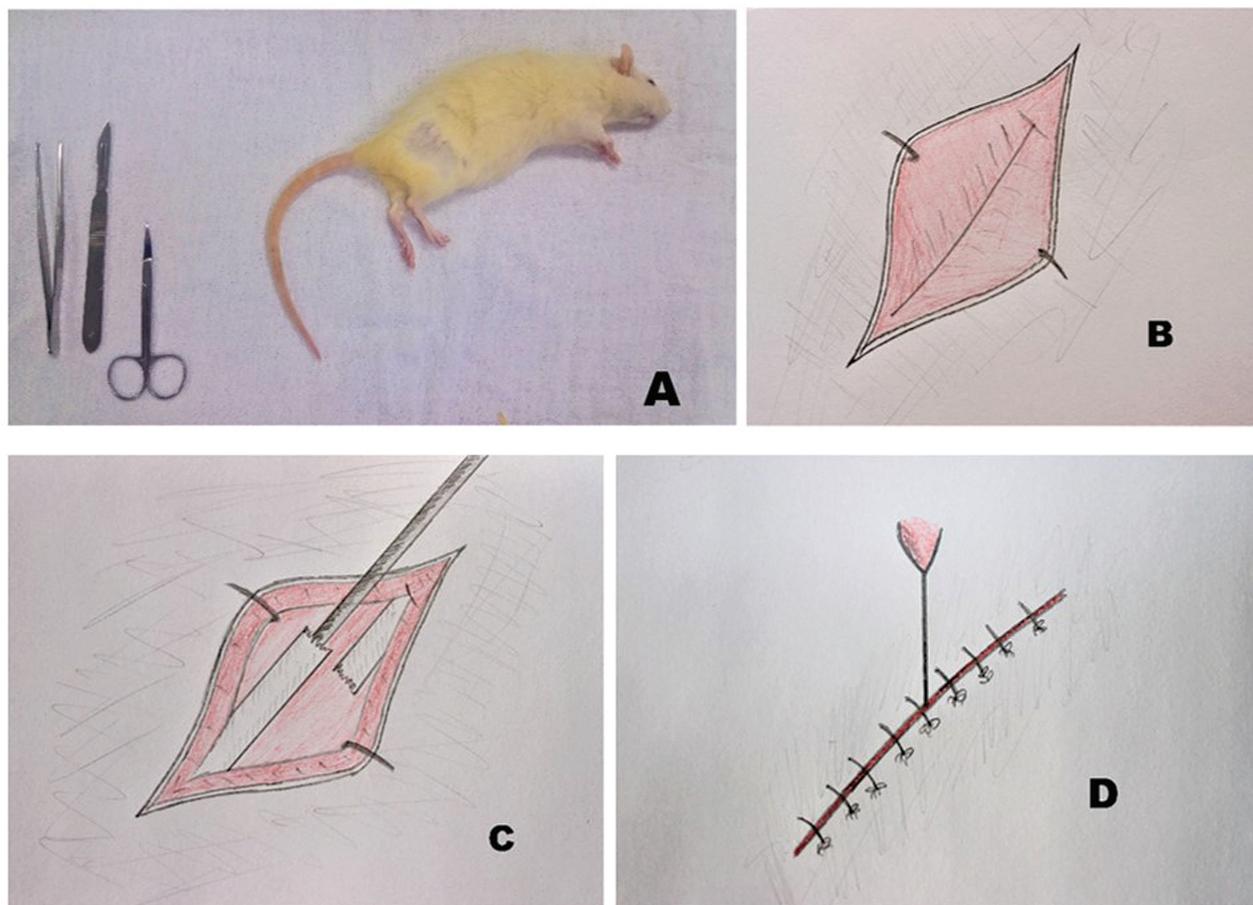


Fig. 3 Exemplo do procedimento cirúrgico realizado em animais. (A) Animal anestesiado, tricotomizado e preparado para o procedimento cirúrgico. (B) Representação esquemática do acesso cirúrgico nos planos cutâneo e muscular. (C) Representação esquemática com exposição do foco de fratura e fixação com fio intramedular liso. (D) Representação esquemática da ferida após o fechamento e administração de solução fisiológica.

seguir, fizemos uma infiltração com 0,3 mL de solução de cloreto de sódio a 0,9%. A solução fisiológica pode substituir qualquer substância a ser estudada. A ►**Fig. 3** traz um esquema do procedimento cirúrgico.

