

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**ADRIANO ZAHDI CAVASSIM**

**EFEITO DA LEVOFLOXACINA NA CICATRIZAÇÃO DO TENDÃO DE AQUILES  
DE RATOS: ANÁLISE TENSIMÉTRICA E DA DEPOSIÇÃO DO COLÁGENO**

**CURITIBA**

**2011**

**ADRIANO ZAHDI CAVASSIM**

**EFEITO DA LEVOFLOXACINA NA CICATRIZAÇÃO DO TENDÃO DE AQUILES  
DE RATOS: ANÁLISE TENSIO MÉTRICA E DA DEPOSIÇÃO DO COLÁGENO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica, Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Ligocki Campos  
Coordenador: Prof. Dr. Antônio Carlos Ligocki Campos

**CURITIBA**

**2011**

Cavassim, Adriano Zahdi

Efeito da levofloxacina na cicatrização do tendão de Aquiles de ratos: análise tensiométrica e da deposição do colágeno / Adriano Zahdi Cavassim. Curitiba, 2011.

75 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Antônio Carlos Ligocki Campos

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica. Área de Concentração: Nutrição e Cicatrização em Cirurgia. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

1. Levofloxacina. 2. Cicatrização do tendão. 3. Colágeno. 4. Resistência tênsil. I. Título. II. Campos, Antônio Carlos Ligocki.

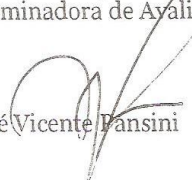
NLM:WE 880



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA CIRÚRGICA  
NÍVEIS: MESTRADO E DOUTORADO

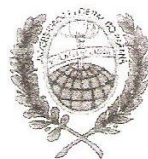
Ata do julgamento da 356ª dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná, referente ao aluno **ADRIANO ZAHDI CAVASSIM** com o título EFEITO DA LEVOPLOXACINA NA CICATRIZAÇÃO DO TENDÃO DE AQUILES DE RATOS: ANÁLISE TENSIO MÉTRICA E DA DEPOSIÇÃO DO COLÁGENO, na **Linha de Pesquisa:** CICATRIZAÇÃO E MEDIDAS DE RESISTÊNCIA DOS TECIDOS na **Área de Concentração:** NUTRIÇÃO E CICATRIZAÇÃO EM CIRURGIA, tendo como orientador Prof. Dr. Antonio Carlos L. Campos.

Às sete horas e trinta minutos do dia dez de fevereiro de dois mil e onze, no auditório da CAD no 7º andar do prédio central sala 701 do Hospital de Clínicas, reuniu-se, em sessão pública, a Banca Examinadora de Avaliação composta pelos Professores Doutores José Vicente Pansini, Jamil Faissal Soni e Luiz Antonio Munhoz da Cunha sendo este último Presidente da Banca. Aberta a sessão, foi apresentada pelo Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias, Vice-coordenador do Programa, a documentação probatória do cumprimento pelo candidato das exigências legais que lhe facultam submeter-se à avaliação da dissertação como última etapa à sua titulação no Programa. A seguir o Presidente da Banca Examinadora de Avaliação convidou o candidato a apresentar oralmente resumo de sua dissertação no prazo máximo de trinta minutos para demonstração de sua capacidade didática e para melhor conhecimento do tema por parte da audiência composta de professores, médicos, alunos, familiares e demais interessados. Seguiu-se a arguição e imediata resposta pelo candidato, sucessivamente pelos componentes da Banca Examinadora. Obedecido o tempo máximo de vinte minutos para a arguição e igual tempo para cada resposta. Terminada a etapa de arguição, reuniu-se a Banca Examinadora em sala reservada para atribuição das notas, dos conceitos e lavratura do Parecer Conjunto. O candidato foi considerado **APROVADO** considerando-se os parâmetros vigentes estabelecidos pelo programa e regidos pela legislação pertinente da instituição. Voltando à sala de sessão, o Senhor Presidente da Banca Examinadora leu os conceitos do Parecer Conjunto e deu por encerrada a sessão. E para que tudo conste, foi lavrada a presente Ata, que será assinada pelos seguintes componentes da Banca Examinadora de Avaliação.

  
José Vicente Pansini

  
Jamil Faissal Soni

  
Luiz Antonio Munhoz da Cunha



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA CIRÚRGICA  
NÍVEL MESTRADO - DOUTORADO

**PARECER CONJUNTO DA BANCA EXAMINADORA  
DA AVALIAÇÃO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

Aluno **ADRIANO ZAHDI CAVASSIM**

Titulo da Dissertação: EFEITO DA LEVOFLOXACINA NA CICATRIZAÇÃO DO TENDÃO DE AQUILES DE RATOS: ANÁLISE TENSIOMÉTRICA E DA DEPOSIÇÃO DO COLÁGENO.

**CONCEITOS EMITIDOS:**

Prof. Dr. José Vicente Pansini	conceito A	equivalência 10
Prof. Dr. Jamil Faissal Soni	conceito A	equivalência 10
Prof. Dr. Luiz Antonio M. da Cunha	conceito A	equivalência 10

**CONCEITO FINAL DE AVALIAÇÃO:**

Conceito: A Equivalência: 10,0 (dez)

Curitiba, 10 de fevereiro de 2011.

José Vicente Pansini \_\_\_\_\_

Jamil Faissal Soni \_\_\_\_\_

Luiz Antonio Munhoz da Cunha \_\_\_\_\_

Aos meus pais, Regina, exemplo de determinação, e Aristeu, exemplo de abnegação, meus maiores motivadores, minha eterna gratidão.

Para Michele, minha esposa, companheira, pela compreensão, paciência e ajuda durante toda a realização deste projeto.

Aos meus irmãos Maristela e Vinicius pelo grande amor que nos une.

## **AGRADECIMENTOS**

A DEUS, por mais uma etapa.

À CAPES e à Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade de crescimento científico.

Ao PROF. DR. ANTÔNIO CARLOS LIGOCKI CAMPOS, por mostrar-me o melhor caminho em todas as fases da realização deste projeto, pela confiança e incentivo.

À DRA. DANIELLE GIACOMETTI SAKAMOTO e ao Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas da UFPR, pela valiosa contribuição para as análises histológicas.

Ao DR. JOÃO OTÁVIO RIBAS ZAHDI e DR. FELIPE FERNANDES MONTEIRO, pela importante contribuição na execução dos experimentos.

À DRA. ALESSANDRA BORGES BRANCO, pelas orientações na realização do experimento.

À secretária do Programa de Pós-Graduação, REGINA SASS, pela ajuda em diferentes fases deste trabalho.

Ao grande amigo PROF. DR. GILSON LOTÁRIO ZAHDI, por abrir-me os caminhos da ortopedia.

Ao amigo PROF. DR. JOSÉ VICENTE PANSINI, por despertar o interesse pela cirurgia do pé e tornozelo, ensinar-me tanto sobre esta área e pelas inúmeras oportunidades criadas.

Ao PROF. DR. RICARDO CARDENUTO FERREIRA, modelo de dedicação aos pacientes e à ortopedia, pela grande amizade durante todo tempo em que aprendi no Pavilhão Fernandinho Simonsen na Santa Casa de São Paulo.

Ao meu irmão VINICIUS, pela inestimável ajuda na execução deste e de tantos outros projetos, sem você o caminho teria sido mais árduo e incerto, minha profunda gratidão.

A todos os meus familiares e amigos, que sempre estiveram ao meu lado.

Concedei-me, Senhor, a serenidade necessária  
para aceitar as coisas que não posso modificar,  
coragem para modificar aquelas que posso  
e sabedoria para distinguir umas das outras.



## RESUMO

**Título:** Efeito da levofloxacina na cicatrização do tendão de Aquiles de ratos: análise tensiométrica e da deposição do colágeno. **Introdução:** A levofloxacina tem ampla utilização na rotina diária para tratamento de infecções. Os efeitos adversos desse medicamento sobre os tendões, como tendinites e rupturas tendinosas, principalmente do tendão de Aquiles, tem ganhado especial atenção recentemente. **Objetivo:** Avaliar o efeito da utilização prévia da levofloxacina sobre a cicatrização do tendão de Aquiles de ratos submetidos à tenotomia e sutura, mediante os parâmetros tensiométricos e da densitometria do colágeno. **Materiais e método:** Oitenta ratos, Wistar, adultos, machos, com peso inicial de  $268,87 \pm 24,19\text{g}$ , foram aleatoriamente divididos em 4 grupos (C7, L7, C14 e L14), conforme a medicação fornecida/controle (L= levofloxacina, C= controle / água destilada) e conforme o dia do sacrifício (7= sétimo dia pós-operatório e 14= 14 dias pós-operatório). A dose padronizada de levofloxacina foi de  $100\text{mg/kg/dia}$  fornecida por sondagem orogástrica rígida uma vez ao dia aos animais dos grupos de estudo (L7 e L14) por um período de 7 dias. Os grupos controle receberam água destilada no volume fixo de  $10\text{ml/kg}$  de peso do animal por 7 dias. Ao final deste período, os animais foram submetidos à tenotomia do tendão de Aquiles, associando tenotomia do tendão do músculo plantar delgado, e submetidos à sutura término-terminal do tendão de Aquiles com um ponto de “Kessler” modificado e um ponto simples. Os animais não foram imobilizados no pós-operatório. Após 7 (grupos C7 e L7) e 14 (C14 e L14) dias da cirurgia, os animais foram sacrificados e os tendões de Aquiles D e E retirados para análise. O lado D foi submetido à análise tensiométrica e o lado E à análise qualitativa do colágeno. Todos os dados foram submetidos à análise estatística mediante estudo das médias, desvio e erro-padrão com teste de significância de Tukey e estudo não-paramétrico de Kaplan-Meyer e significância pelo teste de Logrank, considerando-se o nível de significância de 5%. **Resultados:** Na análise tensiométrica, a variável tensão máxima para os grupos de 7 dias, L7 e C7, apresentou valores médios similares ( $5,59 \pm 0,53 \text{ kgf/cm}^2$  vs  $5,28 \pm 0,64 \text{ kgf/cm}^2$  -  $p=1,0$ ). A média da tensão máxima do grupo L14 foi superior à do grupo C14 ( $10,06 \pm 1,62 \text{ kgf/cm}^2$  vs  $5,81 \pm 0,53 \text{ kgf/cm}^2$ ,  $p=0,014$ ). Para o teste não paramétrico de Logrank, os resultados foram similares aos descritos pelo teste de Tukey para a variável tensão máxima. A análise da força máxima para os grupos de 7 dias, L7 e C7, apresentou valores médios similares ( $1,10 \pm 0,10 \text{ kgf}$  vs  $1,04 \pm 0,13 \text{ kgf}$ ,  $p=0,989$ ). A média da força máxima do grupo L14 foi superior à do grupo C14 ( $2,34 \pm 0,32 \text{ kgf}$  vs  $1,10 \pm 0,13 \text{ kgf}$ ,  $p=0,005$ ). Para o teste não paramétrico de Logrank, os resultados foram similares aos descritos pelo teste de Tukey para a variável força máxima. Não houve diferença entre os grupos quanto à distribuição qualitativa do colágeno, L7 vs C7 ( $90,38 \pm 3,15\%$  vs  $81,41 \pm 4,56\%$  imaturo e  $9,63 \pm 3,15\%$  vs  $18,58 \pm 4,56\%$  maduro,  $p=0,525$  – teste de Tukey) e L14 vs C14 ( $70,88 \pm 5,04\%$  vs  $72,19 \pm 5,34\%$  imaturo e  $29,11 \pm 5,04\%$  vs  $27,79 \pm 5,34\%$  maduro,  $p=0,997$  – teste de Tukey). **Conclusão:** No modelo realizado, a levofloxacina interfere aumentando a força máxima e a tensão máxima no grupo de 14 dias. A levofloxacina não interfere, nos mesmos parâmetros, para o grupo de 7 dias. A levofloxacina não interfere no processo de maturação do colágeno.

**Palavras-chave:** Levofloxacina. Cicatrização do tendão. Colágeno. Resistência tênsil.

## ABSTRACT

**Title:** Effect of levofloxacin on the Aquiles tendon cicatrization in mice: tensiometric study and collagen densitometry. **Introduction:** Levofloxacin is widely used on a daily basis to treat infections. The adverse effects of this drug on tendons such as tendinitis and tendon ruptures, in particular the Achilles tendon, has received attention recently. **Objective:** To evaluate the effects of the levofloxacin on the Achilles tendon cicatrization in mice undergoing tenotomy and suture according to the tensiometric studies and the collagen densitometry. **Materials and methods:** eighty mice, Wistar, adults, male, with initial weight of  $268,87 \pm 24,19\text{g}$ , were randomly divided into 4 groups (C7, L7, C14 and L14) according to the given drug/control (L= levofloxacin, C = control / distilled water) and according to the sacrifice day ( 7 = 7<sup>th</sup> day post-surgery and 14 = 14<sup>th</sup> day post-surgery). The standard dose of levofloxacin was 100mg/kg/day and given through a rigid orogastric probe once a day to the animals from study groups (L7 and L14) for 7 days. The control groups received distilled water in a fixed volume of 10ml/kg of the body weight for 7 days. At the end of this period the animals were submitted to a tenotomy of the Achilles tendon, associated to the tenotomy of the Plantaris muscle and submitted to end-to-end suture of the Achilles tendon with a Kessler suture and a simple suture. The animals were not immobilized at the post-surgery period. After 7 (groups C7 and L7) and 14 (C14 and L14) days of the post-operative period the animals were sacrificed and the right and left Achilles tendons were removed for analyses. The right side was submitted to tensiometric analysis and the left side to qualitative analysis of collagen. All data were submitted to statistical analyses according to the average values, deviation and standard error with the Tukey range test and Kaplan-Meyer nonparametric statistics and by the significance Logrank test considering the significance level of 5%. **Results:** At the tensiometric analysis, the maximal tension for the 7 days, L7 and C7 groups, presented similar average values ( $5,59 \pm 0,53 \text{ kgf/cm}^2$  vs  $5,28 \pm 0,64 \text{ kgf/cm}^2$  -  $p=1,0$ ). The average of the maximal tension for the L14 group was higher than the C14 group ( $10,06 \pm 1,62 \text{ kgf/cm}^2$  vs  $5,81 \pm 0,53 \text{ kgf/cm}^2$ ,  $p=0,014$ ). For the nonparametric Logrank test the results were similar to the ones described at the Tukey's test for the maximal tension. The maximal tensile strength (kgf) analyses for the 7 day groups, L7 and C7 presented similar average values ( $1,10 \pm 0,10 \text{ kgf}$  vs  $1,04 \pm 0,13 \text{ kgf}$ ,  $p=0,989$ ). The average maximal tensile strength from group L14 was higher than the C14 group ( $2,34 \pm 0,32 \text{ kgf}$  vs  $1,10 \pm 0,13 \text{ kgf}$ ,  $p=0,005$ ). For the nonparametric Logrank test the results were similar to the ones described at the Tukey's test for the maximal tensile strength. There were no differences among the groups in relation to the qualitative distribution of the collagen, L7 vs C7 ( $90,38 \pm 3,15\%$  vs  $81,41 \pm 4,56\%$  immature and  $9,63 \pm 3,15\%$  vs  $18,58 \pm 4,56\%$  mature,  $p= 0,525$  – Tukey's test) and L14 vs C14 ( $70,88 \pm 5,04\%$  vs  $72,19 \pm 5,34$  imature and  $29,11 \pm 5,04$  vs  $27,79 \pm 5,34\%$  mature,  $p=0,997$  – Tukey's test). **Conclusion:** In the studied model, the levofloxacin interfere in the increase of the maximal tension and the maximal tensile strength for the 14 days group. There is no interference on the 7 days group. The levofloxacin does not interfere at the collagen maturation process.

**Keywords:** Levofloxacin. Tendon cicatrization. Collagen. Tensile resistance.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Diferentes fases do processo de cicatrização.....	17
FIGURA 2 – Estrutura química das fluoroquinolonas e a relação entre a estrutura e seu efeito colateral . .....	26
FIGURA 3 – Estrutura química da levofloxacina .....	28
FIGURA 4 – “Black-box Warning”, aviso em um quadro preto inserido na bula do medicamento, sobre o efeito colateral do uso da levofloxacina .....	28
FIGURA 5 – Mecanismo hipotético da condrotoxicidade e tenotoxicidade induzida pelo uso de quinolona. Sequência de eventos que levam à quelação do magnésio e ao dano tecidual da cartilagem articular epifisária no esqueleto imaturo .....	31
FIGURA 6 – Relação $\beta$ 1-integrina entre célula e matriz extracelular .....	32
FIGURA 7 – Máquina universal de ensaio mecânico computadorizada modelo DL-500 MF .....	35
FIGURA 8 – Instrumental utilizado para o preparo da medicação para a gavagem	37
FIGURA 9 – Agulha de gavagem utilizada para sondagem orogástrica .....	38
FIGURA 10 – Preparo da região para o procedimento cirúrgico. (A) Tricotomia da região; (B) Marcação da incisão na pele .....	39
FIGURA 11 – (A) Acesso; (B) Dissecção do tendão de Aquiles.....	40
FIGURA 12 – (A) Reparo tenotomia transversa do tendão Aquiles; (B) Ponto de “Kessler” modificado.....	41
FIGURA 13 – (A) Ponto de reforço com mononylon® 5-0; (B) Sutura da pele com mononylon® 5-0 .....	42
FIGURA 14 – Recuperação pós-operatória .....	43
FIGURA 15 – Retirada do tendão de Aquiles para análise tensiométrica .....	44
FIGURA 16 – Espécime ressecado para análise tensiométrica.....	44
FIGURA 17– Espécime ressecado para análise qualitativa e quantitativa do colágeno .....	45

FIGURA 18 – Imagem da tela com programa de interpretação após teste de tração no espécime .....	47
FIGURA 19 – Montagem do corpo de prova para o teste tensiométrico .....	47
FIGURA 20 – Diferentes momentos do teste de tração. A-) Fase inicial; B e C-) Fase intermediária; D-) Fase final .....	48

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – Gráfico box-plot com representação dos dados, dispersão e possíveis dados discrepantes da variável tensão máxima nos 4 grupos de estudo .....	51
GRÁFICO 2 – Curvas de Kaplan-Meier para a variável tensão máxima. Testes de Logrank e seu p-valor para comparação entre os 4 grupos de estudo .....	52
GRÁFICO 3 – Gráfico box-plot com representação dos dados, dispersão e possíveis dados discrepantes da variável tensão máxima nos 4 grupos de estudo .....	54
GRÁFICO 4 – Curvas de Kaplan-Meier para a variável força máxima. Testes de Logrank e seu p-valor para comparação entre os 4 grupos de estudo .....	55
GRÁFICO 5 – Densitometria das fibras de colágeno nos grupos de estudo de 7 dias, valores médios da distribuição do colágeno maduro e imaturo.....	56
GRÁFICO 6 – Densitometria das fibras de colágeno nos grupos de estudo de 14 dias, valores médios da distribuição do colágeno maduro e imaturo .....	57

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Comparação entre o peso dos grupos no momento inicial, pré-operatório e da eutanásia .....	49
TABELA 2 – Resultados e comparação entre os grupos para a variável tensão máxima .....	50
TABELA 3 – Resultados e comparação entre os grupos para a variável força máxima .....	53
TABELA 4 – Resultados da distribuição dos colágenos maduro e imaturo e a comparação entre os grupos de 7 dias .....	56
TABELA 5 – Resultados da distribuição dos colágenos maduro e imaturo e a comparação entre os grupos de 14 dias .....	57

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
1.1 OBJETIVO.....	15
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>16</b>
2.1 O PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO .....	16
2.2 A CICATRIZAÇÃO DE TENDÃO .....	17
2.3 MODELO EXPERIMENTAL DE CICATRIZAÇÃO DE TENDÃO.....	20
2.4 AS QUINOLONAS.....	23
2.4.1 Classificação .....	24
2.4.2 Mecanismo de ação .....	26
2.4.3 A levofloxacina .....	27
2.4.4 Interferência sobre o tecido tendinoso.....	29
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>33</b>
3.1 MATERIAIS .....	33
3.1.1 Animais.....	33
3.1.2 Ambiente e alimentação .....	33
3.1.3 Drogas.....	34
3.1.4 Outros materiais .....	34
3.2 MÉTODO.....	36
3.2.1 Grupos.....	36
3.2.2 Preparo da medicação .....	36
3.2.3 Gavagem .....	37
3.2.4 Procedimento cirúrgico.....	38
3.2.4.1 Pré-operatório .....	38
3.2.4.2 Anestesia.....	38

3.2.4.3 Preparo.....	39
3.2.4.4 Cirurgia.....	40
3.2.4.5 Cuidado pós-operatório .....	42
3.2.5 Eutanásia .....	43
3.2.6 Análise qualitativa do colágeno .....	45
3.2.7 Estudo tensiométrico .....	46
3.2.8 Teste estatístico .....	48
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>49</b>
4.1 PESO .....	49
4.2 AVALIAÇÃO TENSIONOMÉTRICA.....	50
4.2.1 Tensão máxima.....	50
4.2.2. Força máxima .....	53
4.3 ANÁLISE QUALITATIVA DO COLÁGENO. ....	56
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>58</b>
5.1 ANIMAIS E MÉTODO.....	58
5.2 RESULTADOS .....	61
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>64</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>65</b>
<b>DOCUMENTOS CONSULTADOS .....</b>	<b>71</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>72</b>



## 1 INTRODUÇÃO

O aumento da prática esportiva nas últimas décadas, resultado do apelo cada vez maior pela busca de saúde e do bem-estar em geral, tem trazido consequências indesejadas para o corpo dos praticantes de atividades físicas. Observa-se um aumento crescente das lesões decorrentes da prática esportiva e da sobrecarga sobre o sistema músculo-esquelético. Frequentes são as queixas de tendinites e mesmo de rupturas tendinosas, muito comuns no tendão de Aquiles especificamente. Diversos fatores contribuem para esse panorama, como inadequação no treino e sobrecarga de exercícios, entre outros. Os pacientes com ruptura do tendão de Aquiles habitualmente têm indicação cirúrgica e os resultados sofrem interferência das condições prévias do tendão. Há mais de 20 anos há relatos de tendinite e rupturas tendinosas sem relação com a atividade física, mas secundárias ao uso de quinolonas (LEWIS; GUMS; DICKENSHEETS, 1999; MATHIS *et al.*, 2003; FILIPPUCI *et al.*, 2003; KOWATARI *et al.*, 2004; BURKHARDT *et al.*, 2004; CORRAO *et al.*, 2006; BEYER; SCHELLONG, 2006).

