



JOSÉ SANDRO PEREIRA DA SILVA

AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA DO EFEITO DO ULTRASOM
PULSADO NAS FALHAS ÓSSEAS PROVOCADAS EM FÊMURES DE
RATO: ESTUDO EXPERIMENTAL .

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

São Paulo

2001

JOSÉ SANDRO PEREIRA DA SILVA

AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉT RICA DO EFEITO DO ULTRASOM
PULSADO NAS FALHAS ÓSSEAS PROVOCADAS EM FÊMURES DE
RATO: ESTUDO EXPERIMENTAL .

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Àrea de Concentração: Fisiopatologia Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Alberto Tesconi Croci.

São Paulo

2001

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Sebastião e Irene, que sempre me apoiaram com amor e dedicação, sem os quais não seria possível nenhuma realização.

AGRADECIMENTOS

Agradeço sinceramente ao meu orientador, o Prof Dr. Alberto Tesconi Croci, por reservar parte do seu precioso tempo para me ensinar os princípios de metodologia científica e elucidar minhas dúvidas durante todo o trabalho.

À Dra. Vanda Jorgetti pela paciência em ensinar as bases da histomorfometria, como trabalhar em um laboratório e estimular o aprendizado mesmo quando em situações adversas. Não me esquecerei do tempo que passei no LIM 16, lendo todas aquelas lâminas.

Ao Dr. Araldo Ayres Monteiro Jr, pela oportunidade que me deu de ingressar na pós-graduação e pela orientação paternal durante os 5 anos que passei no Hospital das Clínicas sob sua supervisão.

Ao Dr. Jan Peter Ilg, pela amizade e carinho com que me ensinou os fundamentos e técnicas da cirurgia Buco-Maxilo-Facial. Um verdadeiro mestre que não se limitou a ensinar o óbvio.

Ao Dr. Haroldo de Cássia Calonge, mentor intelectual, cirurgião de habilidade inquestionável e cultura irrestrita. Grande incentivador da busca pelo conhecimento, mesmo sabendo da dificuldade em superar obstáculos.

Aos meus amigos André Caroli e Gustavo Grothe (Gusta) companheiros de uma longa e inesquecível jornada. A minha amizade e apreço por vocês será eterna. Os bons tempos jamais serão esquecidos.

Aos Drs. Enio Campos Amico e Sandro Campo Amico pelo apoio durante minha estada no HC e ajuda durante a elaboração desse trabalho. De vocês nem preciso falar mais nada. Por ser família, permito-me resumir os agradecimentos.

A minha tia Dulcimar que me apoiou durante toda a minha formação e sem da qual a ajuda, não conseguiria chegar onde estou hoje.

Ao Dr. José Ivo Queiroz do Amaral, meu primeiro professor de Traumatologia facial, tenaz e estimulador, hoje companheiro de trabalho e chefe na disciplina de Traumatologia Buco-Maxilo-Facial da faculdade de Odontologia Da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

A todos os assistentes do serviço de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial do IOT/HCFMUSP, (Dr. Luis Marchetti, Dra. Paula, Dr. Joely Gerva, Dr. Sebastião Pasquini, Dr. Gilberto Job, Dr. Paulo de Tarso, Dr. Gabriel Amato). Tenham certeza de que foi uma honra tê-los como professores. Seus ensinamentos foram fundamentais para meu crescimento pessoal.

Aos amigos Thércia, Giba, Genelice, Ana, Adriana, Catarina pela paciência que tiveram comigo e pelos bons momentos que compartilhamos.

A todo o pessoal do laboratório de biomecânica do IOT, César, Dr. Raul Bolliger, Dr. Tomás Leivas, Aline, Alex. A ajuda de vocês foi fundamental para a conclusão desse trabalho.

Ao Dr. Natalino Leopizzi, médico veterinário brilhante, pelo suporte nos experimentos animais e opiniões valiosas ao trabalho.

Enfim, gostaria de agradecer ao corpo clínico e funcionários do Hospital das Clínicas da Faculdade de medicina da Universidade de São Paulo pelo meu

treinamento e pelo tempo que aqui passei. Uma ilha de excelência, de onde nenhuma pessoa sai sem a certeza de estar preparado para enfrentar os desafios da vida.

SUMÁRIO

LISTAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1 Ultrassom.....	4
2.2 Parâmetros físicos que fundamentam a onda.....	5
2.3 Efeitos biológicos do ultrassom.....	8
2.3.1 Efeitos térmicos.....	8
2.3.2 Efeitos não térmicos.....	9
2.4 Histomorfometria	10
2.5 Estimulação ultra-sônica.....	15
3. OBJETIVOS	32
4. MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 Materiais.....	33
4.2 Métodos.....	33
4.2.1 Protocolo anestésico.....	33
4.2.2 Técnica cirúrgica.....	34
4.2.3 Administração do marcador ósseo	35
4.2.4 Protocolo de estimulação ultra-sônica	35
4.2.5 Protocolo de eutanásia	36
4.2.6 Preparo das peças	37
4.2.7 Avaliação histomorfométrica.....	38
4.2.8 Análise estatística.....	41
5. RESULTADOS.....	42
6. DISCUSSÃO	49
7. CONCLUSÕES	62
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

US – Ultra-som

C/s – ciclo por segundo

Hz – Hertz

1Hz - 1 c/s

1 KHz – 1.000 c/s

1 MHz – 1.000.000 c/ s

W/cm² – Watts por centímetro quadrado.

Kgf/mm – Kilograma força por milímetro

mm² – milímetro quadrado

BMP – Bone morphogenetic protein (proteína óssea morfogenética)

DNA – Ácido dextrorribonucleico

RNA – Ácido ribonucleico

RNA_m – Ácido ribonucleico mensageiro

IL- Interleucina

IGF-β - Fator de crescimento semelhante a insulina

TGF-α - Fator de necrose tumoral α

c-fos – proteína presente no código genético celular

LISTA DE TABELAS

TABELA 01- Valores médios das corticais ósseas dos fêmures direito e esquerdo em micras.....	42
TABELA 02- Taxa de aposição mineral dada pela marcação por tetraciclina.....	43
TABELA 03- Peso inicial e final dos animais distribuídos de acordo com o tempo de estimulação	43
TABELA 04- Volume ósseo total, mineralizado ou não, expresso em Percentagem.....	44
TABELA 05- Volume ósseo trabecular constituído por osso não mineralizado.....	44
TABELA 06- Superfície trabecular recoberta por matriz osteóide	45
TABELA 07- Superfície trabecular que apresenta osteoblastos.....	45
TABELA 08- Superfície trabecular que apresenta lacunas de reabsorção, com ou sem osteoclastos	46
TABELA 09- Superfície trabecular que apresenta osteoclastos.....	46
TABELA 10- Espessura das trabéculas ósseas.....	47
TABELA 11- Espessura do rebordo da matriz osteóide depositada nas trabéculas ósseas.....	47
TABELA 12- Separação entre as trabéculas ósseas	48
TABELA 13- Número de trabéculas ósseas	48

RESUMO

SILVA, J. S. P. Avaliação histomorfométrica do efeito do ultrassom pulsado nas falhas ósseas provocadas em fêmures de rato: estudo experimental . São Paulo, 2000. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

A utilização do ultra-som pulsado de baixa intensidade tem sido preconizada como um método eficiente para o tratamento de retardo de consolidação de fraturas, pseudoartroses e aceleração do processo de reparo ósseo. Vários estudos em modelos animais e clínicos evidenciam os benefícios desse tipo de tratamento. Neste estudo avaliamos o efeito do ultra-som pulsado de baixa intensidade em falhas ósseas de fêmures de rato, através de análise histomorfométrica e taxa de aposição mineral. Foram utilizados 18 animais divididos em três grupos de acordo com o período de estimulação em uma, duas e três semanas. Observamos que o ultra-som foi capaz de alterar os parâmetros histomorfométricos de formação, mas principalmente a espessura das trabéculas ósseas associado ao aumento na deposição de osteóide na superfície das travessuras ósseas. O efeito do ultra-som pulsado foi mais evidente na primeira semana de aplicação.