Estudo Radiográfico

Três semanas após a fratura, os animais foram submetidos a eutanásia e remoção do fêmur direito. Os exames de imagem foram compostos por radiografias digitais. O fêmur direito retirado foi colocado em solução de formalina tamponada a 10% por 5 dias e, depois, radiografado.

As radiografias digitais foram realizadas em equipamento radiográfico (Raiotécnica, modelo 30 × 60, série 2577) acoplado a um processador AGFA (modelo CR30X). As imagens foram impressas por uma impressora OKI (modelo C911 MDI). As radiografias foram realizadas em dose de 40 quilovolts (kV), 2 mAs a 1 m de distância da fonte de raios X, em ambiente climatizado a 20°C.

As radiografias foram avaliadas quanto à presença da fratura, ao seu grau de cominuição, à sua localização e à sua evolução até a consolidação óssea. Fraturas cominutivas ou segmentares seriam excluídas e apenas fraturas simples, transversas ou oblíquas curtas foram incluídas no estudo.

A classificação de Lane-Sandhu^{4,5} foi utilizada para medir o grau de consolidação das fraturas à radiografia: (0) ausência completa de consolidação; (1) início da formação de calos ósseos; (2) início da ossificação; (3) início do desaparecimento da linha de fratura; (4) consolidação completa da fratura. A ►**Fig. 4** discrimina essa classificação.

Para fins estatísticos, os tipos 0 e 1 foram agrupados como “consolidação insuficiente” e os tipos 2, 3 e 4, como “consolidação suficiente”.

Análise Estatística

Os dados foram comparados com IBM SPSS Statistics for Windows versão 22 (IBM Corp., Armonk, NY, EUA). A comparação foi feita com o teste de qui-quadrado e correção de Fisher. Estabelecemos um poder de teste de 80%, com intervalo de confiança (IC) de 5%. O valor-p foi determinado como < 0,05.

A avaliação da eficácia do método no estudo de fraturas em ossos irradiados foi baseada na comparação da consolidação entre os grupos. Um grupo com maior número de amostras com consolidação ineficiente indica que o método é eficaz. A análise do método de padronização das fraturas foi baseada na frequência de obtenção de fraturas cominutivas, pois queríamos fraturas transversais ou oblíquas curtas.

Lane–Sandhu Scoring System		
Type	Description	Consolidation
0	Complete absence of healing	Insufficient
1	Initial callus formation	Insufficient
2	Initial ossification	Sufficient
3	Initial disappearance of the fracture line	Sufficient
4	Completer fracture healing	Sufficient

A



B

Fig. 4 Classificação radiográfica da consolidação de fraturas em ratos. (A) Exemplo radiográfico de consolidação. (B) À esquerda: radiografia do animal número 20, classificada como tipo “1”, ou seja, consolidação insuficiente. Ao centro: radiografia do animal número 4, classificada como tipo “3”, ou seja, consolidação suficiente. À direita: peça anatômica no momento da radiografia.

Resultados

A cicatrização da fratura, avaliada por exames radiográficos, foi mais eficiente em ossos não expostos à radiação ionizante ($p = 0,012$). No grupo ESTUDO, dos 12 animais, 10 apresentaram consolidação insuficiente. No grupo CONTROLE, três dos 12 animais apresentaram consolidação insuficiente (► **Tabela 1**, ► **Fig. 5**).

Todas as fraturas atenderam aos critérios de serem simples, diafisárias, transversas ou oblíquas curtas.

Discussão

As fraturas são complicações frequentes da radioterapia. Este assunto, no entanto, é pouco estudado. A criação de um modelo experimental reprodutível tem grande potencial para ajudar a preencher esta lacuna na literatura. O desenvolvimento de um método acessível, padronizando variáveis como tipo de fratura, dose e direção do feixe de irradiação, processamento da amostra e sua disponibilidade para estudos de imagem ou histologia são importantes para o estudo deste problema.