As quinolonas representam um grupo importante de antimicrobiano, utilizado em larga escala para o tratamento de grande número de processos infecciosos na rotina clínica diária. A levofloxacina, importante substância do grupo das quinolonas, é um dos antibióticos mais utilizados desta classe de medicamentos. No entanto, o seu uso intensivo representou um aumento importante no número absoluto de efeitos adversos sobre o sistema músculo-esquelético, sobretudo nos tendões e na cartilagem. Desde a primeira descrição dos possíveis efeitos deletérios sobre o tendão, passaram-se quase 30 anos (BAILEY; KIRK; PEDDIE, 1983) e somente nos últimos 10 anos houve melhor compreensão do mecanismo de interferência deste medicamento sobre o tendão (SENDZIK *et al.*, 2005; SENDZIK *et al.*, 2010; SENDZIK; LODE; STAHLMANN, 2009). Como houve aumento no número de relatos de complicações em tendões, em setembro de 2008 a Food and Drug Administration (FDA) ordenou a inserção de aviso especial na bula dos medicamentos, alertando a respeito do risco da utilização deste antimicrobiano (FDA).

O tendão que sofre ruptura e passa pelo processo de cicatrização segue a mesma sequência de eventos dinâmicos, composto de fases que se sobrepõem, resultando na restauração da continuidade e da função do tendão. Habitualmente, as três fases presentes são a fase inflamatória, proliferativa e de maturação (LIN;

CARDENAS; SOSLOWSKY, 2004). Durante esta sequência de eventos, os mecanismos complexos combinados de interações entre diversos mediadores resultam na cicatrização do tendão. Pequenas alterações neste mecanismo bem orquestrado de eventos podem implicar em deficiência ou resultado final não satisfatório.

Considerando que existe um número crescente de rupturas de tendão de Aquiles ao se fazer uso de levofloxacina, e que o tratamento dessas lesões habitualmente é cirúrgico, questionou-se a possível interferência desse medicamento, utilizado previamente, no processo cicatricial do tendão submetido à sutura. Não encontrou-se estudos experimentais sobre o efeito da levofloxacina no processo cicatricial do tendão. Partindo do pressuposto de que a causa da lesão nesses casos é decorrente da ação tóxica direta sobre o tendão, procurou-se investigar se este efeito tóxico poderia também ter efeito sobre o processo de cicatrização.

## 1.1 OBJETIVO

Avaliar o efeito da utilização prévia da levofloxacina sobre a cicatrização do tendão de Aquiles de ratos submetidos à tenotomia e sutura, mediante os seguintes parâmetros:

- 1) Tensiométricos,
- 2) Densitometria do colágeno.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 O PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO

O processo de cicatrização é didaticamente dividido em três fases: inflamatória, proliferativa e de maturação, as quais se sobrepõem numa sequência de eventos que leva à formação da cicatriz. Os princípios básicos desse processo seguem, de maneira geral, a mesma sequência de eventos, independentemente da região em que o processo ocorra (BROUGHTON II; JANIS; ATTINGER, 2006).

A fase inflamatória inicia-se imediatamente após a lesão tecidual. Ocorre ativação da cascata de coagulação e do complemento, acarretando formação do coágulo sanguíneo no local e trombos na microcirculação. Esses coágulos contêm diversos mediadores vasoativos e quimiotáticos e sua função, além de impedir o sangramento, é a de atuar como molde para as células inflamatórias recrutadas para o local e que conduzirão o processo cicatricial. Polimorfonucleares e macrófagos estão presentes precocemente no local da lesão, enquanto os fibroblastos aparecerão mais tardiamente (HURLEY; EDWARDS; HAM, 1970; DI ROSA; PAPADIMITRIOU; WILLOUGHBY, 1971; BROUGHTON II; JANIS; ATTINGER, 2006; KUMAR *et al.*, 2010).

A fase proliferativa é caracterizada histologicamente pela presença da angiogênese e pela proliferação intensa de fibroblastos. Forma-se no local o tecido de granulação, resultado da proliferação intensa das células endoteliais vasculares e dos fibroblastos. Os neutrófilos são substituídos gradativamente pelos macrófagos, entre o 2º e 4º dias, e são importantes na limpeza da região, ajudando na angiogênese e na promoção da deposição de matriz extracelular. Os macrófagos são neste ponto a principal fonte de fatores quimiotáticos. O colágeno inicialmente presente na ferida está orientado verticalmente e não cruza toda a incisão, restrito somente às margens. Entre o 5º e 7º dias, esse tecido ocupa toda a área do defeito e a neovascularização é máxima. A epitelização ocorre gradativamente e com ela o aumento progressivo de colágeno. Inicialmente a matriz provisória contém fibrina, fibronectina e colágeno tipo III, substituído durante todo o processo pelo colágeno tipo I (FIGURA 1). Durante essa fase, entre o 3º e 14º dias, a força de resistência tênsil aumenta rapidamente acompanhando o aumento do colágeno (BROUGHTON II; JANIS; ATTINGER, 2006; KUMAR *et al.*, 2010).

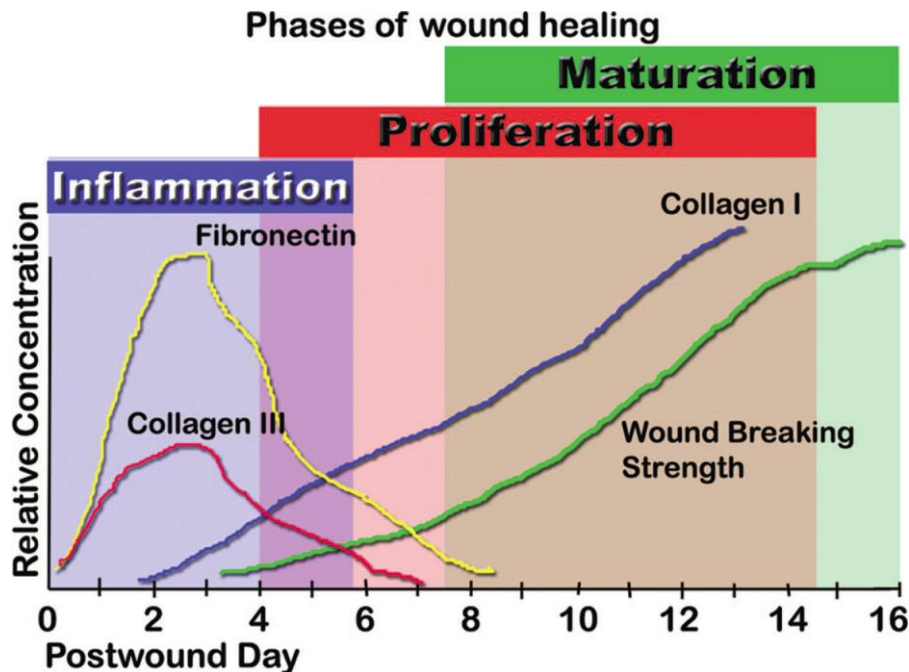


FIGURA 1 – Diferente fases do processo de cicatrização  
 Fonte: BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006, p. 18s.

A terceira fase, de maturação, é caracterizada pela contração da ferida, em parte responsável por diminuir o espaço entre as extremidades da derme e reduzir a área de cicatriz. Os miofibroblastos são importantes nessa fase, não somente na contração da cicatriz, mas também na deposição dos componentes da matriz extracelular. A remodelação, que ocorre lenta e gradativamente durante longo período na fase tardia de maturação, é resultado da degradação do colágeno e de outros componentes da matriz extracelular pelas metaloproteinases da matriz principalmente. A celularidade diminui, assim como o número de vasos sanguíneos, e as fibras de colágeno tornam-se alinhadas com as linhas de força (BROUGHTON II; JANIS; ATTINGER, 2006; CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007; KUMAR *et al.*, 2010).

## 2.2 A CICATRIZAÇÃO DE TENDÃO

Quando ocorre lesão do tecido tendinoso, o organismo inicia o processo de cicatrização, que é dividido em fases distintas entre si por picos específicos de eventos celulares e bioquímicos. Embora a força de resistência do tendão aumente

progressivamente com o tempo, ele não atinge os níveis de resistência do tendão normal (LIN; CARDENAS; SOSLOWSKY, 2004).

O processo de cicatrização de tendão pode ocorrer de duas maneiras: de forma intrínseca, quando a proliferação dos tenócitos ocorre por meio do epitendão e endotendão, ou de forma extrínseca, quando ocorre pela invasão de células pelo tecido circunjacente da bainha e da sinovial (GELBERMAN *et al.*, 1984; MASS; TUEL, 1991; GELBERMAN; AMIEL; HARWOOD, 1992).

A forma intrínseca apresenta características especiais que a diferem do processo de reparo de outros tecidos, como a pele. Nessa forma de cicatrização, o contato restabelecido dos cotos rotos do tendão suturado passa por um processo semelhante ao de regeneração, e o tecido conectivo depositado na união dos cotos é similar ao do tendão original e não ao de uma cicatriz. Nesse processo, as fibras de colágeno estão habitualmente muito bem organizadas e distribuídas uniformemente (MASS; TUEL, 1991; EHRLICH *et al.*, 2005).

A forma extrínseca de cicatrização do tendão segue as características de cicatrização de outros tecidos, como a pele, e ocorre em três fases que se sobrepõem: inflamatória, proliferativa e de maturação. Na fase inicial, fase inflamatória, eritrócitos e células inflamatórias, principalmente neutrófilos, chegam ao local da lesão (SHARMA; MAFFULLI, 2005a; WANG, 2006; CARMONT; MAFFULLI, 2007). A característica principal desta fase é o aporte de elementos celulares extrínsecos, e a resistência à tensão está toda sobre o material de sutura e a técnica do nó aplicado (KOOB, 2002). Essas células migram simultaneamente dos tecidos ao redor da lesão, da bainha tendinosa, do periósteo, do tecido subcutâneo, do peritendão e do endotendão (ABRAHAMSSON, 1991). Nas primeiras 24 horas, monócitos e macrófagos predominam e ocorre a fase inicial da fagocitose do material necrótico. Fatores quimiotáticos e vasoativos são liberados, resultando em aumento da permeabilidade vascular. Em seguida, tem início a angiogênese e o estímulo para a proliferação dos tenócitos, assim como o recrutamento de novas células inflamatórias (MURPHY; HART, 1994). Os tenócitos gradualmente migram para a região da lesão e iniciam a síntese de colágeno tipo III. A síntese de colágeno inicia-se precocemente nas primeiras 48 horas e continua de forma mais intensa pelas próximas cinco semanas após a lesão (PLATT, 2005).

Após o terceiro dia, inicia-se a fase proliferativa. A síntese de colágeno tipo III atinge seu ápice nesta fase e dura algumas semanas. A concentração de água e

de glicosaminoglicanos na região em cicatrização continua alta nesta fase (SHARMA; MAFFULLI, 2005b). Após duas semanas, os cotos do tendão estão aparentemente conectados novamente, entretanto ainda frágeis e com risco de nova ruptura (PLATT, 2005).

Após aproximadamente seis semanas, começa a fase de remodelação, com diminuição da celularidade e redução da síntese de colágeno e de glicosaminoglicanos. É durante essa fase que ocorre a redefinição do tamanho e da forma da cicatriz (SHARMA; MAFFULLI, 2005a, 2006). A fase de remodelação pode ser dividida em fase de consolidação e fase de maturação. A fase de consolidação começa por volta da 6ª semana e continua até a 10ª semana. Durante esse período, o tecido cicatricial muda de celular para fibroso. O metabolismo celular dos tenócitos permanece elevado durante esse período e os tenócitos, assim como as fibras de colágeno, tornam-se mais alinhados com a direção da força de estresse, embora não assumam a configuração normal anterior à lesão (HOOLEY; COHEN, 1979; KOOB, 2002). Proporção maior de colágeno tipo I é sintetizada durante este período (ABRAHAMSSON, 1991). Após o período de dez semanas, ocorre o estágio de maturação, com mudança gradual do tecido fibroso por tecido cicatricial mais semelhante ao tendinoso, pelo período de até um ano. Durante a segunda metade desse período ocorre redução progressiva do metabolismo dos tenócitos, assim como da vascularização do tendão (AMIEL *et al.*, 1983). Nesse processo extrínseco de cicatrização, o tecido resultante é habitualmente ainda de aspecto mais cicatricial e fibroso do que tendinoso, embora exista um grau considerável de organização das fibras de colágeno, estas não seguem o mesmo padrão de organização da cicatrização intrínseca (KOOB, 2002; EHRLICH *et al.*, 2005).

Durante o processo de cicatrização do tendão, diversos fatores de crescimento desempenham papel importante (MURPHY *et al.*, 1994). O fator de crescimento *insulin-like 1* (IGF-1) está bastante aumentado em todas as fases de cicatrização de tendão, especialmente nas fases iniciais. Esse fator de crescimento promove a proliferação e migração de fibroblastos e aumenta a produção de colágeno e proteoglicanos (ABRAHAMSSON; LOHMANDER, 1996). Além disso, ratos submetidos à lesão do tendão de Aquiles e à injeção de IGF-1 intralesional apresentaram redução do déficit funcional e recuperação mais rápida da lesão (KURTZ *et al.*, 1999).

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) estimula a proliferação de células endoteliais e aumenta a angiogênese e a permeabilidade capilar (FERRARA, 1999). Ratos submetidos à tenotomia e sutura do tendão de Aquiles e injeção de VEGF no local da lesão apresentaram recuperação da força de resistência à tração mais precocemente durante o processo de cicatrização, além disso, houve aumento da expressão do fator de crescimento transformador- $\beta$  (ZHANG *et al.*, 2003).

Durante a cicatrização, as três isoformas do óxido nítrico sintetase estão aumentadas e com padrões de expressão diferentes conforme a fase do processo cicatricial. Esse aumento nas isoformas do óxido nítrico parece proteger contra infecções o local em que ocorre a cicatrização, mantendo o suprimento sanguíneo local e resguardando-o da ação dos radicais livres liberados pela ação dos neutrófilos e macrófagos (LIN *et al.*, 2001a, b). Outros fatores de crescimento também têm papel importante, interferindo positivamente no processo cicatricial, como a proteína-2 morfogenética derivada de cartilagem (FORSLUND; ASPENBERG, 2003).

As enzimas que atuam na degradação da matriz extracelular atuam positivamente, mantendo o equilíbrio entre formação e degradação da matriz extracelular durante o processo cicatricial. Gulotta *et al.* (2010) estudaram o efeito da metaloproteinase de membrana tipo 1 durante o processo cicatricial tendinoso do manguito rotador em ratos. Os autores observaram que a enzima propicia condições cicatriciais mais adequadas mediante um processo mais parecido com o de regeneração ao invés da formação de cicatriz no local da lesão. Os tendões apresentavam maior resistência tênsil e melhores características histológicas.

### 2.3 MODELO EXPERIMENTAL DE CICATRIZAÇÃO DE TENDÃO

A grande maioria dos estudos experimentais de lesão e cicatrização tendinosa tem sido realizada em modelos animais por causa de seu baixo custo, menor número de questões éticas envolvidas, menor variabilidade e maior disponibilidade de grupos para estudo. As desvantagens estão relacionadas às diferenças biológicas e à possível dificuldade de trabalhar com animais (LIN; CARDENAS; SOSLOWSKY, 2004).

Os modelos experimentais em animais para estudo da cicatrização de tendão são desenhados para análise da interferência de diversos fatores sobre o

processo de cicatrização. Um dos principais grupos de modelo experimental animal para tendões é o de transecção. Nesse modelo, os estudos podem ser de transecção parcial ou total e, embora este último seja o que reproduz de forma mais adequada a situação clínica real, este modelo necessita de sutura dos cotos do tendão e seus efeitos sobre o local devem ser levados em consideração (LIN; CARDENAS; SOSLOWSKY, 2004). Os trabalhos de transecção completa são melhor reproduzíveis em localização, padrão e grau de extensão da lesão e por este motivo são preferíveis (WALSH; FRANK, 1988).

A técnica de transecção completa gera um *gap* no local da lesão, que é corrigido pela sutura, com aposição adequada dos cotos rotos do tendão. A sutura previne a formação de tecido cicatricial em excesso, acelerando a formação de colágeno e prevenindo a formação de tecido não tendinoso entre os cotos do tendão (O'DONOGHUE *et al.*, 1961). Dinopoulos *et al.* (2000), em estudo em cães, verificaram que o número de passadas do fio de sutura é importante na força de resistência da sutura e para evitar a formação do espaço entre os cotos. Outros fatores que também devem ser levados em consideração incluem a localização do nó de sutura e o tipo de material (BARRIE; WOLFE, 2001).

A formação do espaço entre os cotos rotos do tendão pode ser resultado de um reparo inicial inadequado ou da aplicação de força cíclica sobre o local da lesão (DINOPOULOS *et al.*, 2000). Este espaço é local da formação de tecido cicatricial com características cicatriciais frágeis, com força de resistência menor e maior índice de aderências, considerando-se que a força tênsil não aumenta com o tempo em *gap* maior que 3 mm (GELBERMAN *et al.*, 1999; SILVA; BOYER; GELBERMAN, 2002).

Kurtz *et al.* (1999) realizaram estudo experimental com modelo de transecção. Utilizaram grupos de seis ratos randomizados e submetidos à transecção simples e à transecção associada à aplicação local de fator de crescimento *insulin-like 1*. Não foi realizada sutura dos cotos, contudo o tendão do músculo plantar foi completamente removido para evitar sua ação como imobilizador interno. Foi incluído grupo controle, no qual foram liberados os tendões de Aquiles e plantar, mas não foi realizada a transecção. A análise não mostrou diferenças entre os grupos quanto à força de resistência dos tendões.

Zhang *et al.* (2003) estudaram o efeito do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) sobre a cicatrização de tendão de Aquiles em ratos. Nesse



modelo de transecção, tanto os grupos estudo quanto os grupos controle foram submetidos a diferentes técnicas, para o lado direito e esquerdo das patas traseiras. O lado direito foi submetido à remoção do tendão do músculo plantar, enquanto o esquerdo foi mantido com o mesmo tendão íntegro, funcionando como protetor da sutura do tendão de Aquiles. Todos foram submetidos à sutura com pontos de Kessler modificado. O grupo estudo recebeu aplicação de VEGF. A força de resistência à tração foi maior no grupo com a aplicação do fator e com proteção pelo tendão plantar. Não houve diferença quando a comparação foi feita entre os grupos controle, com ou sem proteção do tendão plantar delgado.

Palmes *et al.* (2002) descreveram novo modelo experimental para estudo da cicatrização de tendão de Aquiles em ratos. Utilizaram técnica de transecção com ressecção do tendão do músculo plantar. Os animais foram submetidos à sutura com pontos tipo Kessler modificado. Os autores avaliaram o efeito da imobilização, limitando a mobilização da articulação talocrural mediante cerclagem entre a membrana interóssea tibiofibular e a região entre a fásia plantar e calcâneo, protegendo a região da sutura do tendão. As avaliações quanto à resistência foram feitas com 0, 4, 8, 12, 16, 35 e 112 dias após a sutura. Os grupos submetidos à mobilização precoce apresentaram recuperação antecipada da força de resistência à ruptura.

Yuan *et al.* (2003) realizaram estudo para determinar se a adição de óxido nítrico, via nitroflurbiprofeno, poderia melhorar o processo cicatricial no tendão de Aquiles de ratos. Utilizaram modelo experimental semelhante ao de Palmes *et al.* (2002), contudo não realizaram cerclagem para imobilização. Os movimentos foram permitidos após o procedimento de tenotomia e sutura, realizada com dois pontos simples. Os animais foram sacrificados com dez dias e o tendão de Aquiles submetido à análise de força e quantidade de colágeno. Embora o grupo de estudo não tenha mostrado diferença quanto à força de ruptura, sua área de secção transversa foi menor, o que resultou em maior tensão máxima dos tendões. Não houve diferença com relação à quantidade de colágeno.

Murrell *et al.* (2008), em estudo semelhante ao de Yuan *et al.* (2003), avaliaram se a administração de óxido nítrico com inibidor da ciclo oxigenase 3, o paracetamol, poderia melhorar o processo cicatricial do tendão de Aquiles de ratos. O tendão foi submetido à tenotomia, com retirada do tendão do músculo plantar, sem, porém, realizar sutura do tendão. Os animais também foram sacrificados com

dez dias e analisados quanto à força de ruptura e quantidade de colágeno. Os resultados mostraram maior quantidade e melhor distribuição do colágeno no grupo que recebeu o óxido nítrico/paracetamol. A força de ruptura foi semelhante entre os grupos, contudo a área de secção transversal do tendão no grupo de estudo foi menor, resultando em maior tensão máxima dos tendões, como no estudo de Yuan *et al.* (2003). Lin *et al.* (2001a) utilizaram anteriormente o mesmo modelo para análise da expressão das três isoformas do ácido nítrico sintetase. Nesse estudo, quatro dias após a transecção, as três isoformas estavam aumentadas. A forma induzível apresentou seu pico com quatro dias, enquanto a isoforma endotelial, com sete dias e a isoforma neuronal, com 21 dias. Este estudo demonstrou que as isoformas do ácido nítrico sintetase apresentam padrões de expressão diversos conforme o período de cicatrização do tendão.

Forslund, Rueger e Aspenberg (2003) utilizaram o modelo de transecção total, com a retirada do tendão plantar, para avaliar o efeito das proteínas morfogenéticas derivadas da cartilagem tipo 1, 2 e 3 na cicatrização de tendões em ratos. Nesse modelo não utilizaram sutura, mas criaram um *gap* de 3 mm e aplicaram doses variadas dos três tipos de proteína para avaliar o desenvolvimento de tecido cicatricial no local. Foi avaliada a força de resistência tênsil com oito dias de evolução pós-lesão. O diâmetro do tendão e sua força de resistência foram diretamente proporcionais à dose inicial aplicada das proteínas no local do defeito tendinoso. Forslund e Aspenberg (2001) já haviam utilizado modelo idêntico para análise da proteína morfogenética derivada da cartilagem tipo 2. Nesse estudo a força de ruptura tinha aumentado em 39% nos grupos que utilizaram a proteína.