SUMMARY

SILVA, J. S. P. Histomorphometric evaluation of pulsed ultrasound in rat femur bone defects: experimental study . São Paulo, 2000. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

The use of low-intensity pulsed ultrasound has been proposed as a suitable method to treat pseudoarthrosis, enhancement of bone healing process and delayed union of bone fractures. Reviewed literature related to animal and clinical studies have shown the benefits of this kind of treatment. The present study evaluates the effect of low-intensity pulsed ultrasound on a rat femur bone defect by histomorphometric analysis and mineral appositional rate. Eighteen animals were studied, being divided into 3 groups, one, two and three weeks of ultrasound treatment. The results showed that the ultrasound was able to alter the histomorphometric parameters of bone growth, especially the thickness of bone trabeculae as a result of the increase in the osteoid deposition on the surface of the trabecular bone. The effects of the pulsed ultrasound was most pronounced in the first week of treatment.

1. INTRODUÇÃO

O preenchimento de defeitos ósseos locais, é um problema clínico relevante em cirurgia buco-maxilo-facial e cirurgia ortopédica secundárias a traumas, ressecções tumorais e infecções. Apesar de o tecido ósseo autógeno continuar sendo a melhor opção para a reconstrução de falhas ósseas, vários substitutos ósseos têm sido propostos com a finalidade de se evitar a morbidade do sítio doador, em geral o osso ilíaco, suprir a quantidade nem sempre suficiente de enxerto, reduzir o tempo cirúrgico diminuindo os riscos de complicações e melhorando a qualidade do pós-operatório para o paciente.

A matriz orgânica do osso tem se mostrado uma boa opção como enxerto ósseo, entretanto problemas relacionados a respostas imunológicas imprevisíveis, reabsorção precoce, dificuldade de obtenção e processamento e o risco de transmissão de agentes infecciosos limitam sua utilização (MULLIKEN et al., 1981; HOLLINGER, et al., 1990; RAGNI e LINDHOLM, 1991; SPECTOR, 1994).

Para obter aceitação clínica, os materiais substitutos do osso autógeno devem ser biocompatíveis, apresentar propriedades mecânicas adequadas e capacidade pelo menos osteocondutora. O desenvolvimento de biomateriais com essas características tem sido exaustivamente estudado durante as últimas décadas, particularmente na produção de cerâmicas de fosfato de cálcio tais como a hidroxiapatita, sulfato de cálcio, tricálcio fosfato e silicato de vidro (SCHEPERS et al., 1993; SPECTOR, 1994; HOTZ e HERR, 1994)

URIST (1965), observou que células primitivas indiferenciadas podem se transformar, dando origem a osteoblastos sob a influência de substâncias osteoindutoras. A proteína óssea morfogenética (BMP- bone morphogenetic protein) apresenta tal característica mas torna-se ineficaz em provocar essa resposta sem um carreador, pois difunde-se muito rapidamente em sítios heterotópicos antes que possa ocorrer a osteoindução.

DUARTE (1983) apresenta uma outra possibilidade para se conseguir osteoindução através da aplicação de ultrassom de alta frequência e pulsátil, utilizando como modelo experimental uma osteotomia da fíbula de coelho. Demonstram que a aplicação de ondas ultrasônicas de baixa intensidade, pulsadas, gera uma resposta elétrica no osso que regula as fases de formação e divisão celular (formação-remodelação-reabsorção) e de deposição de cristais de hidroxiapatita (mineralização).

Entretanto, este método ainda não está completamente esclarecido quanto a sensibilidade dos tecidos ao ultrassom, frequência de pulso, número de aplicações e tempo de tratamento.

Alguns estudos sugerem que os efeitos do ultrassom pulsado de baixa intensidade sobre o tecido ósseo são a aceleração do processo de mineralização, aumento da rigidez óssea, maior formação osteoblástica e conseqüente aceleração do processo de reparo (SANTOS JUNIOR e MELHADO, 1990; GUERINO et al., 1997).

Baseado nesses fatos, o objetivo do nosso trabalho é o de avaliar, pela histomorfometria, o efeito do ultra-som pulsado em defeitos ósseos provocados em

fêmures de rato sob condições controladas, tendo em vista a velocidade de reparo e a característica do osso neoformado.

As normas de apresentação das citações bibliográficas e estrutura geral deste plano de pesquisa obedecem aos padrões descritos por CUNHA (1991) publicado pelo Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguiram as normas vigentes no “List of Journals Indexed in the Index Medicus”, publicado pela National Library of Medicine, 1996.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ULTRASOM.

O ultrassom é uma forma de movimento de onda mecânica similar ao som audível, exceto pela sua frequência mais alta. Por definição, o ultrassom tem frequência maior que 16 KHz, estando acima dos limites audíveis para humanos (ter HAAR, G. , 1987). As ondas ultra-sônicas possuem frequências que variam em torno de 20.000 e 20.000.000 de ciclos por segundo (1 ciclo/segundo = 1 Hertz). O ouvido humano capta frequências da ordem de 20 a 20.000 Hz, portanto as ondas ultrasônicas são imperceptíveis ao ouvido humano (FURINI JR. ; LONGO, 1996) Uma onda mecânica é aquela na qual a energia é transmitida por vibrações das moléculas de um meio onde o ultrassom é aplicado, seja esse meio sólido, líquido ou gasoso (ter HAAR, G. , 1987).

A geração de uma onda ultra-sônica de alta frequência (0.75 MHz a 3 MHz) é feita a partir de transdutores piezoelétricos. Estes consistem de um disco ou cilindro de um material natural, como o quartzo, ou de um material sintético, como as cerâmicas feitas de uma mistura de chumbo, zircônio e titânio (PZT) que podem ser polarizados durante sua ativação (WILLIAMS, 1997). Atualmente, os cristais cerâmicos sintéticos compostos por chumbo, zircônio e titânio são utilizados pela sua durabilidade e eficiência em converter corrente elétrica em vibrações mecânicas. Uma vez que o cristal recebe corrente elétrica, esta deforma-o produzindo ondas por compressão e descompressão.

LANGEVIN, 1917 apud (FURINI JR. ; LONGO, 1996) produziu uma onda ultra-sônica através de um cristal de quartzo vibrante submetido a corrente elétrica de alta frequência. Este trabalho é tido como pioneiro na geração de ondas ultra-sônicas.

As ondas ultra-sônicas podem se apresentar de diversas formas. A mais comum é a longitudinal, onde a oscilação da partícula ocorre na mesma direção de propagação da onda. Ocorre em sólidos, líquidos e em gases. Nas ondas transversais, a oscilação das partículas é perpendicular à propagação da onda e ocorre somente em líquidos. Quando ondas ultra-sônicas viajando através dos tecidos são refletidas por uma interface entre meios com impedâncias acústicas diferentes, existe a formação de ondas estacionárias nas quais há superposição entre a onda incidente e a onda refletida de tal modo que seus picos de intensidade se somem (FURINI JR. ; LONGO, 1996)

As ondas ultra-sônicas podem ser ainda consideradas contínuas quando não há interrupção no sinal elétrico gerador da onda, ou pulsadas quando há interrupção no sinal gerador (FURINI JR. ; LONGO, 1996).

2.2 PARÂMETROS FÍSICOS QUE FUNDAMENTAM A ONDA

Comprimento de onda (ρ) – A menor distância entre dois pontos nos quais as partículas se encontram em um mesmo estado de movimento.