O animal ideal para estudos experimentais de fraturas de ossos longos é o rato (*Rattus norvegicus*).⁶ O rato é capaz de reproduzir o processo de cicatrização do tecido ósseo

Tabela 1 Resultados e análise estatística dos dados referentes à classificação radiográfica

Avaliação radiográfica	Estudo	Controle	valor-p
Insuficiente	10 (83,3%)	03 (25,0%)	0,012
Suficiente	02 (16,7%)	09 (75,0%)	



Fig. 5 Exemplos de radiografias de animais de cada grupo. À esquerda: radiografia típica dos animais do grupo ESTUDO, classificada como tipo “0” (insuficiente). À direita: exemplo de imagem típica do grupo CONTROLE, classificada como tipo “3” (suficiente).

humano e tem ossos longos o suficiente para estudos baseados em um modelo experimental padronizado. No nosso estudo, utilizamos fêmeas Wistar com 3 meses de idade. Estes animais têm ossos longos de tamanho suficiente para a manipulação adequada em laboratório.

No nosso estudo, observamos diferenças na consolidação das fraturas ao comparar os grupos. Os animais do grupo ESTUDO tiveram consolidação menos eficiente do que os do grupo CONTROLE. Como a única diferença entre eles é a exposição do fêmur à radiação ionizante, este resultado sugere que o método é eficiente para a reprodução experimental da fratura que ocorre em ossos irradiados.

Existem algumas alternativas à exposição dos tecidos à radiação ionizante. A maioria das publicações usa um aparelho específico de radioterapia hospitalar. No nosso modelo, utilizamos um irradiador panorâmico com fonte de Co60 e direcionamento do feixe radioativo por blindagens de chumbo. Desta forma, usamos o mesmo isótopo radioativo que a maioria dos aparelhos de radioterapia. A eficácia deste método foi comprovada pela diferença relevante na consolidação das fraturas nos grupos ESTUDO e CONTROLE em exames radiográficos.

Nossos resultados também indicam a eficácia dos parâmetros empregados. Destacamos a exposição única e a dose de radiação utilizada. Utilizamos uma dose única de 18 Gy em profundidade de 1,5 cm. Esta foi a mesma dose usada por Nicholls et al.,² também com eficácia comprovada.

Uma importante limitação deste modelo experimental é sua diferença em relação à patologia observada em humanos. Aqui, apresentamos uma forma de estudar a consolidação de uma fratura em um osso previamente irradiado, que é diferente de uma fratura patológica pós-radioterapia. Em humanos, a fratura se deve à falha mecânica, provavelmente relacionada a fatores como necrose tecidual e resposta inflamatória local, e ocorre após um período longo.^{1,7,8}

A metodologia aplicada para a simulação de fraturas é um ponto importante do presente estudo. Outros modelos publicados não descrevem como as fraturas foram padronizadas.^{2,9,10} Parece-nos relevante que as fraturas tenham o

mesmo padrão. Conseguimos esta padronização usando uma guilhotina projetada especificamente para isto. Todas as fraturas obtidas foram diafisárias transversas ou oblíquas curtas, o que demonstra a boa padronização de seu tipo. Portanto, recomendamos o uso deste método para a padronização da fratura do fêmur.

O tratamento cirúrgico das fraturas foi composto por redução aberta e fixação intramedular com fio de Kirschner de 1,0 mm de espessura. Em nossa experiência, a fixação intramedular retrógrada é eficiente para a estabilização da fratura e promove sua consolidação. O intervalo entre a fratura e a eutanásia dos animais foi de 3 meses. Este tempo é suficiente para a consolidação inicial da fratura. Acreditamos que este seja o período ideal para avaliação dos resultados em ratos.

Após o fechamento da ferida cirúrgica, infiltramos 0,3 mL de solução fisiológica no sítio da fratura. Esta infiltração no foco da fratura pode ser usada em estudos para análise da eficácia de qualquer composto.