## 2.4 AS QUINOLONAS

As quinolonas são um grupo importante de antibióticos que inicialmente foi representado pelo ácido nalidíxico nos anos de 1960. No início dos anos de 1980, após mudança estrutural importante na sua molécula, incluindo um radical flúor na posição 6, esse grupo de medicamentos passou a ser denominado fluoroquinolonas. Mais recentemente, após diversas modificações na sua molécula, com mudanças na posição do radical flúor da posição 6 para outras posições, e também a criação de novas moléculas até mesmo sem o radical flúor, tem se aceitado que a melhor

denominação do grupo antimicrobiano seja mesmo como quinolona (STAHLMANN, 2002).

Esse grupo de medicamentos tem sido utilizado extensivamente no tratamento de infecções por germes gram-negativos. Com a introdução de novas gerações de agentes, seu espectro de ação foi expandido para bactérias gram-positivas e anaeróbias (KING; MALONE; LILLEY, 2000).

Todas as quinolonas atualmente oferecidas no mercado apresentam um núcleo básico quinolônico, e as diferenças nas cadeias laterais do núcleo básico é que determinam medicamentos diferentes, responsáveis pelas diferenças nos efeitos colaterais e reações adversas (LIU, 2010).

Os efeitos adversos das quinolonas são mais frequentemente observados no trato digestório, sistema nervoso central (SNC) e pele, entretanto, fototoxicidade, cardiotoxicidade, artropatia e tendinite também foram observadas em diversos pacientes (DE SARRO; DE SARRO, 2001; BURKHARDT *et al.*, 2004; KOWATARI *et al.*, 2004).

As fluoroquinolonas exibem uma afinidade pronunciada pelos tecidos conjuntivos. Sua concentração na cartilagem, ossos e outros tecidos aumenta rapidamente após a administração da droga e excedem aquelas mensuradas simultaneamente no plasma. Este peculiar comportamento farmacocinético é um dos aspectos mais importantes, explicando o porquê de o tecido conjuntivo ser tão sensível à ação dessa droga (STAHLMANN, 2002).

#### 2.4.1 Classificação

A primeira quinolona introduzida no mercado foi o ácido nalidíxico, em 1962, e a primeira a receber a liberação da Food and Drug Administration (FDA) foi a norfloxacin, em 1984 (BERTINO; FISH, 2000). Assim como as cefalosporinas, as quinolonas também são divididas conforme o seu espectro de ação em gerações (NABER; ADAM, 1998).

As de primeira geração, pouco usadas atualmente, apresentavam espectro limitado para gram-negativos, sua concentração no soro e distribuição sistêmica era baixa, sendo utilizadas somente para algumas infecções urinárias. As principais quinolonas deste período foram o ácido nalidíxico e ácido pipemídico. Após a adição

de um átomo de flúor na posição 6 da estrutura primária da molécula da quinolona, foi criada a classe das fluoroquinolonas (ALÓS, 2009).

Há mais de 10 anos, as fluoroquinolonas têm sido caracterizadas como uma classe de antimicrobiano muito importante. A partir da modificação da sua estrutura química, novas drogas têm sido lançadas nessa classe e, ao longo dos anos, vem ocupando posição importante como opção terapêutica. Enquanto os medicamentos lançados inicialmente apresentavam espectro limitado para bactérias gram-negativas, as drogas mais recentes ampliaram seu espectro de ação para gram-positivos, anaeróbios e bactérias atípicas (BERTINO; FISH, 2000; CARBON, 2001).

As drogas de segunda geração apresentam maior ação contra germes gram-negativos e, embora ativas contra algumas bactérias atípicas, têm ação moderada contra gram-positivos e nenhuma ação contra anaeróbios. Neste grupo, as concentrações no soro e em alguns tecidos também são baixas, de tal modo que não estão indicadas para tratamento de infecções sistêmicas. O principal representante deste grupo é o norfloxacino (ALÓS, 2009).

As drogas de terceira geração, representadas pela ciprofloxacino, ofloxacino e levofloxacina, mantêm as mesmas características do grupo anterior, entretanto possuem melhor absorção oral e ação mais efetiva em *Pseudomonas aeruginosa*, gram-positivos e agentes anaeróbios. Dentro do grupo de terceira geração, a Levofloxacina é a que apresenta melhor ação contra gram-positivos (KING; MALONE; LILLEY, 2000).

Os medicamentos de quarta geração apresentam melhora da ação contra gram-positivos e uma boa atividade contra anaeróbios, apesar de sua limitação contra *P. aeruginosa*. Tanto as de terceira quanto as de quarta geração podem ser utilizadas para o tratamento de infecções sistêmicas (ALÓS, 2009).

Embora tenha havido grande desenvolvimento nesse grupo de medicamentos, alguns representantes do grupo têm sido apontados como responsáveis por sérios efeitos colaterais, de tal maneira que grande número de drogas foi retirado do mercado (FIGURA 2).

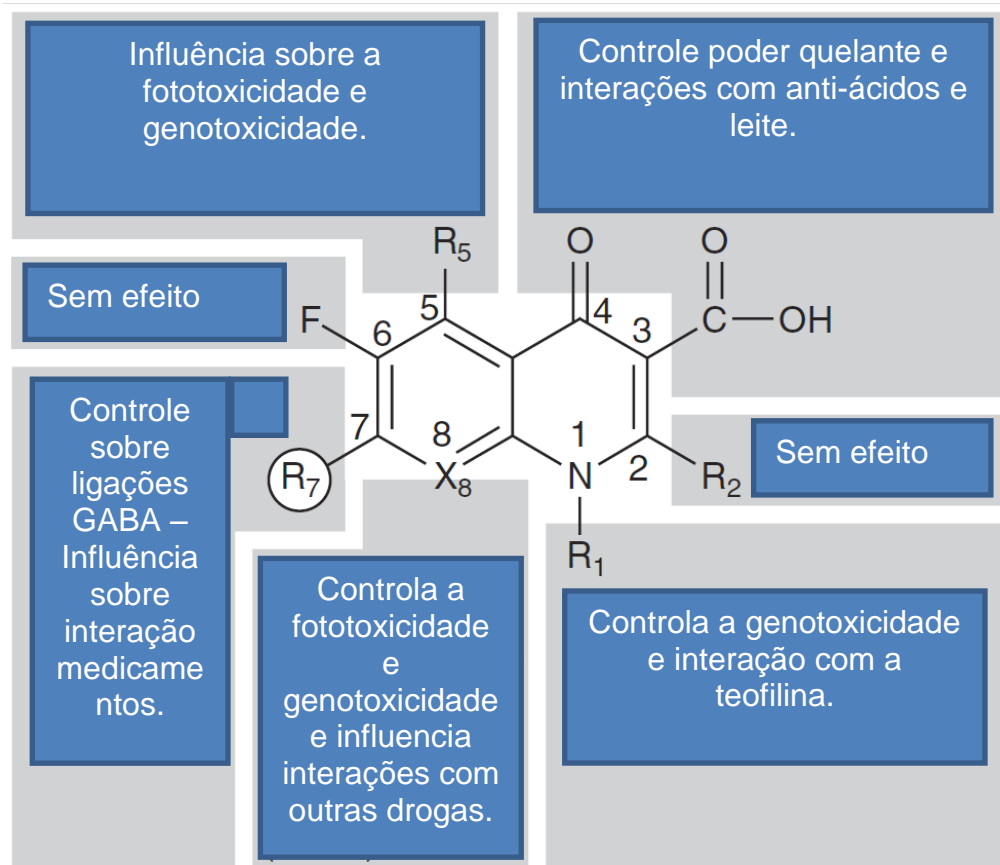


FIGURA 2 – Estrutura química das fluoroquinolonas e a relação entre a estrutura e efeito colateral  
 Fonte: LIU, 2010, p. 356.

É muito importante a diferenciação entre os diferentes medicamentos dentro deste grupo, não somente no intuito de guiar e orientar o médico na prescrição do melhor medicamento para o efeito terapêutico desejado, mas também para evitar efeitos adversos mais comuns em casos específicos (CARBON, 2001).

#### 2.4.2 Mecanismo de ação

O mecanismo de ação das quinolonas é mediante inibição de importante enzima bacteriana, a gyrase bacteriana, envolvida na replicação, recombinação e reparo do DNA (MAXWELL, 1992). O bloqueio do crescimento bacteriano acontece pela interferência do medicamento sobre a gyrase. A afinidade das quinolonas por íons metálicos é um importante pré-requisito para a sua atividade antibacteriana, sendo que a ligação entre medicamento e o complexo DNA-gyrase se faz via íon magnésio (PALÚ *et al.*, 1992). A importância dos íons magnésio foi confirmada por estudo realizado em ratos submetidos a tratamento com quinolona e dieta com

restrição deste íon e com dieta normal. Os animais submetidos à restrição do íon magnésio apresentavam maior número de alterações ultraestruturais degenerativas no tendão de Aquiles (SHAKIBAEI *et al.*, 2000). Mais recentemente, a ação das quinolonas foi verificada não somente contra a enzima DNA-gyrase, também chamada topoisomerase 2, mas também contra a topoisomerase 4. A resistência dessa classe de antimicrobiano está relacionada a mutações nos genes codificadores dessas topoisomerasas (ALÓS, 2009).

#### 2.4.3 A levofloxacin

A levofloxacin, conforme seu espectro de ação e classificação proposta por King *et al.* (2000), é considerada fluoroquinolona de terceira geração, com amplo espectro contra bactérias gram-positivas e patógenos atípicos.

A levofloxacin (FIGURA 3) foi lançada no mercado em 1993, e desde então já foi utilizada para tratamento de mais de 647 milhões de pacientes ao redor do mundo, com indicações para uma grande variedade de infecções, tais como sinusite, pneumonia, prostatite, pielonefrite, infecções de pele e infecções do trato urinário (LIU, 2010).

O medicamento apresenta interação com outros produtos que contenham cátions multivalentes como antiácidos contendo magnésio ou alumínio, metal cátion como o ferro e preparados multivitamínicos que contenham zinco e didanosina. Esses medicamentos podem interferir na absorção da levofloxacin, resultando numa concentração plasmática menor que a desejada, e por este motivo deve ser administrada ao menos duas horas antes ou após o uso dessas substâncias (LEVAQUIN, 2009).

Informações sobre a segurança da levofloxacin, baseadas em 29 estudos clínicos fase III (n=7537), revelaram que em 4,3% dos pacientes foi necessário suspender o uso do medicamento por causa de efeitos adversos (LEVAQUIN, 2009).

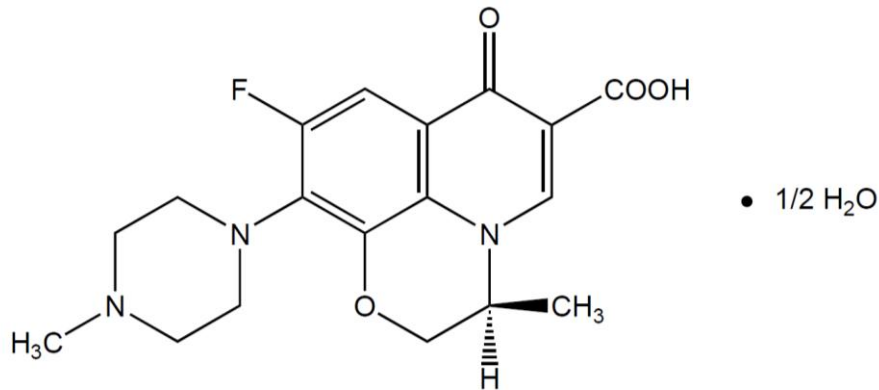


FIGURA 3 – Estrutura química da levofloxacina  
Fonte: FDA.

Ball (2003), em artigo de revisão sobre a eficácia e segurança da utilização da levofloxacina, já havia confirmado o risco aumentado de tendinopatia em pacientes com idade acima de 60 anos e fazendo uso de corticoesteroides.

Após grande número de complicações em tendões - como tendinites e até mesmo rupturas de tendão -, em setembro de 2008, o FDA modificou a bula do medicamento e incluiu o chamado “Black-box Warning”, um aviso que, por suas características de *layout*, é a forma mais forte de chamar atenção para os possíveis efeitos adversos do uso de certo medicamento (FIGURA 4). Nesse caso, orienta sobre o risco aumentado de tendinite e ruptura de tendão, risco mais frequente em pacientes que fazem uso de corticoesteroides e em pacientes submetidos a transplantes de rim, coração ou pulmão.

**WARNING:**  
**Fluoroquinolones, including LEVAQUIN<sup>®</sup>, are associated with an increased risk of tendinitis and tendon rupture in all ages. This risk is further increased in older patients usually over 60 years of age, in patients taking corticosteroid drugs, and in patients with kidney, heart or lung transplants [See Warnings and Precautions (5.1)].**

FIGURA 4 – “Black-box Warning”, aviso em um quadro com bordas pretas, inserido na bula do medicamento, sobre o efeito colateral do uso da levofloxacina

Fonte: FDA.

Nota: Tradução do aviso inserido pelo FDA nas bulas de medicamento:

AVISO: Fluoroquinolonas, incluindo Levaquin<sup>®</sup>, estão associadas com aumento no risco de tendinite e ruptura de tendão em qualquer idade. O risco é ainda maior em pacientes mais idosos, habitualmente acima dos 60 anos de idade, em pacientes fazendo uso de corticoesteroides e em pacientes com transplante de rim, coração ou pulmão [Ver Avisos e Precauções (5.1)]. (Tradução nossa).

#### 2.4.4 Interferência sobre o tecido tendinoso

Bailey, Kirk e Peddie (1983) foram os primeiros autores a relatar o efeito colateral do uso de fluoroquinolona sobre o tecido tendinoso. A descrição foi de dois casos de tendinite de Aquiles em pacientes transplantados renais, que desenvolveram a alteração sobre o tendão durante o uso de norfloxacin. Após a descrição inicial, dezenas de trabalhos reforçaram a ligação entre o uso de quinolona e complicações sobre os tendões (LEWIS; GUMS; DICKENSHEETS, 1999; FILIPPUCCI *et al.*, 2003; KOWATARI *et al.*, 2004; BEYER; SCHELLONG, 2006; BURKHARDT *et al.*, 2004; STAHLMANN; LODE, 2010).

Van Der Linden *et al.* (2001) revisaram 42 relatos espontâneos de alterações tendinosas relacionadas ao uso de quinolonas ocorridas na Holanda entre 1988 e 1998. Desses relatos, 32 (76%) pacientes apresentaram tendinite e 10 (24%) pacientes apresentaram ruptura tendinosa. Um possível fator de risco é a idade, já que a maior parte dos pacientes (71%) apresentava idade superior a 60 anos. Em 90% dos casos, o acometimento foi no tendão de Aquiles. Os sintomas mais frequentes foram dor, aumento de volume, hiperemia e limitação funcional.

Leone *et al.* (2003) conduziram estudo de revisão das notificações de efeitos colaterais do uso de medicamentos antimicrobianos no norte da Itália entre 1999 e 2001 e verificaram que 22,5% dos casos estavam relacionados ao uso de fluoroquinolonas. Naquele estudo, a levofloxacin foi o medicamento antimicrobiano mais frequentemente associado à tendinite e ruptura tendinosa.

Em aproximadamente 90% dos casos o tendão acometido é o Aquiles e em 40% os sintomas são bilaterais (KHALIQ; ZHANEL, 2005).

Após grande número de casos descritos de complicações sobre o tecido conjuntivo, tendinoso e cartilaginoso relacionados ao uso de quinolonas, diversos trabalhos procuraram elucidar o mecanismo de lesão sobre esses tecidos. Kashida e Kato (1997) realizaram estudo em ratos, testando o efeito tóxico de dez diferentes quinolonas sobre o tendão de Aquiles, entre elas a levofloxacin. Os autores identificaram que todas as drogas que apresentavam maior efeito tóxico ao tendão, incluindo a levofloxacin, apresentavam como característica semelhante um substituto metilpiperadinil na posição 7 da estrutura central da fluoroquinolona. Estas mesmas drogas apresentavam maior pico plasmático após a sua administração.



Sendzik *et al.* (2005) estudaram o efeito da levofloxacina e da ciprofloxacina sobre as células do tendão de Aquiles de humanos, submetidas a cultura *in vitro* e analisadas quanto a alterações ultraestruturais pela microscopia eletrônica e quanto ao aumento de enzimas destruidoras da matriz pela técnica de *immunoblotting*. Identificaram aumento das metaloproteinases da matriz e presença do marcador ativado de apoptose, a caspase-3. Alterações celulares características de apoptose foram confirmadas pela microscopia eletrônica, tornando evidente que essas alterações são a fase final do processo patogênico da tendinopatia induzida pelas fluoroquinolonas.

Sendzik, Lode e Stahlmann (2009), em artigo de revisão, sugerem novo mecanismo de lesão baseado em achados biomecânicos e ultraestruturais publicados em artigos recentes. Os eventos ocorridos no tendão e na cartilagem seguem mecanismo similar. Níveis elevados do medicamento são encontrados na cartilagem e formam quelatos com o cátion bivalente – magnésio. Com isso, ocorre déficit do íon magnésio, que é importante no funcionamento da  $\beta$ 1-integrina, responsável pela ligação entre as células e a matriz extracelular e entre as células entre si. Por causa da limitada circulação sanguínea na cartilagem e no tendão, o déficit de íon magnésio não consegue ser compensado rapidamente e o mecanismo de funcionamento alterado da  $\beta$ 1-integrina leva ao distúrbio das interações célula-célula e célula-matriz (FIGURA 5), implicando na formação de radicais livres e destruição tecidual (HAYEM *et al.*, 1994; SIMONIN *et al.*, 1999; SENDZIK *et al.*, 2005). As concentrações de colágeno tipo I,  $\beta$ 1-integrina e da proteína quinase, que são reguladas por sinal extracelular (ERK 1/2), mostraram-se reduzidas em cultura de tenócitos incubados com levofloxacina. Todas estas alterações resultam em aumento da apoptose celular (SENDZIK *et al.*, 2005).

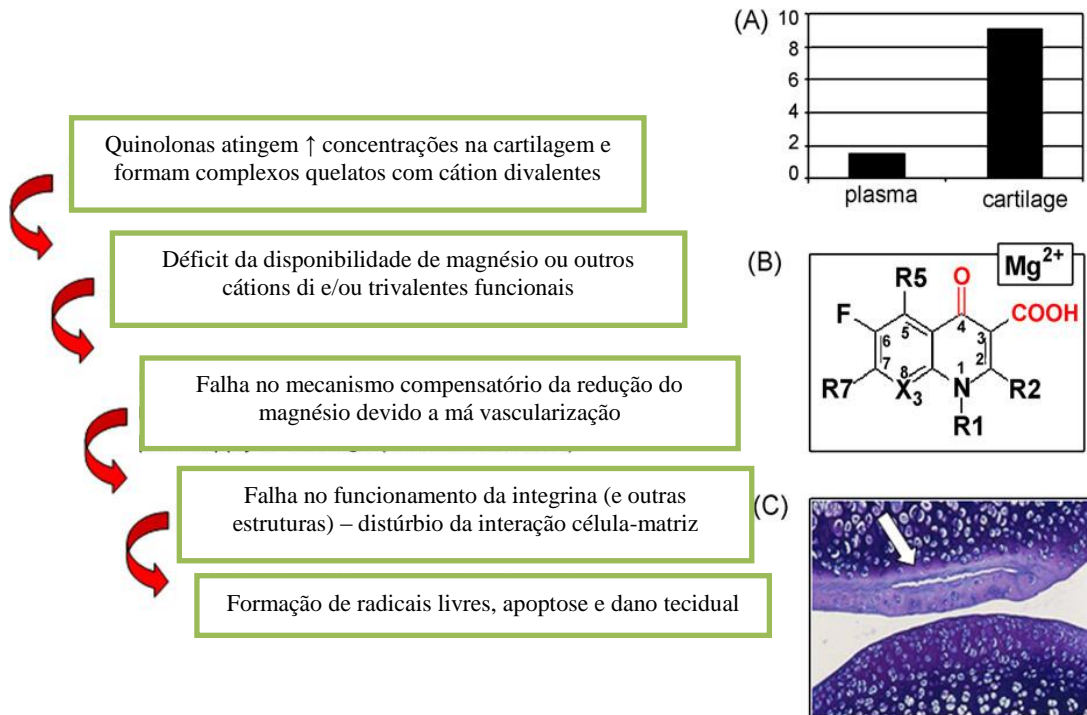


FIGURA 5 – Mecanismo hipotético da condrotoxicidade e tenotoxicidade induzida pelo uso de quinolona. Sequência de eventos que levam à quelação do magnésio e ao dano tecidual da cartilagem articular epifisária no esqueleto imaturo.

Fonte: Adaptado de SENDZIK; LODE; STAHLMANN, 2009.

Nota: (A) Quinolonas atingem concentrações mais elevadas na cartilagem que no plasma. A concentração foi mensurada no plasma e na cartilagem de ratos jovens 6 horas após administração única de ofloxacina na concentração de 100 mg/kg de peso.

(B) Todas as quinolonas formam complexos quelatos com o magnésio.

(C) Articulação do joelho de rato jovem após tratamento com quinolona – a seta mostra a área de descolamento da cartilagem na superfície femoral, porção tibial íntegra. Mecanismo similar ocorre sobre o tecido tendinoso.

Sendzik *et al.* (2010) estudaram o efeito sinérgico da levofloxacina e da dexametasona sobre a cultura de tenócitos e identificaram redução do colágeno tipo I e do receptor  $\beta$ 1-integrina (FIGURA 6). Observaram também aumento das metaloproteinases da matriz 1 e 13 (MMP-1 e MMP-13), além da ativação da caspase 3. As alterações apoptóticas foram confirmadas pela microscopia eletrônica. Os achados deste trabalho confirmaram as observações clínicas de aumento do risco de complicações sobre os tendões em pacientes que utilizam corticoesteroides e são submetidos à terapêutica com levofloxacina.