Amplitude (A) – O deslocamento máximo de uma partícula a partir de sua posição de equilíbrio.

Período (T) – O tempo para que uma partícula realize um ciclo completo de movimento.

Frequência (f) – O número de vezes que uma partícula realiza um ciclo oscilatório por unidade de tempo. É expressa em Hertz (Hz).

Velocidade de onda (c) – A velocidade com que a perturbação move-se ao longo do meio. É expressa em metros por segundo (m/s)

Potência (P) – A energia total do feixe, medida em watts, ou seja, a energia (E) num intervalo de tempo (t).

Intensidade acústica (I) – A energia (E) que atravessa uma área (S) em um intervalo de tempo (t). É dada em Watts por centímetro quadrado (W/cm^2)

Atenuação – A redução da intensidade de uma onda ultra-sônica, à medida em que a distância da fonte sonora aumenta. Essa atenuação é causada por absorção e dispersão da onda pelo meio.

Impedância acústica (Z) – Indica a propriedade que as ondas têm de se deslocarem mais facilmente em alguns meios que em outros. Pode ser descrita pela equação:

$$Z = \rho \cdot c$$

onde Z = impedância acústica.

ρ = densidade do meio em Kg/m^3

c = velocidade de propagação do meio em m/s.

As ondas ultra-sônicas adquirem um comportamento específico, à medida que se propagam através dos tecidos. Estas podem sofrer atenuação, absorção, reflexão, refração e transmissão (FURINI JR. ; LONGO, 1996).

Atenuação – A diminuição da intensidade e da amplitude que ocorre à medida que as ondas de US se propagam através de um meio heterogêneo. As perdas de energia ocorrem por absorção (conversão direta em calor), reflexão e refração no

meio. A onda ultra-sônica tem sua intensidade original reduzida pela metade a determinada distância ($D/2$). O valor de $D/2$ depende da natureza do meio e da frequência das ondas. Ondas de alta frequência são absorvidas mais rapidamente e possuem menor $D/2$ do que frequências baixas. Portanto, quanto mais alta for a frequência, menor será o comprimento da onda e maior será sua absorção.

Absorção – É o fenômeno que ocorre a nível molecular, quando a energia vibracional é transformada em calor pelo atrito viscoso entre as partículas do meio. O resultado é um aquecimento do tecido onde a onda se propaga.

Reflexão – Ocorre quando o US atravessa uma interface de um meio para outro e esses meios apresentam impedâncias diferentes. Parte dessa onda será refletida e não atravessará para o segundo meio. A energia refletida é sempre menor que a energia incidente. Quanto maior a diferença das impedâncias acústicas dos meios (tecidos), maior será a quantidade de energia ultra-sônica refletida.

Refração – A refração ocorre por um desvio da onda de som nas várias interfaces dos tecidos. Quando a onda incidente atravessa a interface de um tecido para outro com impedância acústica diferente, esta sofre um desvio angular na propagação, penetrando no segundo meio com ângulo de propagação diferente do incidente.

2.3 EFEITOS BIOLÓGICOS DO ULTRA-SOM.

DYSON (1987) classificou em térmicos e não térmicos, os mecanismos físicos do US que induzem repostas clinicamente significativas sobre as células, tecidos, órgãos e organismos.

2.3.1 Efeitos térmicos:

A onda ultra-sônica pode causar aumento da temperatura dos tecidos por onde passa, a uma profundidade de cinco centímetros ou mais. A quantidade de calor depende da intensidade e da frequência do US, do tempo de exposição e do tipo de tecido exposto à irradiação.

A absorção da energia ultra-sônica e a subsequente elevação da temperatura no tecido, dependem da frequência. As frequências mais altas (3MHz) aumentam a atenuação em estruturas mais superficiais do que frequências mais baixas (1 MHz).

Os tecidos com alto conteúdo de colágeno em suas estruturas absorvem uma grande quantidade de energia ultra-sônica, sendo portanto mais atingidos pelos efeitos da referida onda.

As respostas fisiológicas atribuídas aos mecanismos térmicos incluem o aumento da extensibilidade do tecido colágeno, as alterações no fluxo sanguíneo, as mudanças na velocidade de condução nervosa, o aumento do limiar da dor, o aumento na atividade enzimática e a mudanças na atividade contrátil do músculo. Com o aumento da temperatura nos tecidos, pode-se esperar também uma resposta inflamatória. Para que esses efeitos ocorram, é necessário manter a temperatura dos tecidos em torno de 40⁰ a 45⁰ C.

2.3.2 Mecanismos não térmicos:

O ultrassom pode causar outros efeitos não relacionados a aumentos de temperatura. Esses efeitos não térmicos incluem a cavitação e o microfluxo acústico.

Cavitação

A cavitação corresponde à formação de bolhas gasosas provocadas pelo feixe ultra-sônico. As mudanças de pressão local produzidas pelo US, causam expansão e compressão em pequenas bolhas gasosas que podem estar presentes no sangue ou em fluidos teciduais. O campo ultra-sônico pode causar mudanças na atividade celular e lesões nos tecidos. Quando a movimentação no volume das bolhas não é muito intenso, tem-se uma cavitação estável, que pode provocar alteração na permeabilidade da membrana celular, alterando sua função. Quando a expansão sofrida pelas bolhas for muito intensa, elas podem colapsar resultando na destruição do tecido, alterações químicas e lise celular. Esta é a cavitação instável ou transitória.

Microfluxo Acústico

Refere-se ao movimento de fluidos ao longo da fronteira das membranas celulares, como um resultado da pressão mecânica da onda. Esse microfluxo pode provocar alterações na membrana celular, favorecendo a difusão de íons e com isso alterando a atividade celular.

2.4 HISTOMORFOMETRIA

A histomorfometria óssea descreve quantitativamente a estrutura e o processo de remodelação do tecido ósseo. Esse método permite uma avaliação mais precisa do estado da patologia óssea e sua resposta a um determinado tipo de tratamento do que o método de avaliação qualitativa pela histologia óssea (COMPSTON, 1997).

Os estudos desenvolvidos por FROST estabeleceram as bases da histomorfometria óssea e a compreensão dos mecanismos envolvidos na remodelação óssea normal e nas doenças metabólicas (ERICKSEN, 1994).

A histomorfometria utiliza princípios da estereologia, que estuda estruturas tridimensionais a partir de amostras bidimensionais. O geologista francês DELESSE em 1847, apud REIS (1998), estudando rochas, determinou que em secções infinitamente finas, a fração de área era igual à fração de volume. Assim o importante seria a espessura da secção, ou seja, quanto menor a espessura do corte, menor a probabilidade de erro. A análise estereológica exige certas condições, de modo que, as estruturas estudadas devem ser isotrópicas, o que significa que sua distribuição e orientação no espaço são uniformes. Esse não é o caso do tecido ósseo, cuja principal característica é possuir estrutura espacial anisotrópica (traves ósseas distribuídas em diferentes orientações). BADDELY, apud COMPSTON (1997) utilizando cortes verticais de tecido ósseo e um sistema de amostragem ao acaso, demonstrou que os procedimentos estereológicos poderiam ser aplicados na análise de estruturas anisotrópicas como o osso trabecular.

A histomorfometria analisa os componentes da morfologia óssea tais como: medidas de volume, área, perímetro etc. As principais técnicas empregadas na leitura histomorfométrica são:

- a) A técnica manual que utiliza retículos de pontos e linhas acoplados à ocular do microscópio e cuja projeção sobre a estrutura histológica permite medir distâncias, espessuras, intersecções, etc. O volume ósseo é obtido pela técnica de contagem de pontos. As medidas de superfície são determinadas pela contagem de intersecções entre as linhas e a estrutura estudada. A grande desvantagem dessa técnica é o enorme tempo consumido na leitura de uma única lâmina (um indivíduo treinado pode gastar até duas horas por lâmina).
- b) O método semi-automático utiliza microscópio conectado a um computador e a uma câmera clara ou câmera de vídeo.