Optamos por avaliar os desfechos com base em exames radiográficos digitais. Existem outras formas de avaliação das amostras obtidas.^{3,11,12} Estas amostras podem ser descalcificadas e colocadas em blocos de formol para estudo histológico caso esta seja a opção escolhida.

Há algumas opções para o estudo experimental de fraturas em ossos irradiados. A utilização de uma fonte de cobalto-60 direcionada por blindagens de chumbo para o ponto a ser estudado, com padronização da dose de radiação, o método de geração da fratura, sua fixação e a forma de administração do material a ser estudado são pontos centrais para a redução de fatores de confusão. Aqui apresentamos um método eficiente e reprodutível para este fim.

Conclusões

1. O método de irradiação apresentado é uma boa alternativa para o estudo de fraturas em ossos irradiados de ratos.
2. O método de padronização das fraturas foi eficiente, produzindo fraturas diafisárias transversais ou oblíquas.

Suporte Financeiro

A presente pesquisa foi parcialmente financiada pela Rede de Oncologia da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (REONCO-FAPEMIG).

Conflito de Interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Instituição / Laboratório

O presente artigo é parte de uma tese de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas em Cirurgia e Oftalmologia: Área de Concentração 1: Fatores Intervenientes na Cicatrização, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais. Orientadores: Profa. Dra. Ivana Duval de Araújo e Prof. Dr. Luiz Eduardo Moreira Teixeira.

Este é um estudo colaborativo entre a Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (-FM/UFMG), o Instituto de Pesquisa em Oncologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (IPON/UFTM) e o Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear/ Comissão Nacional de Energia Nuclear (CDTN/CNEN).

Referências

- 1 Soares C, Araújo I, Pádua B, Vilela C, Souza R, Teixeira L. Fratura patológica após radioterapia: Revisão sistemática da literatura. *J Brazilian Med Assoc* 2019;65(06):902-908
- 2 Nicholls F, Ng AH, Hu S, et al. Can OP-1 stimulate union in a rat model of pathological fracture post treatment for soft tissue sarcoma? *J Orthop Res* 2014;32(10):1252-1263
- 3 Nicholls F, Janic K, Filomeno P, Willett T, Grynypas M, Ferguson P. Effects of radiation and surgery on healing of femoral fractures in a rat model. *J Orthop Res* 2013;31(08):1323-1331
- 4 Lane JM, Sandhu HS. Current approaches to experimental bone grafting. *Orthop Clin North Am* 1987;18(02):213-225
- 5 Dokmeci M, Kalender A, Sevimli R, Korkmaz M, Bilal O. The effect of ibandronate on fracture healing in rat tibia model. *SM J Orthop* 2016;2(04):1041
- 6 Damy SB, Camargo RS, Chammas R, Figueiredo LF. Aspectos fundamentais da experimentação animal - aplicações em cirurgia experimental. *Rev Assoc Med Bras* 2010;56(01):103-111
- 7 Blaes AH, Lindgren B, Mulrooney DA, Willson L, Cho LC. Pathologic femur fractures after limb-sparing treatment of soft-tissue sarcomas. *J Cancer Surviv* 2010;4(04):399-404
- 8 Gortzak Y, Lockwood GA, Mahendra A, et al. Prediction of pathologic fracture risk of the femur after combined modality treatment of soft tissue sarcoma of the thigh. *Cancer* 2010;116(06):1553-1559
- 9 Kerimoğlu S, Livaoglu M, Sönmez B, et al. Effects of human amniotic fluid on fracture healing in rat tibia. *J Surg Res* 2009;152(02):281-287
- 10 Karaçal N, Koşucu P, Cobanglu U, Kutlu N. Effect of human amniotic fluid on bone healing. *J Surg Res* 2005;129(02):283-287
- 11 Aydin H, Saraçoğlu M, Kerimoğlu G, Kerimoğlu S, Topbaş M [Effects of human amniotic fluid on posterolateral spinal fusion: an experimental preliminary study]. *Eklemler Hastalıkları Cerrahisi* 2011;22(03):166-171
- 12 Bostrom MP, Saleh KJ, Einhorn TA. Osteoinductive growth factors in preclinical fracture and long bone defects models. *Orthop Clin North Am* 1999;30(04):647-658