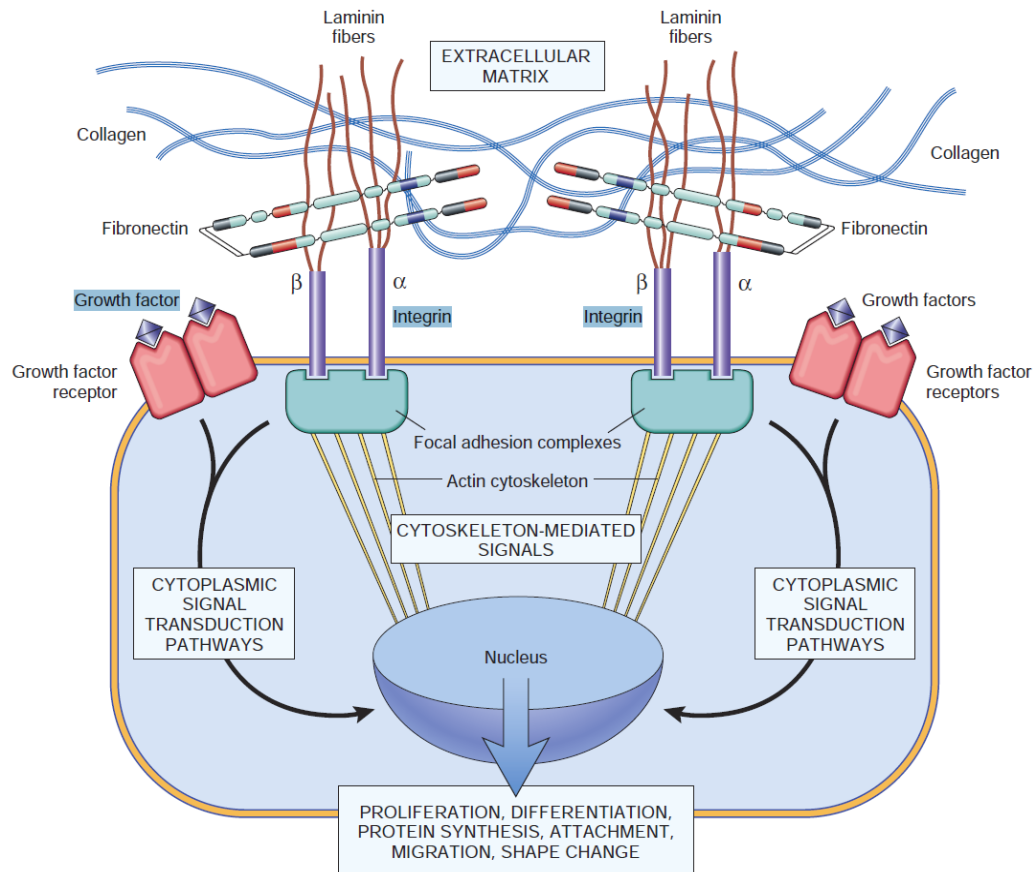


FIGURA 6 – Relação  $\beta 1$ -integrina entre célula e matriz extracelular  
 Fonte: KUMAR, 2010. p. 97.

Van der Linden *et al.* (2003) já haviam conduzido estudo clínico de revisão dos casos de ruptura de tendão de Aquiles no Reino Unido, entre 1988 e 1998, em pacientes submetidos à terapêutica com quinolonas. Os autores identificaram um número maior de casos em pacientes com idade superior a 60 anos e fazendo uso de corticoesteroides, o que foi confirmado pelas observações de Khaliq e Zhanel (2003), em seu trabalho de revisão de 98 casos.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAIS

##### 3.1.1 Animais

Para a realização deste experimento, foram utilizados 80 ratos isogênicos, Wistar (*Rattus norvegicus albinus*, *Roentia mammalia*), adultos, machos, provenientes do biotério do Instituto Politécnico da Universidade Federal do Paraná (UFPR). O peso médio inicial dos animais foi  $268,87 \pm 24,19$  g. O projeto foi submetido à análise do Comitê de Ética em Pesquisa da Sociedade Evangélica Beneficente de Curitiba sob número 2010-008347, aprovado em 13 de setembro de 2010 e realizado de acordo com as normas éticas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

##### 3.1.2 Ambiente e alimentação

O estudo foi realizado no Centro de Pesquisa do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da UFPR. Foram utilizadas 16 gaiolas de polipropileno de tamanho padronizado, com volume de aproximadamente  $0,023 \text{ m}^3$  e área de superfície de  $0,14 \text{ m}^2$ . As gaiolas foram fechadas superiormente com comedouros removíveis, em aço, pelos quais havia circulação de ar e entrada de iluminação. Sobre as grades ficavam apoiados a ração e os recipientes em vidro com bico em aço para fornecimento de água aos animais. As gaiolas foram forradas com cepilho de madeira, identificadas e acomodadas sobre estantes horizontais em aço e mantinham a mesma distância da fonte de luz.

O ambiente apresentava controle de temperatura ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ), ruído e luminosidade, através de ciclos claro-escuro de 12 horas (Cronomat<sup>®</sup>, Mallory do Brasil, São Paulo, SP, Brasil). Os ratos receberam ração balanceada padrão, denominada Nuvilab CR1<sup>®</sup> (Nuvital, Colombo, PR) e água *ad libitum*.

### 3.1.3 Drogas

A droga utilizada para o experimento no grupo de estudo, levofloxacina (Levaquin<sup>®</sup>), é fabricada pela indústria farmacêutica Janssen-Cilag (São José dos Campos, SP, Brasil) e foi adquirida comercialmente na apresentação de comprimidos de 500 mg.

Foi utilizado dipirona sódica (Novalgina<sup>®</sup>, Sanofi-Aventis, Suzano, SP, Brasil) na apresentação gotas, com concentração de 500 mg/ml para analgesia pós-operatória.

### 3.1.4 Outros materiais

Para a manipulação diária dos animais, foram utilizados aventais e luvas de látex não estéreis. Os ratos foram sedados para o procedimento de gavagem com uso de éter etílico (Farmanilquima<sup>®</sup>, Curitiba, PR, Brasil).

Utilizou-se balança eletrônica (AM 5500 Marte<sup>®</sup>, São Paulo, SP, Brasil) para a aferição do peso dos animais e a unidade utilizada foi o grama (g).

Gral em porcelana de 60 ml, com fundo arredondado e áspero, e pistilo de 12 cm foram utilizados para maceração dos comprimidos, e água destilada para diluir os comprimidos macerados.

Para o procedimento de gavagem, foi utilizada sonda metálica curva de 11 cm de comprimento, com extremidade esférica de 1,4 mm, padronizada para este fim.

Seringas plásticas descartáveis de 3 ml foram utilizadas para dosagem do medicamento e campânula de vidro para a sedação e anestesia dos animais.

O procedimento cirúrgico foi realizado com instrumental padrão, disponível no laboratório.

Foram utilizados os seguintes materiais descartáveis: lâminas de bisturi número 15 (Solidor<sup>®</sup>), fios de nylon monofilamentar 5-0 e 6-0 (Mononylon<sup>®</sup>, Ethicon<sup>™</sup>, São José dos Campos, SP) e gazes. Foi utilizada solução tópica de polivinilpirrolidona-iodo (PVPI) para assepsia e antissepsia da região abordada cirurgicamente.

Para marcação da pele, foi usada caneta preta, de ponta fina, modelo Sharpie<sup>®</sup>.

Os espécimes ressecados para estudo histológico foram armazenados em frascos individuais identificados e preenchidos com solução de formalina a 10% (Rioquímica<sup>®</sup>, São José do Rio Preto, SP, Brasil).

Para realização do teste de resistência do tecido, foi utilizada máquina universal de ensaio mecânico computadorizada, da marca Emic<sup>®</sup>, modelo DL-500 MF, com garras de pressão ajustáveis manualmente e sistema eletrônico de aquisição de dados com utilização do *software* para ensaios mecânicos destrutivos Tesc, versão 2.0 (Emic<sup>®</sup>, São José dos Pinhais, PR) (FIGURA 7).



FIGURA 7 – Máquina universal de ensaio mecânico computadorizada modelo DL-500 MF  
Fonte: O autor

## 3.2 MÉTODO

### 3.2.1 Grupos

Os animais permaneceram em aclimatação por um período de 7 dias, recebendo água e ração *ad libitum*. Após este período, foram pesados e divididos aleatoriamente em 4 grupos de 20 ratos, de acordo com a utilização ou não do medicamento em estudo e o tempo decorrido entre a cirurgia e a eutanásia:

- i. Grupo L7: 20 animais que receberam levofloxacina por 7 dias foram submetidos ao procedimento cirúrgico no 8º dia e foram sacrificados no 7º dia pós-operatório.
- ii. Grupo C7: 20 animais que receberam água destilada por 7 dias foram submetidos ao procedimento cirúrgico no 8º dia e foram sacrificados no 7º dia pós-operatório.
- iii. Grupo L14: 20 animais que receberam levofloxacina por 7 dias foram submetidos ao procedimento cirúrgico no 8º dia e foram sacrificados no 14º dia pós-operatório.
- iv. Grupo C14: 20 animais que receberam água destilada por 7 dias foram submetidos ao procedimento cirúrgico no 8º dia e foram sacrificados no 14º dia pós-operatório.

Os ratos foram marcados na cauda com caneta preta de tinta atóxica, de modo que pudessem ser identificados e monitorados quanto à evolução e então subdivididos em 4 subgrupos. Foram numerados de 1 a 5, conforme a sequência de inclusão em cada subgrupo, que foi alocado em caixas separadas, totalizando 4 caixas para cada grupo.

### 3.2.2. Preparo da medicação

Os comprimidos de levofloxacina de 500mg (Levaquin®) foram colocados no gral e triturados com ajuda do pistilo até atingirem a forma física de pó, sendo então

diluídos em água destilada na concentração de 25 mg/ml. O preparo foi realizado diariamente nos minutos que antecederam a anestesia e foram administrados por gavagem (FIGURA 8) aos animais.

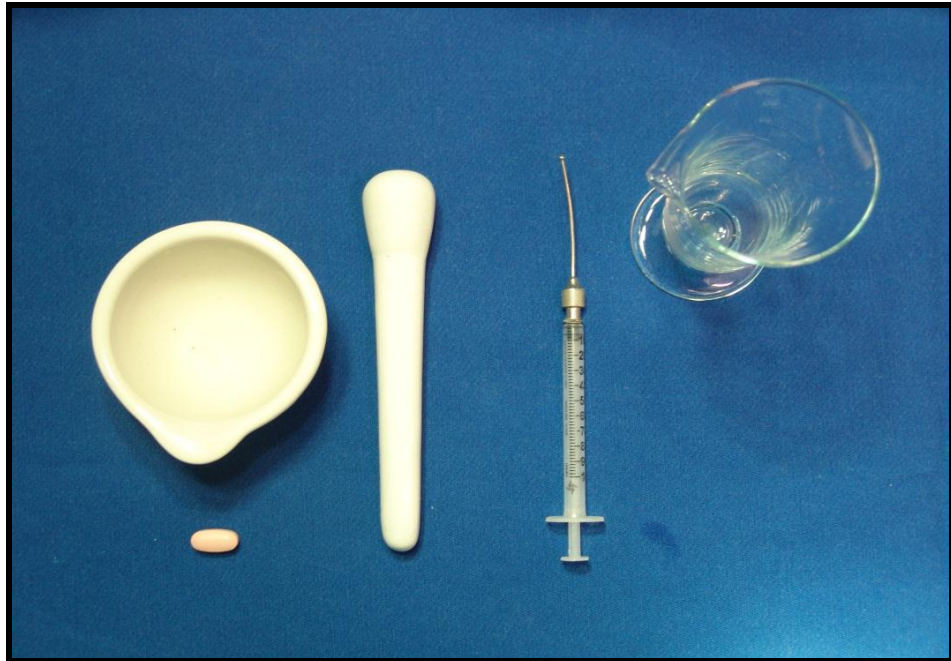


FIGURA 8 – Instrumental utilizado para o preparo da medicação para a gavagem  
Fonte: O autor

### 3.2.3 Gavagem

A administração do medicamento (grupos L), na dose de 100 mg/kg de peso do animal, e da água destilada (grupos C) nos respectivos grupos, foi feita pelo procedimento de gavagem. Para este procedimento de sondagem orogástrica com sonda metálica rígida (FIGURA 9), os animais foram submetidos à anestesia inalatória em campânula de vidro com utilização de éter etílico. Após a anestesia, os animais foram pesados e a dose a ser infundida foi calculada e preparada para infusão em seringa de 3 ml. Ainda sedados, os animais foram sondados e a dose da solução foi infundida lentamente para evitar refluxo e regurgitação. Mesmo após a retirada da sonda, o animal foi mantido com a porção cefálica elevada até a recuperação da sedação, para evitar regurgitação. Esse procedimento foi realizado diariamente, no mesmo horário, e seguiu sempre a mesma sequência de aplicação, sendo as doses calculadas diariamente conforme o peso do animal.





FIGURA 9 – Agulha de gavagem utilizada para sondagem orogástrica  
Fonte: O autor

### 3.2.4 Procedimento cirúrgico

No 8º dia de experimento, os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico que seguiu a seguinte rotina:

#### 3.2.4.1 Pré-operatório

Os animais foram submetidos a jejum de oito horas e restrição hídrica de seis horas antes do procedimento cirúrgico.

#### 3.2.4.2 Anestesia

Foi realizada através da inalação de éter etílico em campânula de vidro fechada, que possui divisória fenestrada para separar o animal (superiormente) do anestésico e dejetos (inferiormente). Os animais foram colocados individualmente na campânula. Obtida anestesia adequada, verificada pela perda dos movimentos voluntários e manutenção dos movimentos respiratórios, o animal foi retirado da

campânula e o plano anestésico foi mantido mediante a inalação do éter etílico embebido em algodão.

### 3.2.4.3 Preparo

O animal foi pesado e os dados anotados para controle posterior. A tricotomia da região a ser operada foi realizada com ajuda de lâmina fria. O animal foi então posicionado sobre o campo operatório em decúbito ventral, com os 4 membros estendidos e a cabeça alinhada ao tronco. Foi submetido à marcação da pele, para delimitar o acesso sobre o tendão de Aquiles, e então foi realizada antisepsia local com PVPI tópico (FIGURA 10).

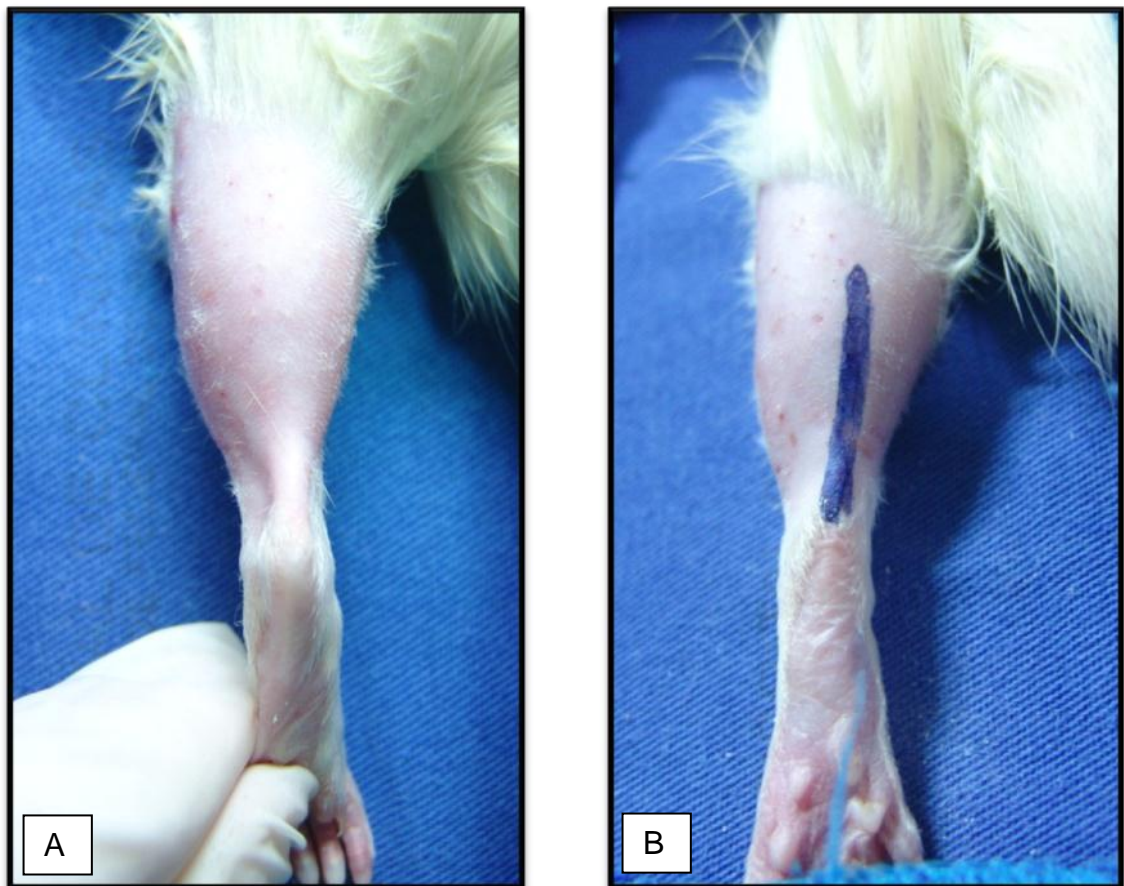


FIGURA 10 – Preparo da região para o procedimento cirúrgico. (A) Tricotomia da região; (B) Marcação da incisão na pele  
Fonte: O autor

### 3.2.4.4 Cirurgia

A equipe foi composta de um único cirurgião (o pesquisador) e dois auxiliares, responsáveis pelo auxílio ao procedimento e pelo monitoramento do plano anestésico do animal.

Após anestesiado, o animal foi mantido em decúbito ventral, com as patas dianteiras fixas à mesa e as patas traseiras mantidas livres para permitir manipulação durante o ato operatório.

Foi feita incisão sobre o tendão de Aquiles, iniciando-se 2 cm proximalmente à inserção e terminando distalmente na inserção do tendão no osso calcâneo. Após abertura do peritendão, mediante dissecação com tesoura de Metzemaum curva, foi feito o isolamento dos tendões conjuntos que compõem o tendão de Aquiles (FIGURA 11).

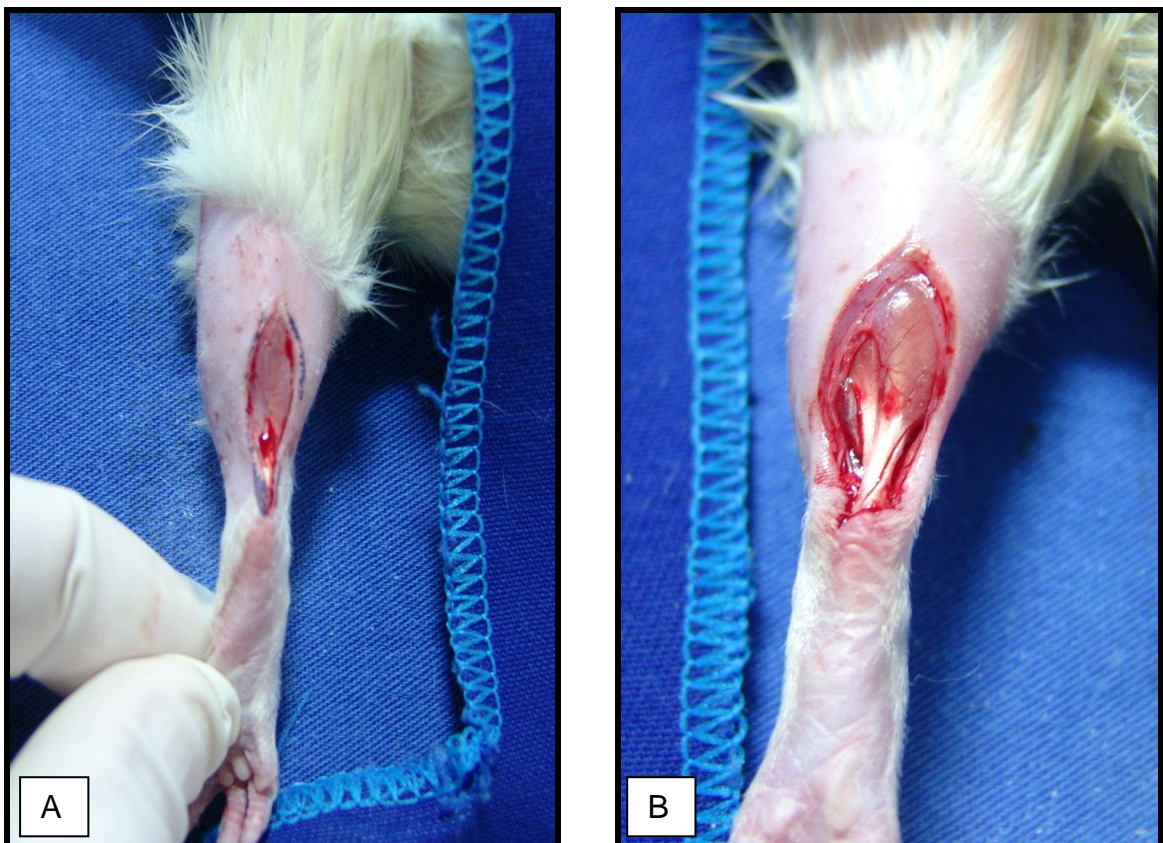


FIGURA 11 – (A) Acesso; (B) Dissecção do tendão de Aquiles  
Fonte: O autor

Foi então realizada secção completa transversa no terço médio do tendão com uso do bisturi. Sutura término-terminal com ponto tipo Kessler modificado foi



realizada com fio mononylon® 6-0. Foi testada a resistência à tração com movimento de flexão da pata traseira. Um único ponto simples de reforço foi feito com mononylon® 5-0 (FIGURA 12).

A ferida foi irrigada com soro fisiológico 0,9%, e a sutura da pele foi feita com pontos simples, utilizando-se mononylon® 5-0 (FIGURA 13). As duas patas traseiras foram submetidas ao mesmo procedimento cirúrgico.