As imagens histológicas são desenhadas com auxílio de um cursor sobre placa digitalizadora. A análise quantitativa das estruturas observadas depende do tipo de programa de computador empregado, o qual pode permitir também o estudo da microarquitetura do tecido ósseo. Tal técnica é precisa, reprodutível, reduz o tempo gasto na leitura histológica, além de possibilitar ao operador eliminação de artefatos histológicos.

- c) O método automático emprega computadores, câmeras de vídeo que analisam e guardam imagens. Esse método baseia-se na projeção da imagem histológica na tela do computador onde diferentes componentes estruturais são quantificados de acordo com os diferentes níveis de coloração. De todos é o que requer menos tempo de execução, porém é também o menos sensível no reconhecimento de artefatos histológicos. (ERICKSEN, 1994; COMPSTON, 1997).

Os parâmetros histomorfométricos são conhecidos como primários ou estáticos e derivados. Os parâmetros primários, informam sobre área, perímetro ou extensão, distância e número. Os parâmetros derivados são subdivididos em estruturais e

cinéticos. Os estruturais analisam a estrutura óssea e os cinéticos avaliam a formação e a mineralização óssea.(PARFITT, 1987).

PARFITT et al. (1987) descreveram uma normatização para os parâmetros histomorfométricos, definidos como primários e derivados. Os parâmetros primários ou estáticos informam sobre área ou extensão, distância e número. Os parâmetros derivados são subdivididos em estruturais e cinéticos. Os estruturais analisam a estrutura óssea, e os cinéticos, a dinâmica óssea. Os parâmetros derivados e alguns primários nos fornecem informações sobre a conectividade óssea e os cinéticos avaliam a formação e a mineralização óssea.

Definição dos parâmetros histomorfométricos:

I - Estáticos:

- Volume Ósseo (BV/TV %): percentual do volume ósseo total (medula e trabécula) constituído por osso trabecular, mineralizado ou não.
- Volume Osteóide (OV/BV %): percentual do volume ósseo trabecular constituído por osso não mineralizado (osteóide).
- Superfície Osteóide (OS/BS %): percentual da superfície trabecular recoberta por matriz osteóide.
- Superfície Osteoblástica (Ob.S/BS %): percentual da superfície trabecular que apresenta osteoblastos.
- Superfície Osteoclástica (Oc.S/BS %): percentual da superfície trabecular que apresenta osteoclastos.
- Superfície de Reabsorção (ES/BS %): percentual da superfície trabecular que apresenta lacunas de reabsorção, com ou sem osteoclastos.

- Espessura Osteóide (O.Th μm): a espessura do rebordo da matriz osteóide depositada nas trabéculas ósseas, expressa em micra.
- Volume Medular (Ma.V/TV %): a porcentagem total de medula óssea subtraída do volume trabecular total.

II. Estruturais:

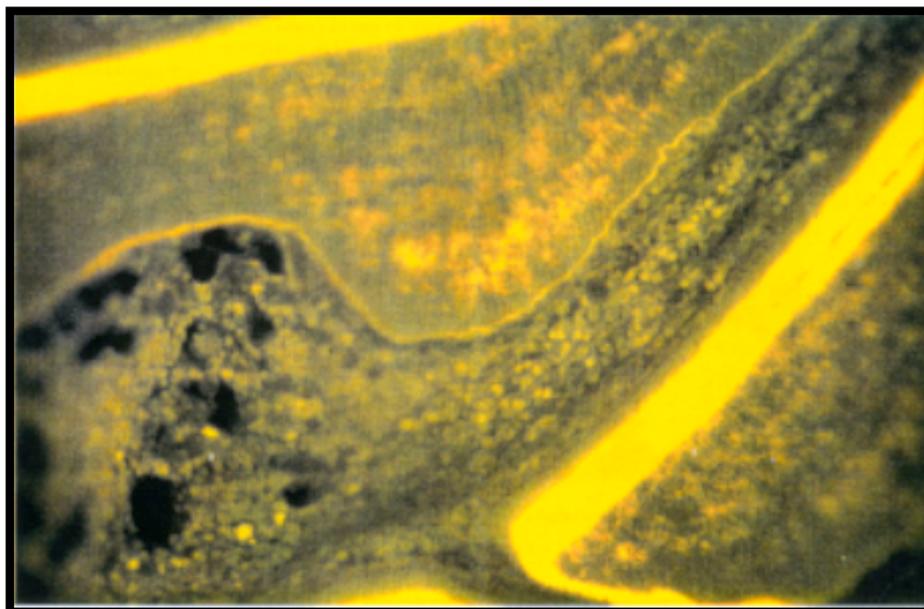
- Espessura Trabecular (Tb.Th μm): a espessura das trabéculas ósseas expressa em micra.
- Separação Trabecular (Th.Sp μm): a distância entre as trabéculas ósseas expressa em micra.
- Número Trabecular (Tb.N /mm): o número de trabéculas ósseas, por milímetro de tecido, sendo também um índice que expressa a densidade trabecular.

III. Cinéticos:

- Taxa de Aposição Mineral (MAR μ/dia): a distância entre as duas marcações pela tetraciclina dividida pelo intervalo de tempo entre as duas marcações, expresso em micra por dia.
- Superfície Mineralizante (MS/BS %): a porcentagem da superfície trabecular que apresenta dupla marcação pela tetraciclina, em relação a superfície trabecular total.
- Taxa de Formação Óssea (BFR/BS $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{dia}$): o volume do osso recém mineralizado, formado por unidade de superfície trabecular e por unidade de tempo, expressa em micra cúbica por micra quadrada por dia. É calculado pela expressão: $\text{BFR/BS} = \text{MAR} \cdot \text{MS/BS}$

- Taxa de Aposição Óssea Corrigida (Aj.AR $\mu\text{m}/\text{dia}$): o volume de osso recém mineralizado, formado por unidade de área de superfície osteóide e por unidade de tempo, expressa em micra por dia. É calculado pela expressão:
$$\text{Aj.AR} = (\text{MAR.MS/BS}) / (\text{OS/BS})$$
- Intervalo de Tempo para Mineralização (Mlt dias): o tempo, em dias, durante o qual a matriz osteóide, recentemente formada, permanece não-mineralizada. É calculado pela expressão: $\text{Mlt} = (\text{O.Th}) / (\text{Aj.AR})$

A avaliação da mineralização óssea é feita administrando-se um marcador ósseo, a tetraciclina, em doses intercaladas. Essa técnica permite a mensuração e



cálculo de índices dinâmicos da formação óssea (COMPSTON, 1997).

Fig 1. Foto mostrando a dupla marcação por tetraciclina. Adaptado de Feldman, Gloriex e Pike, 1997.

Outros marcadores como a alizarina e a calceína, também podem ser usados como marcadores para mineralização ativa e permite vários regimes de marcação para se medir alterações nas taxas de formação óssea (COMPSTON, 1998).

2.5 ESTIMULAÇÃO ULTRASÔNICA

BENDER et al. (1954) estudaram o efeito do ultrassom sobre o tecido ósseo em fêmures de cães. Foi padronizada uma falha óssea cilíndrica no córtex femoral, estendendo-se até a cortical medial sem perfurá-la. Avaliaram o aumento de temperatura e as alterações histológicas no osso cortical e na medula após a aplicação do US em diferentes intensidades (5 a 20 W/cm²). Altas temperaturas foram registradas (>50°C) quando o osso foi exposto a 20 W/cm² por 3 a 5 minutos. Não foi observada alteração aparente no osso cortical, enquanto a medula óssea apresentou área de osteogênese emergindo da perfuração, necrose gordurosa e presença de células gigantes e formação de osso subperiostal. No lado não estimulado, não houve neoformação óssea.