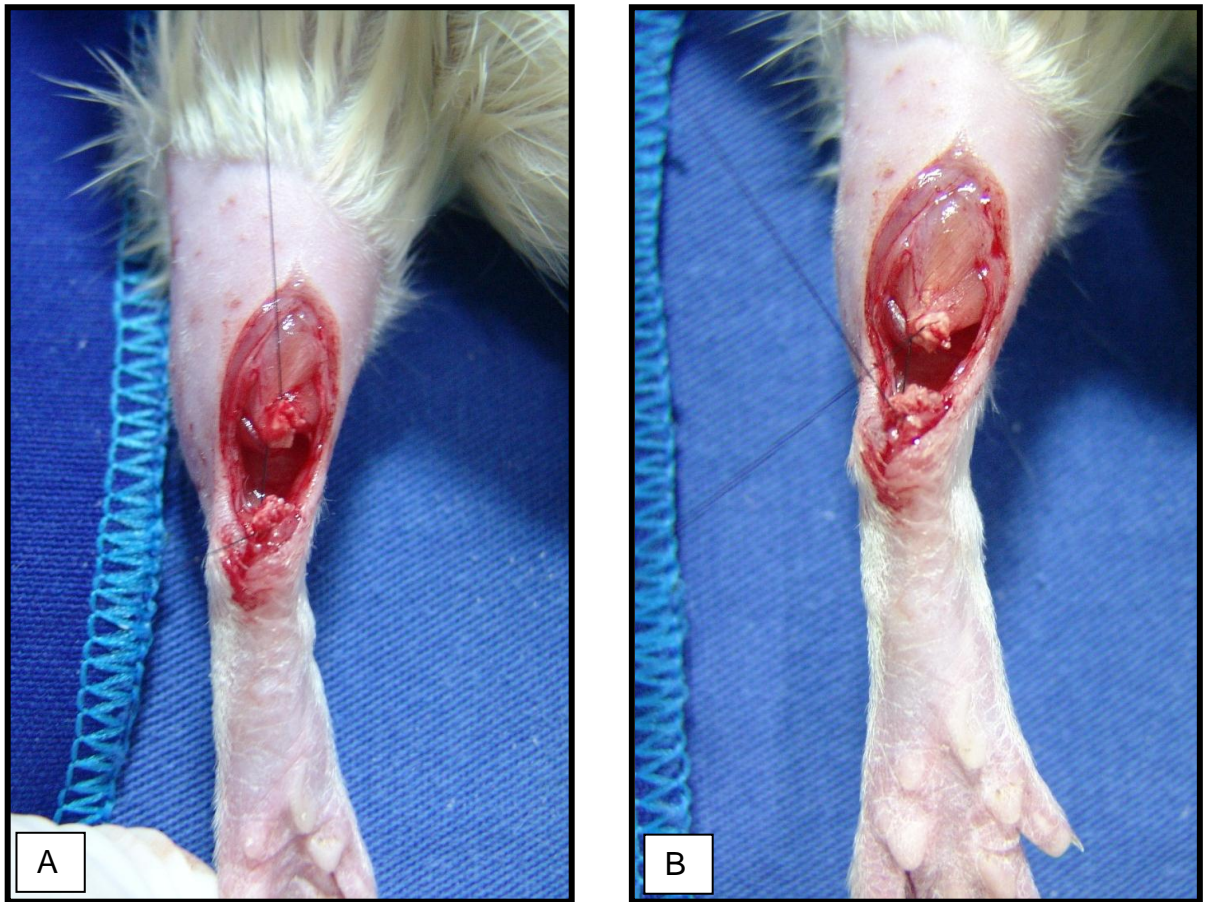


FIGURA 12 – (A) Reparo tenotomia transversa do tendão Aquiles; (B) Ponto de Kessler modificado  
Fonte: O autor

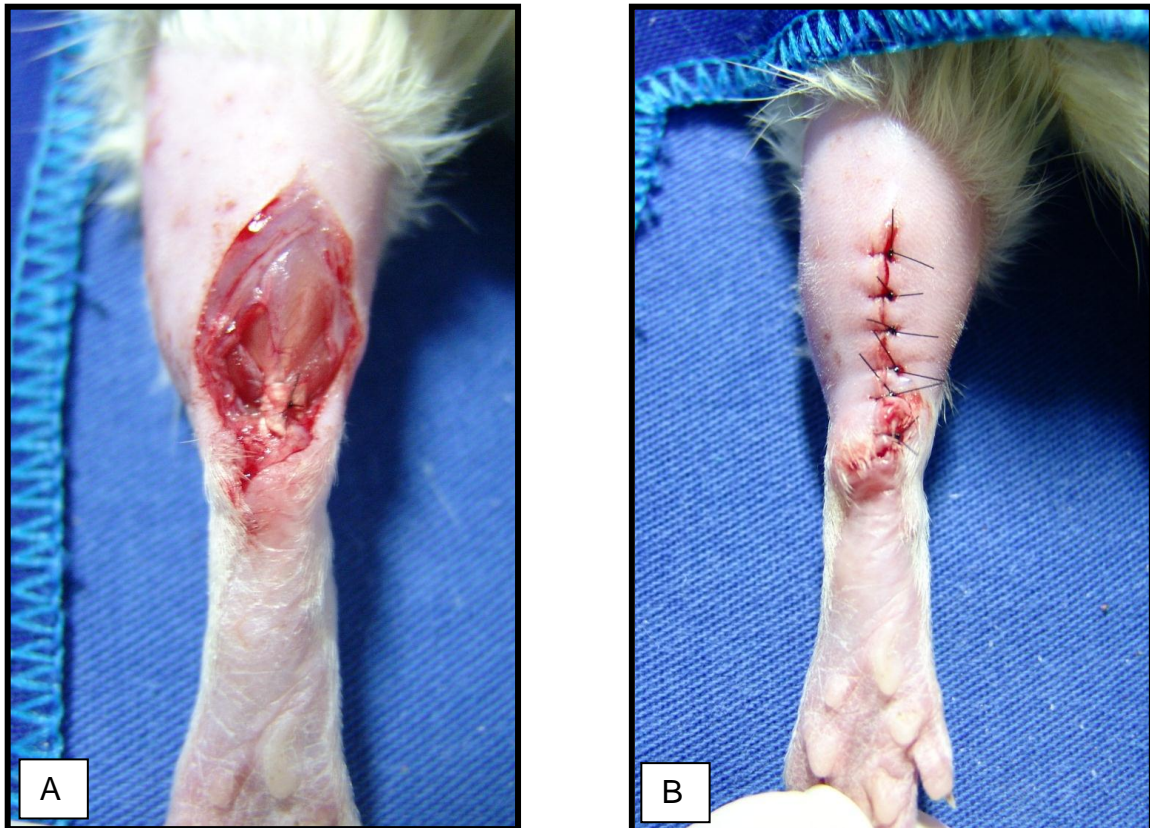


FIGURA 13 – (A) Ponto de reforço com mononylon® 5-0; (B) Sutura da pele com mononylon® 5-0  
Fonte: O autor

#### 3.2.4.5 Cuidado pós-operatório

Ao final da cirurgia, o anestésico foi retirado e a recuperação foi monitorada até haver condições de retorno à gaiola, quando então foi administrada dipirona (Novalgina®), na dose de 20 mg/kg/24h para controle da dor pós-operatória (FIGURA 14). A recuperação anestésica final ocorreu na gaiola. Durante todo o período pós-operatório os animais foram monitorados diariamente quanto à evolução para identificar possíveis complicações, como deiscências e infecções.

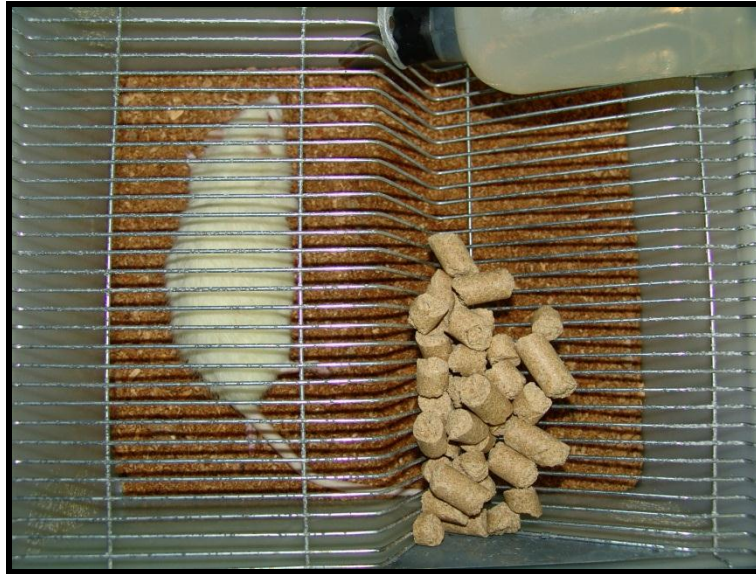


FIGURA 14 – Recuperação pós-operatória  
Fonte: O autor

### 3.2.5 Eutanásia

No 7<sup>o</sup> dia pós-operatório, para os grupos de sete dias, e no final do 14<sup>o</sup> dia pós-operatório, para os grupos de 14 dias, todos os animais de cada grupo foram mortos por dose letal de éter etílico inalatório em campânula de vidro. Após a constatação do óbito, cada rato foi submetido à retirada dos espécimes para análise.

Foi feita a retirada de todo o tendão de Aquiles (FIGURA 15), desde a junção miotendínea até a sua inserção no calcâneo, incluindo parte óssea da inserção, para facilitar a fixação durante o teste de tração.

Os espécimes retirados do lado direito foram separados como corpo de prova para o teste tensiométrico e foram mantidos em SF 0,9% e refrigerados a 5°C enquanto aguardavam o teste, que foi realizado em no máximo duas horas, a contar do óbito do animal (FIGURA 16).





FIGURA 15 – Retirada do tendão de Aquiles para análise tensiométrica  
Fonte: O autor

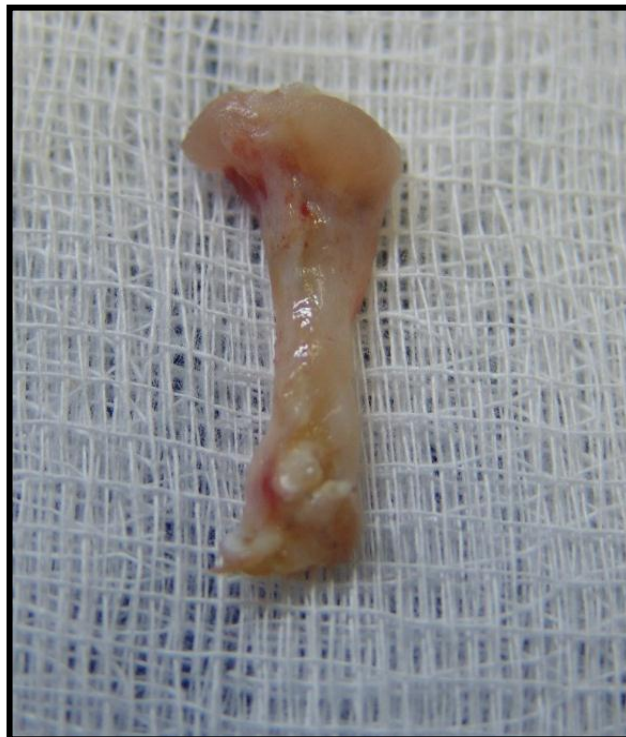


FIGURA 16 – Espécime ressecado para análise tensiométrica  
Fonte: O autor

Os espécimes do lado esquerdo foram estendidos sobre papel filtro e armazenados em frascos identificados contendo formol a 10% para a análise qualitativa do colágeno (FIGURA 17).



FIGURA 17 – Espécime ressecado para análise qualitativa e quantitativa do colágeno  
Fonte: O autor

### 3.2.6 Análise qualitativa do colágeno

A análise do colágeno foi realizada no Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas da UFPR. O método consistiu na identificação e quantificação das fibras colágenas tipo I (maduras) e tipo III (imaturas) por técnica de microscopia ótica com luz polarizada e análise morfométrica computadorizada. Foram realizadas duas secções perpendiculares ao maior eixo da linha de sutura e, após os processos convencionais de desidratação e diafanização, as peças foram emblocadas em parafina. Foram realizados cortes no micrótomo com 4  $\mu\text{m}$  de espessura e posterior coloração com picrosirius-red F3BA.

Analisaram-se os cortes histológicos em aumento de 400 vezes no microscópio óptico Olympus<sup>®</sup> (Olympus, Tokyo, Japão), utilizando-se fonte de luz polarizada. As imagens foram captadas por câmera Sony<sup>®</sup> CCD 101 (Sony, Tóquio, Japão), transmitidas ao monitor colorido Trinitron Sony<sup>®</sup>, congeladas e digitalizadas por meio de placas Oculus TCX. Foi realizada a análise das imagens por meio do



aplicativo Image Pro-Plus, versão 4.5 para Windows<sup>®</sup>. A calibração do sistema foi baseada na densidade óptica dos pontos de resolução (*pixels*) que formam as imagens, selecionando-se o valor limite de melhor resolução. No sistema RGB (*Red, Green, Blue*), foram considerados valores para os tons de vermelho e laranja (colágeno tipo I) e para tons de verde (colágeno tipo III). Somente as áreas ocupadas por fibras tipo I e III entraram no cálculo da porcentagem, o que totalizou sempre 100%. Todas as lâminas foram avaliadas no mesmo período e sob as mesmas condições de calibração, dentro dos parâmetros exigidos pelo referido aplicativo. Deste modo, foi obtido o valor da porcentagem dos colágenos I e III.

### 3.2.7 Estudo tensiométrico

O teste de tração foi realizado posicionando-se cada extremidade do corpo de prova (espécime do tendão de Aquiles ressecado) em duas presilhas, superior e inferior do aparelho. O teste foi realizado com tração com velocidade de 50 mm/min, carga de 10 kg, sensibilidade de 50 g e margem de erro de 0,5%. A tração foi exercida até a ruptura da linha cicatricial no corpo de prova. O ensaio foi comandado automaticamente pelo aparelho e a obtenção dos resultados se fez por programa de computador específico (Tesc<sup>®</sup>) acoplado ao sistema. O programa dispõe de sistema de coordenadas cartesianas cujo eixo x representa a unidade “Distância” e o eixo y a unidade “Força” (FIGURA 18). Tensão máxima foi definida como a quantidade máxima de força suportada pelo tecido, por unidade de área de secção ( $\text{kgf}/\text{cm}^2$ ). Assim, essa variável é dependente das dimensões de tecido ressecado, e é utilizado modelo de tração para corpo de prova cilíndrico. Desta forma, a média da secção transversa do tendão foi de 5 mm. Força máxima consistiu na maior força suportada pelo tecido durante todo o tempo de teste (kgf) (FIGURAS 19 e 20).



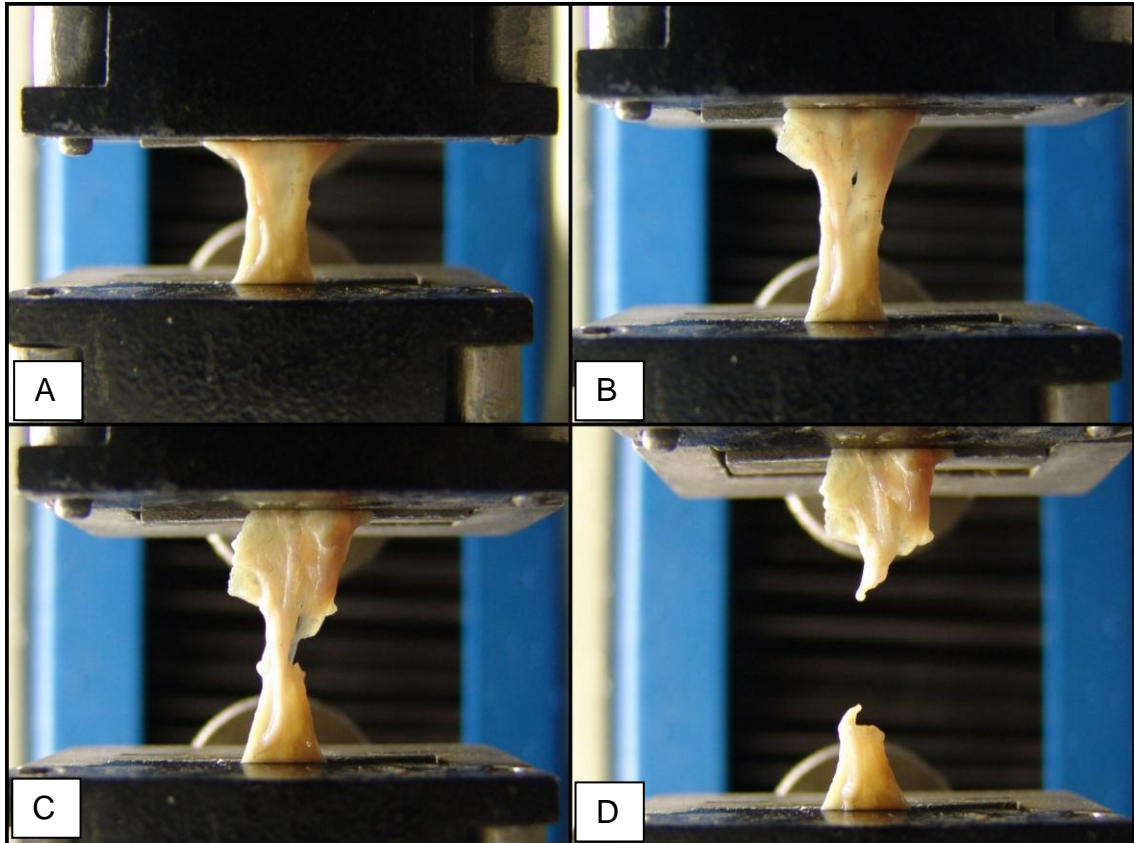


FIGURA 20 – Diferentes momentos do teste de tração. A) Fase inicial; B e C) Fase intermediária; D) Fase final  
Fonte: O autor

### 3.2.8 Teste estatístico

Todos os dados foram tabulados em planilha do programa Microsoft Office Excel<sup>®</sup> (Microsoft, Redmond, WA, EUA), obtendo-se os valores mínimo, máximo e médio e o desvio e erro-padrão para cada variável nos diferentes tempos estudados. Foi utilizado o teste de Tukey para verificar a significância.

Também foi utilizada a análise não-paramétrica através do Estimador de Kaplan-Meyer. O estimador considera tantos intervalos quanto forem o número de falhas distintas. Este estimador de sobrevivência considera a probabilidade estimada de resistência do corpo de prova para aumentos progressivos das variáveis: tensão máxima e força máxima. Foi utilizado o teste de Logrank para verificar o nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 PESO

O peso médio inicial dos animais em todos os grupos foi de  $268,87 \pm 24,19$  g. No dia da eutanásia, o peso médio dos animais foi de  $295,94 \pm 28,12$  g. Não houve diferença entre o peso dos animais entre os grupos de estudo durante o período estudado (TABELA 1).

TABELA 1 - Comparação entre o peso dos grupos no momento inicial, pré-operatório e da eutanásia

Grupos	N	Peso inicial	p*	Peso pré-operat.	p*	Peso eutanásia
		M $\pm$ EP	PI x PPO	M $\pm$ EP	PPO x PE	M $\pm$ EP
<b>L7</b>	16	267,18 $\pm$ 3,91	0,001	281,13 $\pm$ 4,70	0,136	279,25 $\pm$ 4,76
<b>C7</b>	15	268,83 $\pm$ 7,16	0,001	281,32 $\pm$ 8,55	0,221	282,25 $\pm$ 7,52
<b>p (L7 x C7)</b>		0,841		0,984		0,739
<b>L14</b>	15	275,26 $\pm$ 4,13	0,001	296,52 $\pm$ 3,45	0,001	313,86 $\pm$ 4,22
<b>C14</b>	16	264,22 $\pm$ 5,89	0,001	281,58 $\pm$ 6,24	0,001	308,64 $\pm$ 7,23
<b>p (L14 x C14)</b>		0,134		0,074		0,539

Fonte: O autor

Nota: **N**: número de animais no grupo

**L7**: levofloxacina 7 dias

**C7**: controle 7 dias

**L14**: levofloxacina 14 dias

**C14**: controle 14 dias

**M**: média

**EP**: erro-padrão

**p**: nível de significância – resultado do teste t para dados não pareados.

**p\***: nível de significância – resultado do teste t para dados pareados.

**PI**: peso inicial

**PPO**: peso pré-operatório

**PE**: peso eutanásia

## 4.2 AVALIAÇÃO TENSIOMÉTRICA

### 4.2.1 Tensão máxima

Para os grupos de 7 dias (L7 e C7), esta variável apresentou valores médios similares ( $p=1,0$ ); valor médio e de erro-padrão de  $5,59 \pm 0,53 \text{ kgf/cm}^2$  no grupo L7 e  $5,28 \pm 0,64 \text{ kgf/cm}^2$  no grupo C7 (TABELA 2). A média da tensão máxima do grupo L14 foi superior à média do grupo C14 ( $10,06 \pm 1,62 \text{ kgf/cm}^2$  vs  $5,81 \pm 0,53 \text{ kgf/cm}^2$ ,  $p=0,014$ ). Os valores centrais dos dados, dispersão e possíveis dados discrepantes, são mostrados no gráfico 1 para esta variável.

TABELA 2 - Resultados e comparação entre os grupos para a variável tensão máxima

	<b>Grupo</b>	<b>n</b>	<b>Tensão máxima M <math>\pm</math> EP</b>	<b>Valor de p</b>
<b>Análise intergrupos</b>	<b>L7</b>	16	$5,59 \pm 0,53$	1,0
	<b>C7</b>	15	$5,28 \pm 0,64$	
	<b>L14</b>	15	$10,06 \pm 1,62$	<b>0,014</b>
	<b>C14</b>	16	$5,81 \pm 0,53$	
<b>Análise intragrupo</b>	C7 x C14			0,991
	L7 x L14			<b>0,008</b>

Fonte: O autor

Nota: **L7**: levofloxacina 7 dias

**C7**: controle 7 dias

**L14**: levofloxacina 14 dias

**C14**: controle 14 dias

**M**: média -  $\text{Kgf/cm}^2$

**EP**: erro-padrão –  $\text{Kgf/cm}^2$

**P**: nível de significância – teste de Tukey

**n**: número de animais no grupo

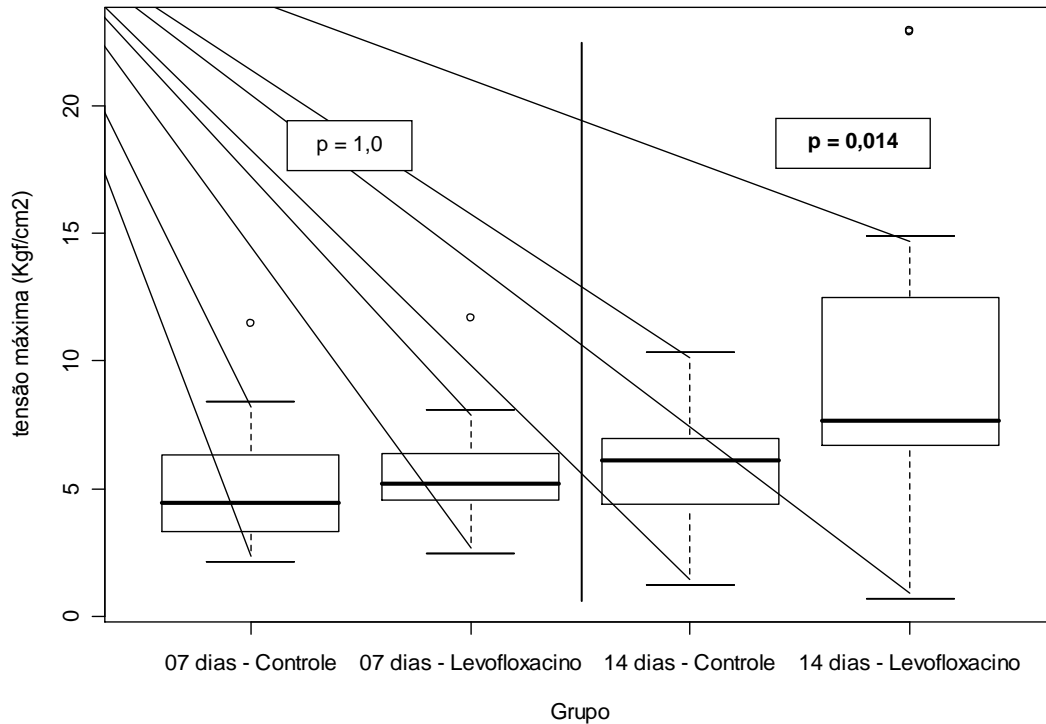


GRÁFICO 1 – Gráfico box-plot com representação dos dados, dispersão e possíveis dados discrepantes da variável tensão máxima nos 4 grupos de estudo

Nota: **p**: nível de significância – teste de Tukey

No gráfico 2 estão representadas as curvas de Kaplan-Meier e valores de  $p$  de Logrank aplicadas à variável tensão máxima. Mediante esta análise, valores similares foram obtidos na comparação entre os grupos L7 e C7 ( $p=0,762$ ). Verificou-se valor maior da tensão máxima para o grupo L 14 em comparação com o grupo C 14 ( $p=0,002$ ). Nas comparações intragrupo, o grupo L14 apresentou valores superiores ao grupo L7 ( $p=0,001$ ), e na comparação entre os grupos controle, C7 e C14, os resultados não mostraram diferença entre eles ( $p=0,753$ ).

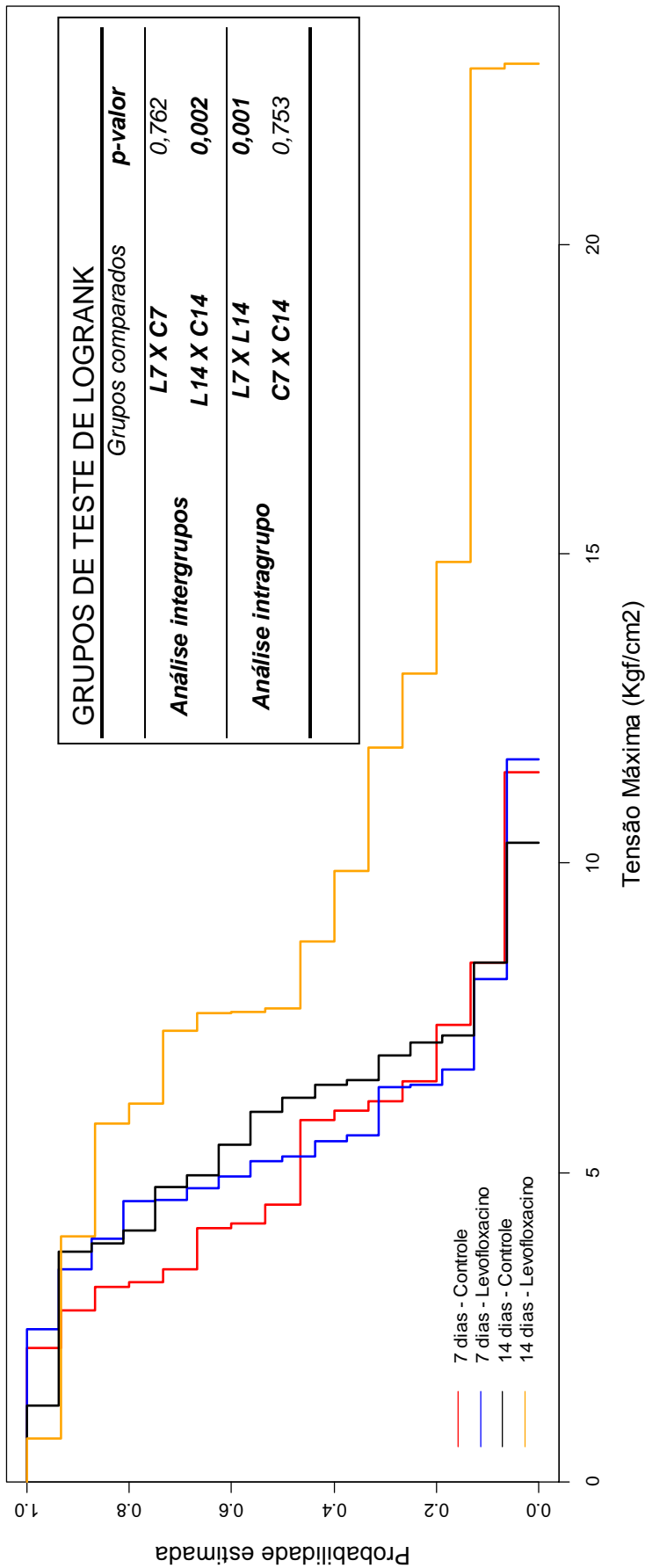


GRÁFICO 2 - Curvas de Kaplan-Meier para a variável tensão máxima. Testes de Logrank e seu p-valor para comparação entre os 4 grupos de estudo

Nota: L7: levofloxacina 7 dias

C7: controle 7 dias

L14: levofloxacina 14 dias

C14: controle 14 dias

p: nível de significância - teste de Logrank

#### 4.2.2. Força máxima

Para os grupos de 7 dias (L7 e C7), esta variável apresentou valores médios similares ( $p=0,989$ ); valor médio e de erro-padrão de  $1,10 \pm 0,10$  kgf no grupo L7 e  $1,04 \pm 0,13$  kgf no grupo C7 (TABELA 3). Nos grupos de 14 dias, a média da força máxima do grupo L14 foi superior à do grupo C14 ( $2,34 \pm 0,32$  kgf vs  $1,10 \pm 0,13$  kgf,  $p=0,005$ ). Os valores centrais dos dados, dispersão e possíveis dados discrepantes, são mostrados no gráfico 3 para esta variável.

TABELA 3 – Resultados e comparação entre os grupos para a variável força máxima

	<b>Grupo</b>	<b>N</b>	<b>Força máxima M <math>\pm</math> EP</b>	<b>Valor de p</b>
<b>Análise</b>	<b>L7</b>	16	$1,10 \pm 0,10$	0,989
	<b>C7</b>	15	$1,04 \pm 0,13$	
<b>Intergrupos</b>	<b>L14</b>	15	$2,34 \pm 0,32$	<b>0,005</b>
	<b>C14</b>	16	$1,10 \pm 0,13$	
<b>Análise</b>	C7 x C14			0,999
<b>Intragrupo</b>	L7 x L14			<b>0,009</b>

Nota: **L7**: levofloxacina 7 dias

**C7**: controle 7 dias

**L14**: levofloxacina 14 dias

**C14**: controle 14 dias

**M**: média – Kgf

**EP**: erro-padrão – Kgf

**p**: nível de significância – teste de Tukey

**N**: número de animais no grupo



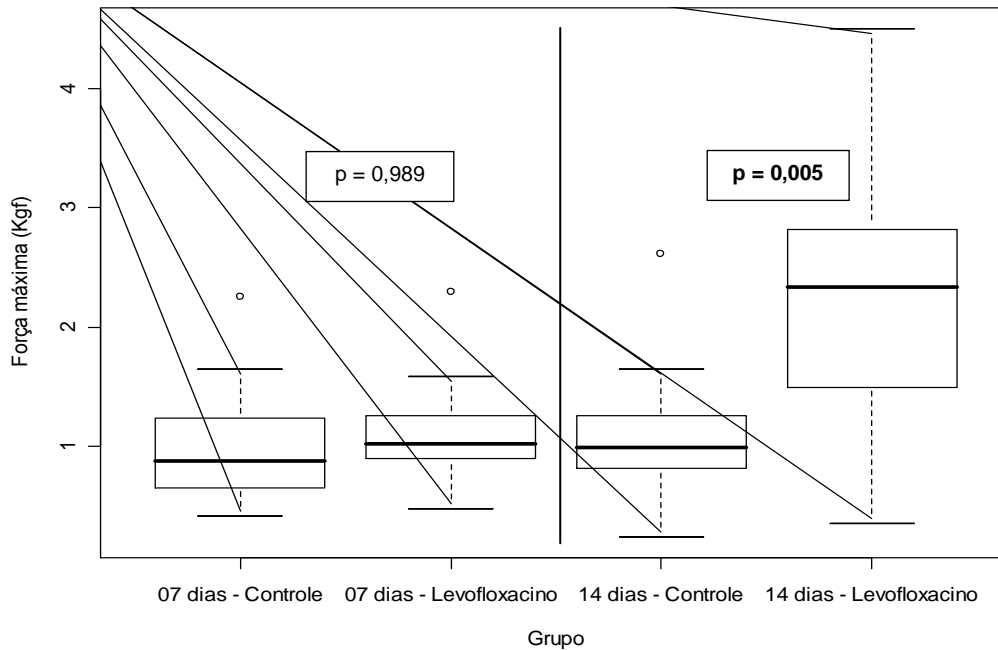


GRÁFICO 3 – Gráfico box-plot com representação dos dados, dispersão e possíveis dados discrepantes da variável tensão máxima nos 4 grupos de estudo

Nota: **p**: nível de significância – teste de Tukey.

No gráfico 4 estão representadas as curvas de Kaplan-Meier e valores de  $p$  de Logrank aplicadas à variável força máxima. Mediante esta análise dos grupos de 7 dias, os resultados foram similares para L7 e C7 ( $p=0,768$ ). Nos grupos de 14 dias, foram verificados no grupo L14 valores maiores da força máxima em comparação ao grupo C 14 ( $p=0,004$ ). Na comparação intragrupo, o grupo L14 apresentou valores maiores em comparação com o grupo L7 ( $p=0,001$ ), enquanto a comparação entre os grupos controle, C7 e C14, não mostrou diferença entre eles ( $p=0,656$ ).

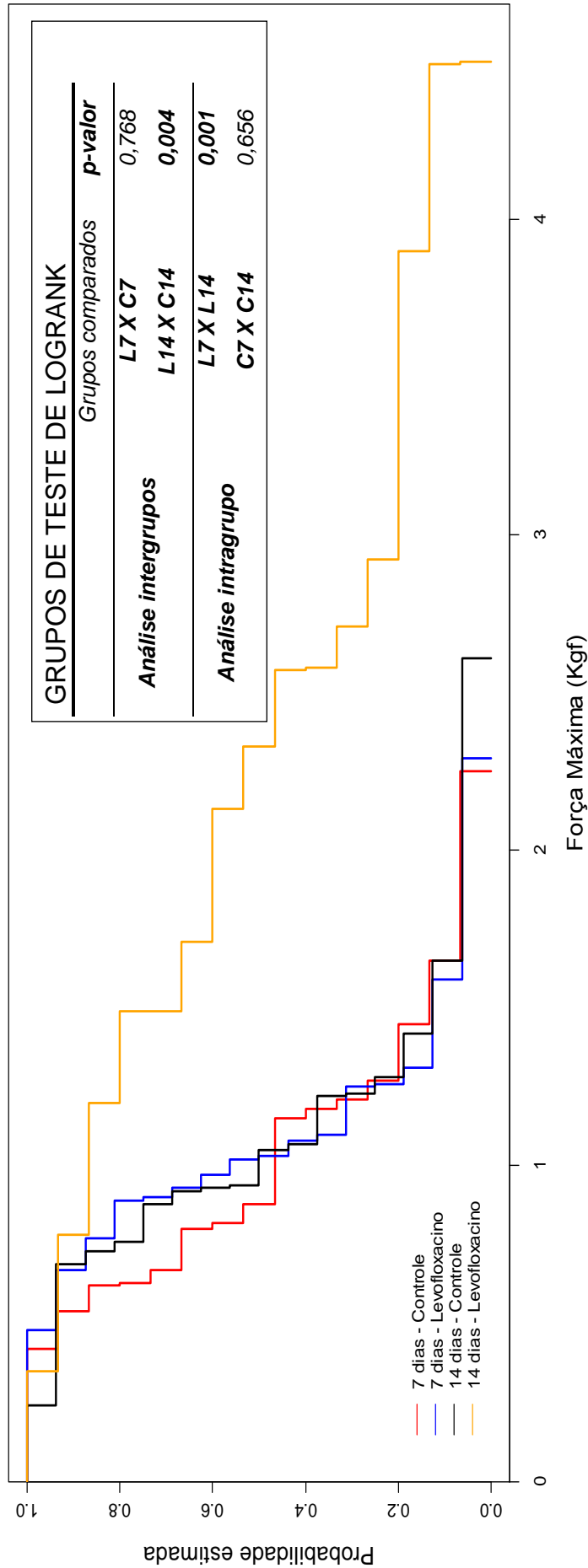


GRÁFICO 4 – Curvas de Kaplan-Meier para a variável força máxima. Testes de Logrank e seu p-valor para comparação entre os 4 grupos de estudo

Nota: L7: levofloxacina 7 dias

C7: controle 7 dias

L14: levofloxacina 14 dias

C14: controle 14 dias

p: nível de significância – teste de Logrank

### 4.3 ANÁLISE QUALITATIVA DO COLÁGENO

Os grupos de 7 dias, levofloxacina (L7) e controle (C7), analisados quanto à distribuição do colágeno, apresentaram resultados similares para o colágeno maduro e imaturo ( $p=0,525$ ). Os valores da média e erro-padrão, assim como o p-valor, estão expressos no gráfico 5 e tabela 4, a seguir.

TABELA 4 – Resultados da distribuição dos colágenos maduro e imaturo e a comparação entre os grupos de 7 dias

	Grupo L7 (n=16)	Grupo C7 (n=15)	p-valor
	M ± EP	M ± EP	
<b>Imaturo</b>	90,38 ± 3,15 %	81,41 ± 4,56 %	0,525
<b>Maduro</b>	9,63 ± 3,15 %	18,58 ± 4,56 %	

Nota: **L7**: levofloxacina 7 dias  
**C7**: controle 7 dias  
**M**: média  
**EP**: erro-padrão  
**p**: nível de significância – resultado do teste de Tukey  
**n**: número de animais na amostra

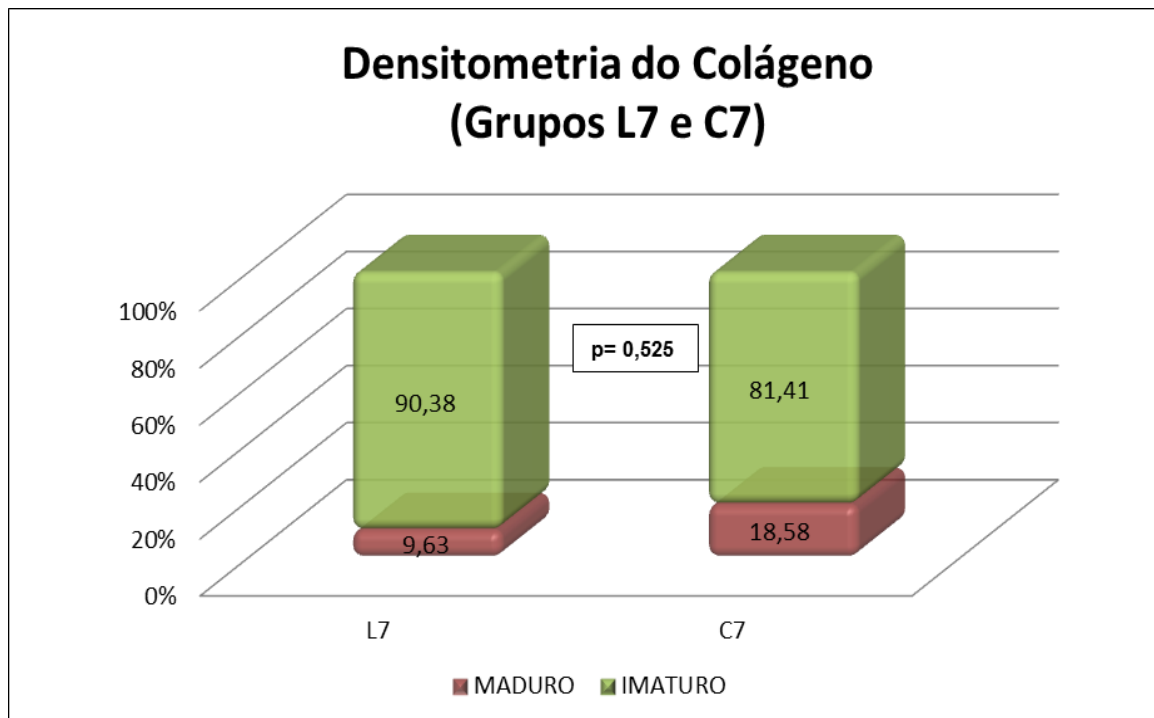


GRÁFICO 5 – Densitometria das fibras de colágeno nos grupos de estudo de 7 dias, valores médios da distribuição do colágeno maduro e imaturo

Nota: **L7**: levofloxacina 7 dias  
**C7**: controle 7 dias  
**p**: nível de significância – resultado do teste de Tukey

Os grupos de 14 dias, levofloxacin (L14) e controle (C14), analisados quanto à distribuição do colágeno, apresentaram resultados similares para o colágeno maduro e imaturo ( $p=0,996$ ). Os valores da média e erro-padrão, assim como o p-valor, estão expressos no gráfico 6 e tabela 5, a seguir.

TABELA 5 – Resultados da distribuição dos colágenos maduro e imaturo e a comparação entre os grupos de 14 dias

	<b>Grupo L14 (n=15)</b> <b>M ± EP</b>	<b>Grupo C14 (n=16)</b> <b>M ± EP</b>	<b>p-valor</b>
<b>Imaturo (%)</b>	70,88 ± 5,04	72,19 ± 5,34	0,997
<b>Maduro (%)</b>	29,11 ± 5,04	27,79 ± 5,34	

Nota: **L14:** levofloxacin 14 dias  
**C14:** controle 14 dias  
**M:** média  
**EP:** erro-padrão  
**p:** nível de significância – resultado do teste de Tukey  
**n:** número de animais na amostra

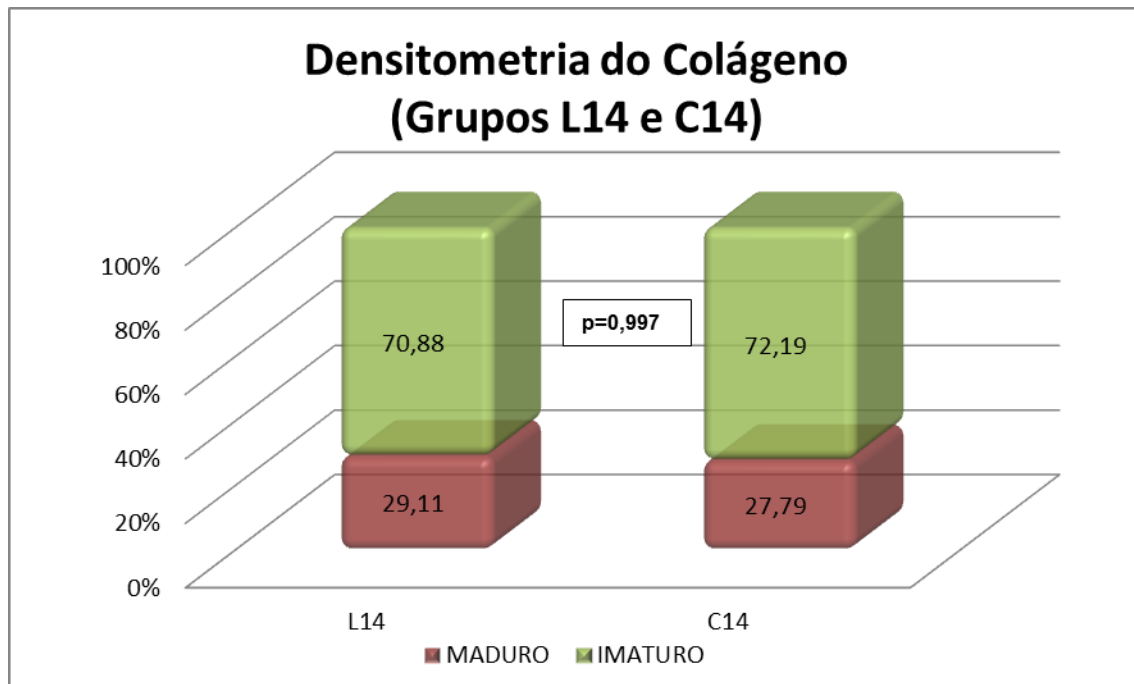


GRÁFICO 6 – Densitometria das fibras de colágeno nos grupos de estudo de 14 dias, valores médios da distribuição do colágeno maduro e imaturo

Nota: **L14:** levofloxacin 14 dias  
**C14:** controle 14 dias  
**p:** nível de significância – resultado do teste de Tukey

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 ANIMAIS E MÉTODO

Desde a primeira descrição de tendinite relacionada ao uso de quinolona, dezenas de relatos têm sido descritos (BAILEY; KIRK; PEDDIE, 1983). O aumento do risco de tendinite e até mesmo de ruptura do tendão de Aquiles após utilização de levofloxacina tem se verificado na rotina diária (LEWIS; GUMS; DICKENSHEETS, 1999; FILIPPUCCI *et al.*, 2003; MATHIS *et al.*, 2003; KOWATARI *et al.*, 2004; BURKHARDT *et al.*, 2004; BEYER; SCHELLONG, 2006; CORRAO *et al.*, 2006). Os pacientes que sofrem esse tipo de lesão habitualmente têm indicação cirúrgica e as condições de cicatrização do tendão doente submetido à sutura foram questionadas.