FUKADA (1957) apud XAVIER e DUARTE (1983) realizou uma série de estudos que demonstraram a existência da piezoelectricidade, direta e inversa, do osso. Este conceito reflete a capacidade de um material piezoelétrico em produzir polarização elétrica quando submetido a cargas mecânicas. A conversão da energia mecânica em energia elétrica é definida como efeito piezolelétrico direto. Por sua vez, o efeito piezoelétrico inverso é obtido quando após ter sido aplicado um campo elétrico em um material piezoelétrico, este se deforma. Para FUKADA, o osso

apresenta propriedades de um transdutor de energia e a presença de cargas elétricas no osso é fundamental não só para seu desenvolvimento, mas principalmente para o reparo em caso de fratura.

DYSON et al. (1968), avaliaram a resposta cicatricial do tecido mole de ferimentos padronizados em orelhas de coelhos adultos, sob o efeito do US pulsado em diferentes intensidades. A aplicação foi realizada 3 vezes por semana, durante 5 minutos começando após o décimo quarto dia do pós-operatório e prolongado-se por seis semanas. Os autores observaram um aumento de 32,5% maior na reparação dos ferimentos no grupo experimental do que no controle. Isso foi encontrado após 21 dias de tratamento, com o US na intensidade de $0,5 \text{ W/cm}^2$. Os autores concluíram que os estágios iniciais da regeneração são mais suscetíveis ao estímulo do US.

PAYTON et al. (1975) investigaram o efeito de doses clínicas de US, com interesse no aumento de temperatura causado na medula óssea de fêmures de cães. Foram utilizados seis animais adultos, dos quais foi removido um fragmento de 3 centímetros da cortical lateral distal de cada fêmur e inserida uma sonda térmica na medula óssea. Logo após, foi aplicado o US em intensidades variando de 1,5 a 2,5 W/cm^2 durante 5 a 10 minutos ao dia, por dez dias. Foi observado um aumento de temperatura de $0,4^\circ\text{C}$ aplicando-se o US por 5 minutos a $0,5 \text{ W/cm}^2$ e um aumento de 5°C aplicando-se o US por 5 minutos a $2,5 \text{ W/cm}^2$.

OBE (1978) publicou um trabalho de revisão sobre as aplicações clínicas do US pulsado, enfatizando a necessidade de aplicação precoce para a obtenção de resultados satisfatórios. Indicou o uso em lesões de coluna, ferimentos de tecido mole com fraturas, cicatriz tecidual e lesões esportivas na intensidade de $0,5 \text{ W/cm}^2$,

freqüência de 1MHz num meio contendo água. Preconizou o tratamento por um período de dez dias, com pelo menos uma aplicação diária.

DUARTE (1983) baseado nos trabalhos sobre a piezoelectricidade óssea, desenvolveu estudos experimentais e propôs uma nova forma de tratamento para acelerar a consolidação de fraturas, com retardo de consolidação e pseudoartroses, utilizando o ultra-som de baixa intensidade e pulsado. Segundo este método, as cargas elétricas, necessárias ao reparo do osso, são produzidas no osso por meio do efeito piezoelétrico, pois o ultra-som pulsado atinge a superfície do osso por uma sucessão de impulsos, cada um deles resultando em um sinal elétrico como resposta do osso.

XAVIER e DUARTE (1983) realizaram a partir de 1979, investigações clínicas e radiográficas para avaliar os efeitos da estimulação ultra-sônica do calo ósseo em pessoas portadoras de pseudoartrose e/ou retardo de consolidação de fraturas, atingindo 70% de cura nas pseudoartroses do tipo hipertrófico. Estes procedimentos tiveram início com os estudos da estimulação elétrica para osteogênese, que começaram a ser delineados desde o início do século XIX, conforme afirma DEALLER, apud XAVIER e DUARTE (1983).

XAVIER e DUARTE (1985) estudaram o efeito da estimulação ultra-sônica na formação do calo ósseo em perfurações de tíbias de coelhos, concluindo que, com a estimulação pelo US de baixa intensidade e pulsado durante 15 dias, houve formação mais exuberante de calo subperiosteal e maior velocidade no preenchimento da falha óssea.

BARROS et al. (1985) experimentaram, em coelhos, a influência da aplicação do ultra-som pulsado, de 1,5MHz, largura de pulso de 200 microsegundos,

intensidade aproximada de $70\text{mW}/\text{cm}^2$. Utilizaram-se de um transdutor com 6mm de diâmetro projetado especialmente para o experimento proposto. Os animais selecionados foram coelhos albinos, fêmeas, adultos jovens, da raça Nova Zelândia e peso médio de 2,7Kg.

Foram realizadas perfurações no lado medial das tíbias direita e esquerda de nove coelhos, ficando a esquerda destinada ao tratamento pelo ultra-som e a direita como controle. A perfuração foi realizada com broca de 2,4mm de diâmetro, em ambas as tíbias, até atingir a cavidade medular.

A aplicação do ultra-som foi iniciada na tíbia esquerda, 24 horas após a cirurgia com duração de diária de 20 minutos. Os nove animais foram divididos em 3 subgrupos de acordo com o período de estimulação em 5, 10 e 15 dias. A evolução da reparação foi avaliada através de técnica radiográfica e histológica.

Após o período de estimulação, os animais foram sacrificados, suas patas desarticuladas e serradas transversalmente em fragmentos de 3cm cada. Depois de radiografadas, procedeu-se à preparação histológica adequada para avaliação do tecido encontrado.

A avaliação radiológica para o grupo de 5 dias de estimulação, não demonstrou diferenças entre os lados teste e controle. Para os animais avaliados dez dias após a cirurgia, os dois lados mostraram preenchimento da falha óssea por material radiopaco, embora o grupo teste tenha mostrado concentração de material ligeiramente maior do que o grupo controle.

No grupo de quinze dias, as diferenças foram mais marcantes pois nos membros controle ainda havia o contorno da falha óssea e no grupo teste, a tábua óssea estava totalmente reconstruída.

Na avaliação histológica, percebeu-se que, desde o quinto dia após a cirurgia, houve uma evolução mais evidente nos lados estimulados representada pela presença de tecido conjuntivo fibroso com áreas de cartilagem jovem. Ao décimo dia, os dois lados apresentavam preenchimento por tecido cartilaginoso maduro e calcificado. Porém, no lado estimulado, a quantidade de cálcio do tecido cartilaginoso foi uniformemente mais elevada. No grupo com quinze dias de observação, a falha óssea apresentou-se totalmente fechada por tecido cartilaginoso calcificado. O grupo teste

apresentou uma quantidade maior de tecido ósseo neoformado e de características histológicas mais avançadas.

Na análise morfométrica, a tendência geral foi a de aparecimento mais precoce de elementos formadores de neo-osso nos membros tratados. O resultado final sob esta avaliação revelou quantidade maior de neo-osso. Os autores concluíram que, em condições experimentais, a falha óssea tratada com ultra-som acelerou o processo da formação do calo ósseo.

REUTER et. al.(1987), realizaram osteotomias bilaterais em tíbias de coelhos estabilizando os segmentos ósseos através de síntese interna rígida e aplicando uma estimulação ultra-sônica de $0,1 \text{ w/cm}^2$. Nos animais tratados, o calo ósseo neoformado mostrou características de amadurecimento precoce e maior volume. Os autores concluem o trabalho aconselhando este tipo de estimulação como eletiva em relação a outros métodos.