No presente estudo, avaliou-se a cicatrização do tendão de Aquiles de ratos submetidos previamente ao uso de levofloxacina. A grande maioria dos estudos experimentais em tendões para lesão e reparo é realizada em animais. O rato foi o animal escolhido para a pesquisa por apresentar características biológicas que possibilitam facilidade de manuseio e acompanhamento, ser resistente à manipulação, ter baixo custo para aquisição e manipulação e ser amplamente utilizado em estudos de cicatrização de tendão (LIN; CARDENAS; SOSLOWSKY, 2004).

Os animais foram submetidos à utilização de levofloxacina durante sete dias, na tentativa de reproduzir as condições clínicas observadas na rotina diária do tratamento da maioria dos processos infecciosos. A levofloxacina é utilizada rotineiramente em dose única diária, com base no tempo de meia vida e nas concentrações plasmáticas e teciduais do medicamento (LEVAQUIN, 2009). Deste modo, o medicamento foi administrado por sondagem orogástrica, uma única vez ao dia. A dosagem foi baseada no estudo de Kashida e Kato (1997), que testaram a toxicidade e alterações de tendinopatia em tendões de ratos com uso de levofloxacina nas dosagens de 100 a 900 mg/kg de peso do animal. No estudo de Kashida e Kato, os animais foram submetidos à dose única de levofloxacina, e após um dia foi realizado teste para verificar a toxicidade sobre o tendão. No presente estudo, optou-se pela dosagem de 100 mg/kg de peso do animal devido ao tempo que o medicamento foi utilizado – sete dias –, o que poderia resultar em aumento das complicações e possível mortalidade dos animais. A dosagem de 100 mg/kg de

peso, utilizada por sete dias, não foi testada anteriormente quanto às alterações tóxicas sobre o tendão. Sendzik *et al.* (2005) utilizaram concentrações de levofloxacina em cultura de tenócitos, que são semelhantes às obtidas no plasma quando da dosagem padrão na rotina clínica ( $C_{máx}$ : 4.8-5.7mg/L). Os autores verificaram que, nessa dosagem, os marcadores de apoptose e as metaloproteinases estavam aumentados. Sugeriu-se então que, nesta dosagem de 100 mg/kg, as concentrações plasmáticas e sobre o tendão atinjam níveis maiores que aquelas obtidas durante a utilização do medicamento na rotina, e que levam então as alterações tóxicas sobre o tendão.

Utilizou-se neste estudo a tenotomia e sutura do tendão de Aquiles no primeiro dia após o término do uso da levofloxacina. Não foi encontrado, na literatura, relato de trabalho que utiliza levofloxacina antes da tenotomia. O modelo realizado segue os modelos para cicatrização de tendão mais utilizados no que se refere ao método de lesão aplicado, que são os de transecção (KURTZ *et al.*, 1999; ZHANG *et al.*, 2003; YUAN *et al.*, 2003). Entre estes, o de transecção completa é o que melhor simula as condições encontradas na prática clínica, são melhor reproduzíveis em localização, padrão e grau de extensão da lesão e, por este motivo, são preferíveis (WALSH; FRANK, 1988). A utilização deste modelo permitiu criar uma ruptura completa do tendão, com formação de *gap* e posterior correção com pontos de aproximação dos cotos do tendão, gerando tecido cicatricial mais próximo do normal no local da lesão (O'DONOGHUE *et al.*, 1961). Optou-se por ponto tipo "Kessler" modificado, reforçado com um ponto simples. Embora a resistência do ponto de sutura com quatro e oito passadas tenha demonstrado maior resistência que a de duas passadas (WINTERS *et al.*, 1998; DINOPOULOS *et al.*, 2000; STRICKLAND, 2000; BARRIE; WOLFE, 2001), sua utilização para este modelo em ratos tornaria a sutura muito mais difícil. Além disso, para o pequeno tendão de Aquiles do rato representaria aumento na lesão e comprometimento da vascularização do tendão. Yuan *et al.* (2003) utilizaram somente dois pontos simples e estudaram a força de resistência do tendão e a quantidade de colágeno após dez dias. Optou-se neste estudo por modelo misto com um ponto de duas passadas e um ponto simples, o que conferiu boa resistência à sutura e tornou o procedimento tecnicamente mais fácil de ser aplicado em ratos.

O tecido de melhor qualidade, gerado pela aproximação dos cotos, permitiu melhor avaliação da força de resistência à tração e força de ruptura. Optou-se por

realizar tenotomia do tendão do músculo plantar. Desta forma, evitou-se possível ação protetora do tendão do músculo plantar delgado sobre a sutura do tendão de Aquiles, deixando toda a análise sobre o tendão em estudo. Por este motivo, a maioria dos trabalhos revisados utiliza a tenotomia do tendão plantar delgado como parte do modelo experimental (KURTZ *et al.*, 1999; YUAN *et al.*, 2003; MURRELL *et al.*, 2008).

Poucos trabalhos, como o de Palmes *et al.* (2002), utilizaram algum tipo de imobilização no pós-operatório. Naquele estudo, os autores já haviam demonstrado o efeito benéfico da mobilização precoce, já que os grupos que foram submetidos à imobilização demoraram mais tempo para recuperar a força de resistência. Não foi utilizado nenhum tipo de imobilização no presente estudo e permitiu-se a mobilização livre no pós-operatório imediato, de acordo com quase a totalidade dos trabalhos revisados. Deste modo, toda a resistência esteve inicialmente sobre a sutura e durante a evolução sobre a cicatriz em formação. Murrell *et al.* (1993), em estudo com ratos submetidos à tenotomia de Aquiles, mostraram que no 15º dia a função estava restaurada, independente da mobilização imediata ou não.

Procedeu-se à retirada e análise dos espécimes no 7º e no 14º dia pós-operatório conforme o grupo em estudo. Embora os trabalhos de cicatrização de tendão mostrem grande variação no que tange ao momento de avaliação pós-operatória, a maior parte dos trabalhos fez a análise da fase precoce da cicatrização até o 14º dia (FORSLUND; ASPENBERG, 2001; YUAN *et al.*, 2003; FORSLUND; RUEGER; ASPENBERG, 2003; MURRELL *et al.*, 2008). O estudo desta fase com amostras no 7º e 14º dias permitiu avaliar as modificações durante a fase inicial do ganho de resistência do tendão, assim como a mudança da deposição do colágeno tipo III para o tipo I, que ocorre mais precocemente. Nas avaliações tardias, após 35 dias, habitualmente a resistência do tendão já está restabelecida, com valores próximos dos normais (PALMES *et al.*, 2002), e a deposição do colágeno tem modificação mais lenta, o que tornaria a sua avaliação qualitativa menos sensível. Outra opção para análise do colágeno para estudos tardios é realizar a análise quantitativa, mediante dosagem da hidroxiprolina (MURRELL *et al.*, 2008), prática que elimina o viés da análise qualitativa tardia para cicatrização do tendão. A análise qualitativa do colágeno pelo método empregado no presente estudo, por suas características específicas, também minimizou possível interferência do examinador na avaliação das lâminas. A leitura das porcentagens de fibras maduras e imaturas

foi realizada pelo computador. O patologista restringiu-se à identificação, de forma padronizada, do campo histológico a ser analisado. Os espécimes retirados foram testados imediatamente após a coleta quanto à resistência à tração. A possibilidade de alterações na resistência do tecido submetido a congelamento para análise posterior foi evitada fazendo-se todas as avaliações mecânicas até duas horas após a morte de cada animal. O método utilizado para teste de tração é muito semelhante ao descrito nos trabalhos sobre resistência tendinosa em ratos (FORSLUND; ASPENBERG, 2001; FORSLUND; RUEGER; ASPENBERG, 2003; MURRELL *et al.*, 2008). Presilhas são utilizadas para fixação das extremidades da amostra, que é presa ao aparelho de tração e submetida a estresse na velocidade de 1 mm/segundo. A coleta de dados realizada pelo computador acoplado à máquina de tração permitiu análise objetiva das variáveis avaliadas durante o teste.

## 5.2 RESULTADOS

Todos os grupos apresentaram ganho de peso durante os diferentes momentos do estudo, exceto os grupos de sete dias, entre o pré-operatório e a eutanásia. Possivelmente isso se deve ao estresse após cirurgia. Os grupos de 14 dias, entre o pré-operatório e a eutanásia, também apresentaram ganho de peso, o que pode ser explicado pela redução do estresse com o passar dos dias e a recuperação do animal. Além disso, tiveram mais tempo para o ganho de peso, o qual, conforme observado, ocorreu na segunda semana após cirurgia. Nos trabalhos revisados sobre cicatrização do tendão, não há menção sobre alterações no peso dos animais. No presente estudo, a inclusão do parâmetro “peso corpóreo” justificase porque permitiu confirmar o ganho de peso no período pré-operatório e a recuperação do peso no período pós-operatório. Este parâmetro clínico nutricional é importante, uma vez que possíveis interferências na nutrição e no peso dos animais podem representar também prejuízo no processo cicatricial de modo geral. Esta análise permitiu também excluir diferenças entre os grupos de estudo, tornando as comparações mais adequadas. Além disso, não se verificou interferência do medicamento sobre o peso dos animais antes e após a cirurgia.

Não se encontrou, na revisão da literatura, estudo que testasse a cicatrização do tendão em ratos submetidos à terapêutica prévia com levofloxacina.



No presente estudo não houve diferença quanto à resistência do tendão nos grupos de sete dias. Possivelmente isso se deve ao tempo curto pós-operatório. Durante os três a quatro primeiros dias após a lesão, toda a tensão está concentrada na sutura, e após este período há um ganho progressivo de resistência à tração. Um tempo curto de evolução para análise da cicatrização do tendão pode representar um espaço pequeno de tempo para determinar alterações cicatriciais que possam ser identificadas ou sensíveis à análise tensiométrica. A cicatrização do tendão passa por um processo mais lento de deposição do colágeno tipo I. As possíveis interferências no mecanismo de cicatrização do tendão submetido à alteração tóxica pela levofloxacina provavelmente não puderam ser identificadas neste primeiro momento.

Nos grupos de 14 dias, o resultado de maior resistência tênsil do grupo levofloxacina no teste tensiométrico foi inesperado. Uma hipótese para explicar os dados obtidos seria o aumento dos mediadores inflamatórios no grupo submetido à terapêutica prévia com levofloxacina. Possivelmente a dose empregada do medicamento induziu processo inflamatório, mas não tóxico, como proposto por diversos autores (KASHIDA; KATHO, 1997; SENDZIK *et al.*, 2005; SENDZIK *et al.*, 2010), como aumento das metaloproteinases 1 e 13 e do mediador de apoptose caspase 3. Outra possibilidade é que o aumento dessas enzimas tenha ocorrido em amplitude menor que a resposta para reparação. Pode-se supor que este grupo de animais apresentou resposta inflamatória de reparação durante a utilização da levofloxacina, antes mesmo da lesão produzida – tenotomia e sutura –, e que se sobrepôs ao mecanismo de lesão. É possível que a tenotomia tenha amplificado a resposta reparadora anterior.

Na prática clínica, os relatos de casos de complicações sobre os tendões mais frequentemente são de tendinite e em menor número de rupturas tendinosas. (LEONE *et al.*, 2003). Especula-se que nestes casos o processo de reparação também é mais efetivo que o processo que leva à lesão.

É possível que nestes casos a existência de resposta inflamatória de reparo pode ter sido amplificada após a tenotomia e a sutura do tendão. Como não havia durante o processo cicatricial a ação direta do medicamento sobre o tendão, provavelmente não existia mais estímulo para liberação das metaloproteinases e os mecanismos de tendinopatia, como as alterações na interação célula-célula e célula-matriz, não ocorreram.

Na análise intragrupo controle não houve diferença entre 7 e 14 dias. O estudo de Palmes *et al.* (2002) foi o que avaliou maior número de momentos durante a cicatrização do tendão. Naquele trabalho, os tendões foram testados com 0, 4, 8, 12, 16, 35 e 112 dias de pós-operatório e após o 12º dia é que ocorreu ganho mais rápido da força de resistência. Este resultado vai de encontro ao observado no presente estudo no que se refere ao grupo controle, já que não foi observado ganho de força neste período. A análise intragrupo levofloxacina mostrou ganho de força entre o 7º e o 14º dias. Possivelmente pelos mesmos motivos propostos anteriormente, de ação reparadora precoce, com ganho de força de resistência do tendão.

Na análise qualitativa do colágeno, não houve diferença entre os grupos no 7º e no 14º dias, entretanto a análise mostrou grau maior de maturação do colágeno entre o 7º e 14º dias dentro do grupo levofloxacina. Isto poderia explicar em parte a maior resistência do tendão neste grupo, uma vez que existe relação entre o grau de maturação das fibras e a resistência da cicatriz. Habitualmente, quanto maior o grau de maturação das fibras colágenas, maior é a resistência da cicatriz em formação.

## 6 CONCLUSÃO

No modelo experimental realizado, a utilização de levofloxacina antes da tenotomia e sutura do tendão de Aquiles:

1. Interfere aumentando a força máxima e a tensão máxima no grupo de 14 dias quando comparado ao grupo controle;
2. Não modifica a força máxima e a tensão máxima no grupo de 7 dias quando comparado ao grupo controle;
3. Não modifica o processo de maturação do colágeno em 7 e 14 dias após a lesão.

## REFERÊNCIAS

- ABRAHAMSSON, S. O. Matrix metabolism and healing in the flexor tendon. Experimental studies on rabbit tendon. **Scand J Plast Reconstr Surg**, Stockholm, v. 23, n. 1, p. 1-51, 1991.
- ABRAHAMSSON, S. O.; LOHMANDER, S.; Differential effects of insulin-like growth factor-I on matrix and DNA synthesis in various regions and types of rabbit tendons. **J Orthop Res**, Hoboken, v. 14, n. 3, p. 370-376, 1996.
- ALÓS, J. I. Quinolonas. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, Barcelona, v. 27, n. 5, p. 290-297, 2009.
- AMIEL, D. *et al.* Stress deprivation effect on metabolic turnover of the medial collateral ligament collagen. A comparison between nine- and 12-week immobilization. **Clin Orthop Relat Res**, New York, v. 172, n. 1, p. 265-70, 1983.
- BAILEY, R. R.; KIRK, J. A.; PEDDIE, B. A. Norfloxacin-induced rheumatic disease. **N Z Med J**, Wellington: New Zealand, v. 96, p. 590, 1983.
- BALL, P. Efficacy and Safety of Levofloxacin in the context of other contemporary fluoroquinolones: a review. **Current Therapeutic Research**, Bridgewater, v. 64, n. 9, p. 646-661, 2003.
- BARRIE, K. A.; WOLFE, S. W. The relationship of suture design to biomechanical strength of flexor tendon repairs. **Hand Surg**, Singapore, v. 6, n. 1, p. 89-97, 2001.
- BERTINO, J. JR.; FISH, D. The safety profile of the fluoroquinolones. **Clin Ther**, New York, v. 22, n. 7, p. 798-817, 2000.
- BEYER, J.; SCHELLONG, S. Bilateral plantar tendinitis during levofloxacin therapy. **Br J Clin Pharmacol**, London, v. 61, n. 5, p. 609, 2006.
- BURKHARDT, O. *et al.* Recurrent tendinitis after treatment with two different fluoroquinolones. **Scand J Infect Dis**, Stockholm, v. 36, n. 4, p. 315-316, 2004.
- BROUGHTON, G. 2<sup>ND</sup>; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. The basic science of wound healing. **Plast Reconstr Surg**, Baltimore, v. 117, n. 7s, p. 12s-34s, 2006.
- CAMPOS, A. C. L.; BORGES-BRANCO, A.; GROTH, A. K. Cicatrização de feridas. **Arq Bras Cir Dig**, São Paulo, v. 20, n. 1, p. 51-58, 2007.
- CARBON, C. Comparison of side effects of levofloxacin versus other fluoroquinolones. **Chemotherapy**, New York, v. 47, n. 3, p. 9-14, 2001.

CARMONT, M. R.; MAFFULLI, N. Achilles tendon rupture following surgical management for tendinopathy: a case report. **BMC Musculoskelet Disord**, London, v. 8, n. 19, 27 Feb. 2007. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2474/8/19>>. Acesso em: 03/01/10.

CORRAO, G. *et al.* Evidence of tendinitis provoked by fluoroquinolone treatment: a case-control study. **Drug Saf**, Auckland, v. 29, n. 10, p. 889-896, 2006.

DINOPOULOS, H. T. *et al.* The resistance of a four- and eight-strand suture technique to gap formation during tensile testing: an experimental study of repaired canine flexor tendons after 10 days of in vivo healing. **J Hand Surg Am**, St Louis, v. 25, n. 3, p. 489-498, 2000.

DE SARRO, A.; DE SARRO, G. Adverse reactions to fluoroquinolones: an overview on mechanistic aspects. **Curr Med Chem**, Schiphol- Netherlands, v. 8, n. 4, p. 371-384, 2001.

DI ROSA, M.; PAPADIMITRIOU, J. M.; WILLOUGHBY, D. A. A histopathological and pharmacological analysis of the mode of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **J Pathol**, London, v. 105, n. 4, p. 239-256, 1971.

EHRlich, H. P. *et al.* Dynamic changes appearing in collagen fibers during intrinsic tendon repair. **Ann Plast Surg**, Boston, v. 54, n. 2, p. 201-206, 2005.

FERRARA, N. Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis. **Kidney Int**, New York, v. 56, n. 3, p. 794-814, 1999.

FILIPPUCCI, E. *et al.* Levofloxacin-induced bilateral rupture of the Achilles tendon: clinical and sonographic findings. **Reumatismo**, Milano, v. 55, n. 4, p. 267-269, 2003.

FORSLUND, C.; ASPENBERG, P. Tendon healing stimulated by injected CDMP-2. **Med Sci Sports Exerc**, Madison, v. 33, n. 5, p. 685-687, 2001.

FORSLUND, C.; ASPENBERG, P. Improved healing of transected rabbit Achilles tendon after a single injection of cartilage-derived morphogenetic protein-2. **Am J Sports Med**, Baltimore, v. 31, n. 4, p. 555-559, 2003.

FORSLUND, C.; RUEGER, D.; ASPENBERG, P. A comparative dose-response study of cartilage-derived morphogenetic protein (CDMP)-1, -2 and -3 for tendon healing in rats. **J Orthop Res**, Hoboken, v. 21, n. 4, p. 617-621, 2003.

GELBERMAN, R. H.; AMIEL, D.; HARWOOD, F. Genetic expression for type I procollagen in the early stages of flexor tendon healing. **J Hand Surg Am**, St Louis, v. 17, n. 3, p. 551-558, 1992.

GELBERMAN, R. H. *et al.* Flexor tendon repair in vitro: a comparative histologic study of the rabbit, chicken, dog, and monkey. **J Orthop Res**, Hoboken, v. 2, n. 1, p. 39-48, 1984.

GELBERMAN, R. H. *et al.* The effect of gap formation at the repair site on the strength and excursion of intrasynovial flexor tendons. An experimental study on the early stages of tendon healing in dogs. **J Bone Surg Am**, Boston, v. 81, n. 7, p. 975-982, 1999.

GULOTTA, L. V. *et al.* Stem cells genetically modified with the developmental gene MT1-MMP improve regeneration of the supraspinatus tendon-to-bone insertion site. **Am J Sports Med**, Baltimore, v. 38, n. 7, p. 1429-1437, 2010.

HAYEM, G. *et al.* Cytofluorometric analysis of chondrotoxicity of fluoroquinolone antimicrobial agents. **Antimicrob Agents Chemother**, Washington, v. 38, n. 2, p. 243-247, 1994.

HOOLEY, C. J.; COHEN, R. E. A model for the creep behavior of tendon. **Int J Biolog Macromolecules**, Guildford, v. 1, n. 3, p. 123-132, 1979.

HURLEY, J. V.; EDWARDS, B.; HAM, K. N. The response of newly formed blood vessels in healing wounds to histamine and other permeability factors. **Pathology**, London, v. 2, n. 2, p. 133-145, 1970.

KASHIDA, Y.; KATO, M. Characterization of Fluoroquinolone-Induced Achilles Tendon Toxicity in Rats: Comparison of Toxicities of 10 Fluoroquinolones and Effects of Anti-Inflammatory Compounds. **Antimicrob Agents Chemother**, Washington, v. 41, n. 11, p. 2389-2393, 1997.

KHALIQ, Y.; ZHANEL, G. G. Musculoskeletal injury associated with fluoroquinolone antibiotics. **Clin Plast Surg**, Philadelphia, v. 32, n. 4, p. 495-502, 2005.

KHALIQ, Y.; ZHANEL, G. G. Fluoroquinolone-associated tendinopathy: a critical review of the literature. **Clin Infect Dis**, Chicago, v. 36, n. 11, p. 1404-1410, 2003.

KING, D. E.; MALONE, R.; LILLEY, S. H. New classification and update on the quinolone antibiotics. **Am Fam Physician**, Kansas City, v. 61, n. 9, p. 2741-2748, 2000.

KOOB, T. J. Biomimetic approaches to tendon repair. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, New York, v. 133, n. 4, p. 1171-1192, 2002.