ENWEMEKA (1989) avaliou a resistência a tensão e a capacidade de absorção de energia de tendões de aquiles de coelhos, submetidos ao tratamento com US em modo contínuo de baixa intensidade. Foram operados 26 coelhos adultos, seccionando-se o tendão transversalmente na sua porção média, entre a inserção calcânea e a junção músculo-tendínea. Após a reaproximação com sutura, a pata do animal foi imobilizada e iniciou-se a aplicação do US a 1,5MHz, 1 W/cm^2 , 5 minutos ao dia, durante nove dias em 11 animais. Os outros 14 foram mantidos como controle. O autor observou que a exposição a ao US, aumentou significativamente tanto a força de resistência a tensão e a capacidade de absorção de energia dos tendões tenotomizados, e que esse efeito foi provavelmente em decorrência do aumento da síntese de colágeno nos tendões tratados.

SANTOS Jr. e MELHADO (1990) estudaram o processo de preenchimento de alvéolos dentários de ratos através de análise histológica após a extração dos terceiros molares superiores com e sem estimulação ultra-sônica em modo contínuo. Os resultados indicam a formação precoce de tecido de granulação, diminuição do tempo de remodelamento ósseo e aceleração do processo cicatricial na sua totalidade.

PILLA et. al.(1990), estudaram os efeitos da estimulação ultrasônica pulsátil e de baixa intensidade em perônios osteotomizados de coelhos de raça New Zealand. A resistência máxima do calo consolidado obteve-se entre o 17º e 28º dia no grupo tratado, e no 28º dia no grupo controle. Através destes resultados foi estimado que a consolidação biomecânica das osteotomias tratadas por ultrasom e acelerada por um fator de 1,7 comparando-a a do grupo controle. As ondas ultra-sônicas utilizadas tiveram intensidade de 30 mW/cm^2 , 1,5 MHz, pulsado e a duração da aplicação foi de 20 min/dia.

BYL et al. (1992) estudaram o efeito do US pulsado de baixa intensidade no reparo de feridas induzidas no dorso de cobaias. Onze animais foram tratados com $0,5 \text{ W/cm}^2$ a 1 MHz por 3 dias e $1,5 \text{ W/cm}^2$ por 2 dias a 1,0MHz. Este estudo relatou o efeito de baixas doses de US na aceleração da cicatrização de feridas do tipo incisão e defeitos de espessura total e parcial no dorso dos animais. A resistência à tensão, deposição de colágeno e redução no tamanho da ferida, assim como a degranulação de mastócitos foram significativamente maiores nas lesões tratadas com US do que nos controles. O US aumentou a resistência tênsil em 24% e a deposição de colágeno em 29% quando comparado aos controles. Os resultados desse trabalho sugerem que o US facilita o processo na primeira semana de cicatrização.

WANG et al.(1994) estimularam com ondas ultrasônicas focos de fraturas experimentais em fêmures de ratos. Após consolidação, os segmentos foram submetidos a ensaios de torção até o limite máximo de resistência, encontrando um incremento de 22% da resistência nos valores obtidos dos animais tratados (e conseqüente aumento da velocidade de consolidação óssea) com 21 dias de pós-operatório.

HECKMAN et al.(1994) submeteram 67 fraturas (não expostas e expostas de grau I) à estimulação ultrasônica, dividindo os pacientes em dois grupos, um dos quais tratados com placebo, verificando clínica e radiograficamente o tempo necessário para a consolidação óssea. Após 120 dias do trauma, em 88% dos pacientes do grupo tratado obtêm consolidação, contra 44% do grupo controle. Com 150 dias, os valores aumentam para 94% nos tratados contra 62% no grupo controle.

WILTINK et al. (1995) avaliaram o processo de ossificação endocondral *in vitro* de osso metatarso em desenvolvimento de feto de ratos com 16 dias de vida. Foram examinados o crescimento ósseo, a calcificação e reabsorção após a exposição a doses de US em modo contínuo (0,1 e 0,7 W/cm²) e pulsado (0,1 e 0,5 W/cm²), 1 MHz de freqüência e 2 milisegundos de pulso. Após uma semana de cultura, os rudimentos de osso foram fixados e secções em parafina preparadas para avaliação histológica e mensuração da contribuição relativa de várias zonas de cartilagem na extensão total de osso. As culturas tratadas com US pulsado apresentaram maior crescimento longitudinal após 4 dias de tratamento em relação ao US contínuo. A avaliação histológica revelou um aumento significativo na extensão da zona proliferativa, entretanto sem alterar a zona hipertrófica, sugerindo que a proliferação de células cartilaginosas é estimulada sem influência na diferenciação celular.

LIN et al.(1995), utilizaram a estimulação ultrasônica após implantação de DP- Bioglass (material sintético e biodegradável) em cêndilos femorais de coelhos adultos de 32 semanas. Os parâmetros fundamentais do estímulo ultra-sônico foram: 1,5MHz de freqüência, potência de estímulo de $0,5 \text{ w/cm}^2$, modo pulsado à razão de 1:1 e 2 milisegundos de intervalo entre os pulsos. Através de uma análise histológica e medição planimétrica das áreas regeneradas, foi comprovada uma intensa ação sobre a regeneração óssea e a reabsorção do material biocompatível, associado ao desenvolvimento de osteócitos dentro do material. Este mecanismo deve-se provavelmente a um efeito eletromecânico nas interfaces das membranas celulares provocado pelo uso do ultrasom.

TANZER et al. (1996) verificaram a influência da estimulação ultra-sônica de baixa intensidade e não invasiva, na aceleração e amplitude do crescimento ósseo em implante de titânio com cobertura porosa. Vinte e dois pares de implantes transcorticais porosos foram inseridos, bilateralmente nos fêmures de 12 cães. Cada cão teve um fêmur como controle e o outro foi submetido à estimulação ultra-sônica por 2, 3 e 4 semanas. Os autores verificaram que os implantes estimulados com US revelaram um incremento de 18% no trabeculado ósseo comparado ao controle contralateral. Os autores relataram que o uso do ultra-som não invasivo de baixa intensidade, apresenta seu pico ótimo de utilização nas primeiras 2 a 3 semanas de estimulação. Neste período, as estimulações mostraram 21 e 16 % respectivamente de crescimento intra ósseo comparado ao controle. Concluíram que o uso do ultrasom de baixa intensidade tem efeitos positivos no crescimento intra-ósseo e indicaram a possibilidade do uso deste procedimento em próteses totais com cobertura porosa não cimentadas.

YANG et al. (1996) estudaram os efeitos da estimulação ultra-sônica, nos vários fatores envolvidos na reparação óssea em fraturas de fêmur em ratos padronizados. Fraturas fechadas foram provocadas em 79 esqueletos maduros de ratos machos da linhagem Long-Evans. Os parâmetros utilizados para o uso do aparelho foram: 200 microsegundos de duração da onda, amplitude de 0,5 MHz até 1 KHz, com intensidade de 50 ou 100mW/cm². A fratura contralateral não foi exposta ao ultrassom, servindo como controle. Nos animais tratados com 100mW/cm², a proporção máxima de torque e a resistência à torção foram maiores do que o grupo controle, mas não apresentaram uma tendência de distância estatística significativa.

Análises bioquímicas do calo no grupo tratado e no grupo controle, não tiveram sucesso em demonstrar diferenças significativas no número de células, níveis de colágeno e cálcio. A avaliação genética das fraturas tratadas com 50mW/cm² de estimulação ultra-sônica, revelou uma mudança na expressão dos genes associados com a formação de cartilagem. A agregação genética foi substancialmente maior nos sete dias subseqüentes à fratura e marcadamente menor no 21°. O gene da proteína alpha 1 pró-colágeno foi similarmente modificado, mas o desvio não foi significativo. Outros genes associados às proteínas do osso, incluindo a alpha 1 pró-colágeno, o ácido gama-carboxiglutâmico, fosfatase alcalina e o fator de crescimento beta-a, não diferiram entre o grupo teste e o grupo controle. Estes dados sugerem que o ultra-som estimula a aceleração das propriedades mecânicas na reparação óssea, pela estimulação tardia das proteínas da matriz extra celular, possibilitando alterações na maturação dos condrócitos e formação do osso endocondral.

REHER et al.(1997) elaboraram um estudo controlado para avaliar o efeito de diferentes intensidades do US em cultura de osso de crânio de ratos com 5 dias de vida. Foram avaliadas a síntese de colágeno e proteínas não colagênicas, e alterações de temperatura na cultura. Foi demonstrado que o US a $0,1\text{W}/\text{cm}^2$, pulsado a 2 milisegundos, frequência de 3MHz, por 5 minutos, estimulou significativamente a formação de osso e a síntese de colágeno e proteínas não colagênicas. Foi observado que aumentando-se a intensidade para 1,0 a $2,0\text{ W}/\text{cm}^2$, mantendo-se os outros parâmetros inalterados, houve inibição significativa da síntese de colágeno e proteínas não colagênicas. O aumento máximo da temperatura foi de $1,8^\circ\text{C}$ na intensidade de $2\text{W}/\text{cm}^2$ e nenhum aumento detectável a $0,1\text{ W}/\text{cm}^2$.

HECKMAN e SARASOHN (1997) divulgaram os resultados de um estudo de gerenciamento de custos hospitalares comparando a um trabalho prévio de 1994. As fraturas de tibia, cuja incidência é alta, podem evoluir com retardo de consolidação ou, nos piores casos, de não consolidação. Os autores propuseram três modelos de custos, onde no 1º colocaram-se os orçamentos de custos do tratamento cirúrgico, no 2º os do tratamento conservador e no 3º os do tratamento cirúrgico e conservador, junto à aplicação de ultrassom pulsátil e de baixa intensidade. Quando comparados, o modelo nº 2 consegue uma teórica redução de custos de US\$ 15.000/caso (40% do custo total), e no modelo nº 3 (tratamento cirúrgico e ultrassom), a redução é de US\$13.000/caso, quando comparados ao modelo nº 1. Reduzindo-se o tempo de consolidação, foi assim teorizada uma redução dos custos substancial por parte da Instituição.

KRISTIANSEN et al. (1997) submeteram 60 pacientes a tratamento de fraturas distal do rádio (61 fraturas) em um estudo multicentro, duplo-cego e

randomizado. Após a redução das fraturas e sete dias depois do acometimento, iniciaram-se as aplicações. Os pacientes foram divididos em dois grupos, um de 31 fraturas e outro com as 30 restantes. O grupo I (30 fraturas) foi submetido ao uso do US, por vinte minutos diários, durante dez semanas. O grupo controle (31 fraturas) foi submetido a um aparelho placebo. Os exames prosseguiram através de avaliações radiográficas realizadas nos intervalos de uma, duas, três, quatro, cinco, seis, oito, dez, doze, e dezesseis semanas após a ocorrência das fraturas. O tempo de consolidação foi significativamente menor para as fraturas tratadas com o ultrassom, contra a aplicação do placebo, apresentando o resultado de 61 ± 3 dias contra 98 ± 5 dias respectivamente. Cada estágio radiográfico da consolidação mostrou, no grupo controle, sensível incremento de reparação em comparação ao grupo teste.

GUERINO et al. (1997) analisaram os efeitos do tratamento com US pulsado e baixa intensidade ($0,2 \text{ W/cm}^2$) na consolidação óssea e resistência à deformação em tíbias de ratos Wistar. Após a padronização de defeitos de 3mm de extensão transcorticais na pata direita, os animais receberam tratamento por 5 minutos diariamente, durante 30 dias. Passado o período de estimulação, os animais foram sacrificados e as tíbias submetidas a análises de resistência máxima a flexão, flecha de ruptura e rigidez flexural média. Foi observado um aumento da rigidez flexural do osso nos animais tratados com o US ($20,43 \pm 3,22 \text{ Kgf/mm}$) em relação ao grupo não tratado ($14,56 \pm 2,80 \text{ Kgf/mm}$), sugerindo uma aceleração na mineralização do tecido ósseo.

COOK et al. (1997) investigaram a utilização do US na aceleração de osso cortical e medular, nas fraturas de tíbia e distal de rádio em cicatrização, de pacientes fumantes e não fumantes. Foi utilizado o US com largura de pulso de 200

milisegundos, 1,5MHz de frequência de onda, 1KHz de frequência de repetição e intensidade de 30 mW/cm². O tratamento foi iniciado sete dias após a fratura e consistia de aplicações diárias de 20 minutos, durante 20 semanas ou até que a fratura estivesse consolidada o suficiente para descontinuar o tratamento. Houve redução em 41% do tempo de cicatrização das fraturas de tíbia em fumantes e 26% em pacientes não fumantes. Nas fraturas de rádio a redução no tempo de cicatrização foi de 51% em fumantes e 34% em não fumantes. O tratamento mostrou-se efetivo em acelerar a cicatrização do osso tanto cortical quanto medular, mitigando os efeitos do fumo na cicatrização e devolvendo as funções normais dos pacientes mais rapidamente.

GLAZER et al. (1998) avaliaram o efeito do US em modelos de artrodese em coelhos. 28 animais foram divididos em dois grupos que receberam enxerto ósseo autólogo. Os animais do grupo experimental receberam o US pulsado de baixa intensidade na frequência de 1,5 MHz, 200 milisegundos de largura de pulso e frequência de repetição de 1 KHz. Foram avaliados os parâmetros radiológicos, biomecânicos e histológicos. A análise radiográfica mostrou consolidação em 13 animais do grupo controle contra 9 no grupo não tratado. Houve um aumento de 37% na rigidez e 34% no volume da massa fusionada exposta ao US. Os resultados demonstraram que houve um aumento na velocidade de fusão dos processos transversos na espinha lombar do coelho.

SPADARO e ALBANESE (1998) salientando que o uso do ultrassom de baixa intensidade e pulsado já era notório à época do experimento, avaliaram esse aparelho no processo de crescimento de ossos longos e no aumento da densidade óssea em ratos jovens. O crescimento longitudinal e a densidade óssea foram avaliados após a

aplicação de ultra-som pulsado, emitindo 1,5MHz, 30 mW/cm² de intensidade por 20 minutos diários. Após 28 dias nenhuma diferença no comprimento foi detectada (\leq 2%) em comparação ao membro não tratado ou ao grupo controle. Também não foi detectada diferença significativa na densidade óssea no fêmur ou tibia testados. Em repetidos experimentos, nos quais havia um trauma no periósteo da diáfise femoral, o ultra-som também não teve efeito no crescimento ou na densidade óssea. Segundo os autores, estes resultados sugerem que a fase de crescimento não é afetada pela estimulação ultra-sônica quando do seu uso na consolidação de fraturas. Os resultados nestes casos são relacionados pelos autores, à cascata dos eventos celulares e aos fatores de regulação presentes depois de uma fratura.

REHER et al. (1998) investigou *in vitro* a utilização de ondas ultra-sônicas de diferentes frequências, em culturas de células de fibroblastos gengivais e osteoblastos mandibulares humanos. Avaliaram a proliferação celular (síntese de DNA) proteínas colágenas e não colagênicas pelos radiomarcadores timidina e prolina, respectivamente. A proliferação fibroblástica aumentou em 47% a 0,7 W/cm² (1 MHz) e 43% a 50 mW/cm² (45 KHz), e a proliferação osteoblástica aumentou 52% a 1,0 W/cm² (1MHz) e 35% a 30mW/cm² (45KHz) enquanto a produção de colágeno pelo fibroblasto aumentou 48% a 0,1 W/cm² (1MHz) e 44% a 15mW/cm² (45KHz) e a produção de colágeno pelo osteoblasto aumentou 55% a 0,1 W/cm² (1MHz) e 112% a 30 mW/cm² (45KHz). Foi demonstrado que ondas ultra-sônicas de baixa frequência são capazes de igualmente induzir a formação óssea ou até mesmo superar o efeito de ondas de alta frequência. Por ter uma maior penetração, as ondas de baixa frequência, segundo os autores, poderiam ser utilizadas no tratamento da osteorradionecrose mandibular.