KOWATARI, K. *et al.* Levofloxacin-induced bilateral Achilles tendon rupture: a case report and review of the literature. **J Orthop Sci**, Tokyo, v. 9, n. 2, p. 186-190, 2004.

KURTZ, C. A. *et al.* Insulin-like growth factor I accelerates functional recovery from Achilles tendon injury in a rat model. **Am J Sports Med**, Baltimore, v. 27, n. 3, p. 363-369, 1999.

KUMAR, V. *et al.* **Robbins pathologic basis of disease**. 8th ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2010.

LEONE, R. *et al.* Adverse drug reactions related to the use of fluoroquinolone antimicrobials: an analysis of spontaneous reports and fluoroquinolone consumption data from three Italian regions. **Drug Saf**, Auckland, v. 26, n. 2, p. 109-120, 2003.

LEVAQUIN/levofloxacin: tablets. Raritan, NJ, USA. Ortho-McNeil-Janssen Pharmaceuticals, Inc. 2009. Prescribing information. Disponível em: <<http://www.levaquin.com/sites/default/files/pdf/levaquin.pdf#zoom=100>>. Acesso em: 03/01/2011.

LEWIS, J. R.; GUMS, J. G.; DICKENSHEETS, D. L. Levofloxacin-induced bilateral Achilles tendonitis. **Ann Pharmacother**, Cincinnati, v. 33, n. 7-8, p. 792-795, 1999.

LIN, T. W.; CARDENAS, L.; SOSLOWSKY, L. J. Biomechanics of tendon injury and repair. **J Biomech**, New York, v. 37, n. 6, p. 865-877, 2004.

LIN, J. H. *et al.* Temporal expression of nitric oxide synthase isoforms in healing Achilles tendon. **J Orthop Res**, Hoboken, v. 19, n. 1, p. 136-142, 2001a.

LIN, J. H. *et al.* The cell specific temporal expression of nitric oxide synthase isoforms during Achilles tendon healing. **Inflamm Res**, Basel-Switzerland, v. 50, n. 10, p. 515-522, 2001b.

LIU, H. H. Safety profile of the fluoroquinolones: focus on levofloxacin. **Drug Saf**, Auckland, v. 33, n. 5, p. 353-369, 2010.

MASS, D. P.; TUEL, R. J. Intrinsic healing of the laceration site in human superficialis flexor tendons in vitro. **J Hand Surg Am**, St Louis, v. 16, n. 1, p. 24-30, 1991.

MATHIS, A. S. *et al.* Levofloxacin-associated Achilles tendon rupture. **Ann Pharmacother**, Cincinnati, v. 37, n. 7-8, p. 1014-1017, 2003.

MAXWELL, A. The molecular basis of quinolone action. **J Antimicrob Chemother**, London, v. 30, n. 4, p. 409-414, 1992.

MURPHY, P. G. *et al.* Influence of exogenous growth factors on the synthesis and secretion of collagen types I and III by explants of normal and healing rabbit ligaments. **Biochem Cell Biol**, Ottawa, v. 72, n. 9-10, p. 403-409, 1994.

MURPHY, P. G.; HART, D. A. Influence of exogenous growth factors on the expression of plasminogen activators and plasminogen activator inhibitors by cells isolated from normal and healing rabbit ligaments. **J Orthop Res**, Hoboken, v. 12, n. 4, p. 564-575, 1994.

MURRELL, G. A. *et al.* Achilles tendon injuries: a comparison of surgical repair versus no repair in a rat model. **Foot Ankle**, Baltimore, v. 14, n. 7, p. 400-406, 1993.

MURRELL, G. A. *et al.* Addition of nitric oxide through nitric oxide-paracetamol enhances healing rat Achilles tendon. **Clin Orthop Relat Res**, New York, v. 466, n. 7, p. 1618-1624, 2008.

NABER, K. G.; ADAM, D. Classification of fluoroquinolones. **Int J Antimicrob Agents**, Amsterdam, v. 10, n. 4, p. 255-257, 1998.

O'DONOGHUE, D. H. *et al.* Repair of knee ligaments in dogs: I. The lateral collateral ligament. **J Bone Joint Surg Am**, Boston, v. 43, n. 8, p. 1167-1178, 1961.

PALMES, D. *et al.* Achilles tendon healing: long-term biomechanical effects of postoperative mobilization and immobilization in a new mouse model. **J Orthop Res**, Hoboken, v. 20, n. 5, p. 939-946, 2002.

PALÚ, G. *et al.* Quinolone binding to DNA is mediated by magnesium ions. **Proc Natl Acad Sci U S A**, Washington, v. 89, n. 20, p. 9671-9675, 1992.

PLATT, M. A. Tendon repair and healing. **Clin Podiatr Med Surg**, Philadelphia, v. 22, n. 4, p. 553-560, 2005.

SENDZIK, J. *et al.* Fluoroquinolones cause changes in extracellular matrix, signaling proteins, metalloproteinases and caspase-3 in cultured human tendon cells. **Toxicology**, Amsterdam, v. 212, n. 1, p. 24-36, 2005.

SENDZIK, J. *et al.* Synergistic effects of dexamethasone and quinolones on human-derived tendon cells. **Int J Antimicrob Agents**, Amsterdam, v. 35, n. 4, p. 366-374, 2010.

SENDZIK, J.; LODE, H.; STAHLMANN, R. Quinolone-induced arthropathy: an update focusing on new mechanistic and clinical data. **Int J Antimicrob Agents**, Amsterdam, v. 33, n. 3, p. 194-200, 2009.

SHAKIBAEI, M. *et al.* Ultrastructure of Achilles tendons of rats treated with ofloxacin and fed a normal or magnesium-deficient diet. **Antimicrob Agents Chemother**, Washington, v. 44, n. 2, p. 261-266, 2000.

SHARMA, P.; MAFFULLI, N. Tendon injury and tendinopathy: healing and repair. **J Bone Joint Surg Am**, Boston, v. 87, n. 1, p. 187-202, 2005a.

SHARMA, P.; MAFFULLI, N. Basic biology of tendon injury and healing. **Surgeon**, Edinburgh, v. 3, n. 5, p. 309-316, 2005b.

SHARMA, P.; MAFFULLI, N. Biology of tendon injury: healing, modeling and remodeling. **J Musculoskelet Neuronal Interact**, Kifissia, Greece, v. 6, n. 2, p. 181-190, 2006.

SILVA, M. J.; BOYER, M. I.; GELBERMAN, R. H. Recent progress in flexor tendon healing. **J Orthop Sci**, St Louis, v. 7, n. 4, p. 508-514, 2002.

SIMONIN, M. A. *et al.* Proteoglycan and collagen biochemical variations during fluoroquinolone-induced chondrotoxicity in mice. **Antimicrob Agents Chemother**, Washington, v. 43, n. 12, p. 2915-2921, 1999.



STAHLMANN, R. Clinical toxicological aspects of fluoroquinolones. **Toxicol Lett**, Amsterdam, v. 127, n. 1-3, p. 269-277, 2002.

STAHLMANN, R.; LODE, H. Safety considerations of fluoroquinolones in the elderly: an update. **Drugs Aging**, Auckland, v. 27, n. 3, p. 193-209, 2010.

STRICKLAND, J. W. Development of flexor tendon surgery: twenty-five years of progress. **J Hand Surg Am**, St Louis, v. 25, n. 2, p. 214-235, 2000.

VAN DER LINDEN, P. D. *et al.* Tendon disorders attributed to fluoroquinolones: a study on 42 spontaneous reports in the period 1988 to 1998. **Arthritis Rheum**, Atlanta, v. 45, n. 3, p. 235-239, 2001.

VAN DER LINDEN, P. D. *et al.* Increased risk of achilles tendon rupture with quinolone antibacterial use, especially in elderly patients taking oral corticosteroids. **Arch Intern Med**, Chicago, v. 163, n. 15, p. 1801-1807, 2003.

WALSH, S.; FRANK, C. Two methods of ligament injury: a morphological comparison in a rabbit model. **J Surg Res**, New York, v. 45, n. 2, p. 159-166, 1988.

WANG, J. H. Mechanobiology of tendon. **J Biomech**, New York, v. 39, n. 9, p. 1563-1582, 2006.

WINTERS, S. C. *et al.* The effects of multiple-strand suture methods on the strength and excursion of repaired intrasynovial flexor tendons: a biomechanical study in dogs. **J Hand Surg Am**, St Louis, v. 23, n. 1, p. 97-104, 1998.

YUAN, J. *et al.* Addition of nitric oxide via nitroflurbiprofen enhances the material properties of early healing of young rat Achilles tendons. **Inflamm Res**, Basel-Switzerland, v. 52, n. 6, p. 230-237, 2003.

ZHANG, F. *et al.* Effect of vascular endothelial growth factor on rat Achilles tendon healing. **Plast Reconstr Surg**, Baltimore, v. 112, n. 6, p. 1613-1619, 2003.

## DOCUMENTOS PESQUISADOS

NORMAS para apresentação de documentos científicos. Universidade Federal do Paraná, Sistema de Bibliotecas. 2. ed. Curitiba: UFPR, 2007. v. 2: Teses, dissertações, monografias e outros trabalhos acadêmicos.

NORMAS para apresentação de documentos científicos. Universidade Federal do Paraná, Sistema de Bibliotecas. 2. ed. Curitiba: UFPR, 2007. v. 4: Referências.

NORMAS para apresentação de documentos científicos. Universidade Federal do Paraná, Sistema de Bibliotecas. 2. ed. Curitiba: UFPR, 2007. v. 9: Redação e editoração.

DeCS-BVS: Descritores em Ciências da Saúde – Biblioteca Virtual em Saúde. Disponível em: <<http://www.decs.bvs.br>>. Último acesso em: 12/12/2010.

PUBMED: a service of the National Library of Medicine and the National Institutes of Health. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez/>>. Último acesso em: 12/12/2010.

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/>>. Último acesso em: 12/12/2010.

FDA: U.S. Food and Drug Administration. Disponível em: <<http://www.fda.gov/>>. Último acesso em: 05/01/2011.

**ANEXOS****ANEXO 1 – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

*Comitê de Ética em Pesquisa da Sociedade  
Evangélica Beneficente de Curitiba*

*Rua Padre Anchieta, 2770*

*80730-000 Curitiba – PR*

*Fone: 41 3240-5570*

*Fax: 41 3240-5584*

---

Curitiba, 29 de setembro de 2010.

**Adriano Zahdi Cavassim**  
**Antônio Carlos Ligocki Campos**

Prezados Colegas,

Comunicamos a V. Sa. que, em reunião ordinária do dia 28 de setembro de 2010, foi aprovado o projeto de pesquisa intitulado **“Análise tensiométrica e da deposição de colágeno dos tendões de Aquiles suturados de ratos submetidos à terapêutica com levofloxacina”**. Protocolado neste comitê sob o número **8347/10** em 13 de setembro de 2010.

Prevê a legislação que toda a documentação do projeto poderá, a qualquer momento, ser solicitada para inspeção por parte dos órgãos federais; desta forma, manterá o Comitê arquivo detalhado de cada projeto, arquivando em pasta individual o projeto inicial e relatórios de acompanhamento.

Para o projeto de V. Sa., solicitamos que dê ciência aos seus colaboradores da obrigação de, a cada seis meses a partir da data de hoje, encaminhar a este comitê relatório detalhado do andamento do projeto.

**Relatórios previstos para: 20/03/2011**

Atenciosamente,



**Carmen A. Paredes Marcondes Ribas**  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa da  
Sociedade Evangélica Beneficente de Curitiba

**ANEXO 2 – PESO DOS ANIMAIS DO GRUPO LEVOFLOXACINA DE 7 DIAS (L7)**

<b>Animal</b>	<b>Peso pré-op (g)</b>	<b>Peso pós-op (g)</b>	<b>Eutanásia (g)</b>
L7 – R1	281	294,12	292,89
L7 – R2	278,2	280,05	276,34
L7 – R3	276,07	284,47	291,74
L7 – R4	288,62	307,51	311,73
L7 – R5	275,92	295,7	296,74
L7 – R6	237,12	243,69	246,18
L7 – R7	265,63	275,46	285,13
L7 – R8	273,08	272,9	285,78
L7 – R9	259,04	276,3	279,18
L7 – R10	240	246	253,71
L7 – R11	255,02	255,69	273,39
L7 – R12	245,9	240,26	253,93
L7 – R13	284,6	308	307,42
L7 – R14	267,01	268,56	275,01
L7 – R15	285,01	267,34	280,05
L7 – R16	242,5	253,59	258,8

**ANEXO 3 – PESO DOS ANIMAIS DO GRUPO CONTROLE DE 7 DIAS (C7)**

<b>Animal</b>	<b>Peso pré-op (g)</b>	<b>Peso pós-op (g)</b>	<b>Eutanásia (g)</b>
<b>C7 – R1</b>	239,64	251,56	268,96
<b>C7 – R2</b>	254,61	260,15	282,96
<b>C7 – R3</b>	245,61	246,26	249,45
<b>C7 – R4</b>	268,09	260,34	284,25
<b>C7 – R5</b>	254,52	254,45	260,56
<b>C7 – R6</b>	257,69	267,72	244,34
<b>C7 – R7</b>	263,59	265,8	269,72
<b>C7 – R8</b>	346,75	370,81	328,44
<b>C7 – R9</b>	317,39	328,16	316,92
<b>C7 - R10</b>	271,15	269,47	271,15
<b>C7 - R11</b>	314,2	327,66	325,41
<b>C7 - R12</b>	306,56	320,36	313,35
<b>C7 - R13</b>	237,5	266,26	236,57
<b>C7 - R14</b>	278,39	278,78	288,04
<b>C7 – R15</b>	297,11	302,85	293,66

**ANEXO 4 – PESO DOS ANIMAIS DO GRUPO LEVOFLOXACINA DE 14 DIAS (L14)**

<b>Animal</b>	<b>Peso pré-op (g)</b>	<b>Peso pós-op (g)</b>	<b>Eutanásia (g)</b>
L14 – R1	276,9	271,28	298,2
L14 – R2	283,44	277,63	317,44
L14 – R3	296,82	286,78	320,46
L14 – R4	285,4	282,1	323,28
L14 – R5	295,1	289,15	338,79
L14 – R6	287,35	289,66	324,81
L14 – R7	265,13	276,7	327,76
L14 – R8	259,77	260,8	321,82
L14 – R9	236,08	255	297,34
L14 – R10	247,2	243,8	305,05
L14 – R11	257,22	268	304,35
L14 – R12	286,32	283,2	290,84
L14 – R13	284,81	284,9	283,48
L14 – R14	282,22	269,56	319,92
L14 – R15	294,48	292,8	334,43

**ANEXO 5 – PESO DOS ANIMAIS DO GRUPO CONTROLE DE 14 DIAS (C14)**

<b>Animal</b>	<b>Peso pré-op (g)</b>	<b>Peso pós-op (g)</b>	<b>Eutanásia (g)</b>
C14 – R1	275,86	284	334,97
C14 – R2	248,05	248,8	284,84
C14 – R3	240,56	254,36	281,89
C14 – R4	243,98	254	283,76
C14 – R5	240,35	242	276,52
C14 – R6	232,51	244,2	283,43
C14 – R7	261,56	274,11	302,87
C14 – R8	230,56	243,25	275,84
C14 – R9	319,7	345,91	382,63
C14 – R10	320,71	317,02	336,16
C14 – R11	280,05	278,09	324,36
C14 – R12	286,35	295,78	320,7
C14 – R13	280,91	278,17	314,95
C14 – R14	251,26	271,6	304,82
C14 – R15	273,65	276,81	301,23
C14 – R16	272,11	284,49	329,23

**ANEXO 6 – VALORES DA TENSÃO E FORÇA MÁXIMA GRUPO L7**

<b>Animal</b>	<b>Tensão máxima (kgf/cm<sup>2</sup>)</b>	<b>Força máxima (kgf)</b>
L7 – R1	4,7441	0,93
L7 – R2	5,5895	1,1
L7 – R3	4,5385	0,89
L7 – R4	6,667	1,31
L7 – R5	5,5091	1,08
L7 – R6	3,9289	0,77
L7 – R7	5,181	1,02
L7 – R8	8,1201	1,59
L7 – R9	4,5586	0,9
L7 – R10	6,3718	1,25
L7 – R11	5,2477	1,03
L7 – R12	4,9424	0,97
L7 – R13	2,463	0,48
L7 – R14	3,4363	0,67
L7 – R15	6,4193	1,26
L7 – R16	11,6707	2,29



**ANEXO 7 – VALORES DA TENSÃO E FORÇA MÁXIMA GRUPO C7**

<b>Animal</b>	<b>Tensão máxima (kgf/cm<sup>2</sup>)</b>	<b>Força máxima (kgf)</b>
C7 – R1	4,4727	0,88
C7 – R2	11,4778	2,25
C7 – R3	3,2295	0,63
C7 – R4	4,1821	0,82
C7 – R5	7,389	1,45
C7 – R6	6,1534	1,21
C7 – R7	6,0017	1,18
C7 – R8	3,1548	0,62
C7 – R9	8,4007	1,65
C7 – R10	4,0898	0,8
C7 – R11	6,4641	1,27
C7 – R12	2,1587	0,42
C7 – R13	5,8399	1,15
C7 – R14	3,4281	0,67
C7 – R15	2,771	0,54

**ANEXO 8 – VALORES DA TENSÃO E FORÇA MÁXIMA GRUPO L14**

<b>Animal</b>	<b>Tensão máxima (kgf/cm<sup>2</sup>)</b>	<b>Força máxima (kgf)</b>
L14 - R1	7,59	1,49
L14 - R2	6,11	1,2
L14 - R3	7,6568	2,58
L14 - R4	22,8533	4,49
L14 - R5	0,7037	0,35
L14 - R6	13,0635	2,57
L14 - R7	3,96	0,78
L14 - R8	22,9328	4,5
L14 - R9	9,8684	3,9
L14 - R10	11,873	2,71
L14 - R11	14,8721	2,92
L14 - R12	5,7979	2,13
L14 - R13	7,293	2,33
L14 - R14	8,727	1,71
L14 - R15	7,5791	1,49

**ANEXO 9 – VALORES DA TENSÃO E FORÇA MÁXIMA GRUPO C14**

<b>Animal</b>	<b>Tensão máxima (kgf/cm<sup>2</sup>)</b>	<b>Força máxima (kgf)</b>
C14 – R1	7,2172	1,42
C14 – R2	10,33	2,61
C14 – R3	6,89	1,07
C14 – R4	8,3861	1,65
C14 – R5	6,2055	1,22
C14 – R6	4,76	0,93
C14 – R7	5,4376	0,94
C14 – R8	6,412	0,69
C14 – R9	4,056	0,88
C14 – R10	6,4952	1,28
C14 – R11	3,8567	0,76
C14 – R12	5,9861	1,05
C14 – R13	1,2278	0,24
C14 – R14	4,956	0,92
C14 – R15	7,102	1,23
C14 – R16	3,716	0,73

**ANEXO 10 – VALORES DA DISTRIBUIÇÃO DO COLÁGENO GRUPO L7**

<b>Animal</b>	<b>Maduro (%)</b>	<b>Imaturo (%)</b>
L7 – R1	14,02	85,97
L7 – R2	1,75	98,24
L7 – R3	0	100
L7 – R4	1,35	98,64
L7 – R5	16,04	83,95
L7 – R6	3,57	96,42
L7 – R7	3,09	96,9
L7 – R8	36,78	63,21
L7 – R9	7,9	92,09
L7 – R10	1,2	98,79
L7 – R11	0	100
L7 – R12	0,11	99,88
L7 – R13	5,49	94,5
L7 – R14	2,93	97,06
L7 – R15	38,33	61,66
L7 – R16	21,44	78,75

**ANEXO 11 – VALORES DA DISTRIBUIÇÃO DO COLÁGENO GRUPO C7**

<b>Animal</b>	<b>Maduro (%)</b>	<b>Imaturo (%)</b>
<b>C7 – R1</b>	35,75	64,24
<b>C7 – R2</b>	68,91	31,09
<b>C7 – R3</b>	0,12	99,87
<b>C7 – R4</b>	20,18	79,81
<b>C7 – R5</b>	3,54	96,45
<b>C7 – R6</b>	18,41	81,58
<b>C7 – R7</b>	19,58	80,41
<b>C7 – R8</b>	18,81	81,18
<b>C7 – R9</b>	0,63	99,36
<b>C7 – R10</b>	4,9	95,09
<b>C7 – R11</b>	4,4	95,59
<b>C7 – R12</b>	7,76	92,23
<b>C7 – R13</b>	22,53	77,46
<b>C7 – R14</b>	25,54	74,46
<b>C7 – R15</b>	27,66	72,33

**ANEXO 12 – VALORES DA DISTRIBUIÇÃO DO COLÁGENO GRUPO L14**

<b>Animal</b>	<b>Maduro (%)</b>	<b>Imaturo (%)</b>
L14 – R1	1,95	98,04
L14 – R2	14,17	85,82
L14 – R3	8,69	91,3
L14 – R4	59,44	40,55
L14 – R5	24,1	75,89
L14 – R6	32,05	67,94
L14 – R7	8,12	91,87
L14 – R8	64,16	35,83
L14 – R9	43,79	56,2
L14 – R10	42,31	57,68
L14 – R11	37,1	62,89
L14 – R12	6,16	93,83
L14 – R13	46,47	53,52
L14 – R14	24,87	75,12
L14 – R15	23,3	76,69

**ANEXO 13 – VALORES DA DISTRIBUIÇÃO DO COLÁGENO GRUPO C14**

<b>Animal</b>	<b>Maduro (%)</b>	<b>Imaturo (%)</b>
C14 – R1	8,21	91,78
C14 – R2	71,83	28,16
C14 – R3	8,1	91,89
C14 – R4	60,76	39,23
C14 – R5	0	100
C14 – R6	26,04	73,95
C14 – R7	63,11	36,89
C14 – R8	28,37	71,62
C14 – R9	11,19	88,8
C14 – R10	23,46	76,53
C14 – R11	7,86	92,13
C14 – R12	17,93	82,06
C14 – R13	27,94	72,05
C14 – R14	33,28	66,71
C14 – R15	18,37	81,62
C14 – R16	38,22	61,77