DOAN et al.(1999) realizaram estudo *in vitro* semelhante ao previamente desenvolvido por REHER (1998). Foram comparados o US de alta e baixa frequência (1MHz e 45KHz, respectivamente) em culturas de células de fibroblastos gengivais, osteoblastos mandibulares e monócitos humanos, avaliando a seus efeitos na síntese de DNA, síntese de proteínas colágenas e não colágenas e na produção de citocinas envolvendo a interleucina (IL) 1 β , IL-6, IL-8 , fator de necrose tumoral α (FNT α), fator de crescimento fibroblástico básico (FCFb) e fator de crescimento endotelial vascular (FCEV).

O US induziu aumento no crescimento da proliferação celular nos fibroblastos e osteoblastos entre 35% a 52%. A síntese proteica teve aumentos de até 112%, com os melhores resultados conseguidos pelo US a 45KHz. A interleucina (IL) 1 β foi suavemente estimulada por todas as células. Não houve diferença entre os níveis de IL-6 e FNT α . As citocinas relacionadas a angiogênese (IL-8 e FCFb) foram aumentadas nos osteoblastos e a produção de FCEV foi estimulada nos três tipos de células. Os resultados foram conseguidos em ambas a frequências utilizadas.

EMAMI et al.(1999) avaliaram o nível sérico de marcadores ósseos prospectivamente por 1 ano em 30 pacientes adultos portadores de fraturas de tibia com fixação intramedular. Através de estudo duplo cego, metade dos pacientes receberam tratamento com US de baixa intensidade, 1,5MHz de frequência de onda, 1,0KHz de frequência de repetição e intensidade de 30 mW/cm² , 3 dias após as cirurgias, 20 minutos ao dia, durante 75 dias.

Não houve diferença estatística significativa no aspecto radiográfico do reparo ósseo entre o grupo tratado (média de 113 dias) e o grupo controle (média de 112 dias). O marcador de reabsorção óssea, telopeptídeo, atingiu o pico sérico de 1 a

4 semanas, enquanto o marcador de formação óssea atingiu o pico de 10 a 16 semanas para a fosfatase alcalina e osteocalcina. O telopeptídeo sérico estava mais baixo, em uma semana, nos pacientes tratados com US do que nos pacientes que receberam o placebo. Não foi demonstrada diferença nos marcadores de formação óssea entre os grupos tratado e controle. Os pacientes com retardo de cicatrização apresentaram níveis mais baixos de fosfatase alcalina óssea entre a quarta e sétima semanas do que pacientes com cicatrização normal, embora nenhuma diferença foi notada para a osteocalcina. Os resultados do trabalho sugeriram que o US de baixa intensidade pode reduzir a reabsorção óssea, sem no entanto ter nenhum efeito visível na formação óssea.

SUN et al.(1999) estudaram o reparo de defeitos ósseos em fêmures de ratos Wistar, *in vitro* sob a influência do US pulsado de baixa intensidade. Foram utilizados 36 animais adultos que, após sacrificados, tinham suas patas desarticuladas e dissecadas cuidadosamente, mantendo-se o perióstio. Foi criado um defeito no centro da metáfise distal do fêmur, com fio de aço cilíndrico de 1,77mm². Os fêmures foram mantidos de 7 a 14 dias *in vitro* em cultura e receberam 15 minutos de US diariamente em intensidades de 320 ou 770 mW/cm². O reparo do osso foi avaliado por exame histomorfológico e pela análise da síntese e secreção de prostaglandinas E₂. Os autores observaram que o US acelerou tanto a cicatrização quanto a regeneração do trabeculado ósseo na intensidade de 770mW/cm². Nas culturas estimuladas tanto a síntese como secreção de prostaglandina E₂ diminuíram significativamente, correspondendo a alterações na quantidade de regeneração do osso trabecular e aceleração da cicatrização óssea.

SATO et al.(1999) relataram um caso de um paciente com deficiência de crescimento, submetido a alongamento do fêmur, associado a aplicação do US pulsado de baixa intensidade ($30\text{mW}/\text{cm}^2$) 20 minutos ao dia, durante oito meses. O autor relatou que o US acelerou o aumento na mineralização do calo ósseo e encurtou o período de cicatrização.

NARUSE et al.(2000) avaliaram a resposta anabólica de cultura de células da medula óssea de ratos Wistar, sob a estimulação do US pulsado de baixa intensidade ($1,5\text{MHz}$, 20 milisegundos de largura de pulso, 1 KHz de frequência de repetição e $30\text{ mW}/\text{cm}^2$). Observaram a expressão do RNAm das proteínas da matriz óssea, fatores de crescimento e a resposta dos genes após o estímulo pelo US que foi aplicado a cada 20 minutos até se completar uma hora e depois em 2, 4, 8, 12 e 24 horas.

Os autores observaram a expressão do gene c-fos imediatamente após 20 minutos de exposição da cultura ao US, atingindo o pico após 40 minutos e subsequente decréscimo após 4 horas. A elevação de RNA mensageiro também foi notada em várias proteínas ósseas como a IGF-1, osteocalcina e sialoproteína óssea. Não foi observada resposta da TGF- β . Todas as proteínas ósseas, com exceção de c-fos, tiveram um segundo pico de expressão após 24horas.

O estudo demonstrou que o US tem efeito regulador sobre a osteocalcina e a IGF-1 de maneira bifásica em culturas de células clonadas de medula óssea de rato (ST2 cells).

FUJIOKA et al. (2000) relataram um caso bem sucedido de tratamento clínico com US de baixa intensidade em um paciente com fratura do gancho do hamato, causado por acidente com motocicleta. A paciente relatava dor na região

hipoténar da mão esquerda e diminuição da força de preensão. Foi instituído tratamento com US de baixa intensidade e pulsado (1,5Mhz e 30 mW/cm²) com aplicações diárias de 20 minutos, durante 4,5 meses. Após o tratamento não havia mais sintomatologia e a força de preensão havia se normalizado. A união da fratura foi confirmada pela tomografia computadorizada.

MAYR et al. (2000), Relataram o tratamento de 951 retardos de união e 366 casos de pseudoartrose com US pulsado de baixa intensidade. O autor relatou um índice de sucesso de 91% para os retardos de consolidação e 86% para os casos de pseudoartrose.

3. OBJETIVOS

Baseado nesses fatos, o objetivo do nosso trabalho é avaliar, pela histomorfometria, o efeito do ultra-som pulsado de baixa intensidade em defeitos ósseos provocados em fêmures de rato sob condições controladas, tendo em vista os

parâmetros histomorfométricos de reparo ósseo e a velocidade de aposição mineral dado pela dupla marcação com a tetraciclina.

O presente trabalho foi submetido a apreciação e aprovado pela Comissão de Avaliação de Projetos de Pesquisa- CAPPesq e pela Comissão de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

4. MATERIAL E MÉTODO

4.1 Materiais

Foram utilizados 18 ratos machos adultos de linhagem Wistar com peso de aproximadamente 300 g. Após o exame objetivo, os animais fisicamente aptos , foram submetidos às cirurgias experimentais.

4.2 Métodos

4.2.1 Protocolo anestésico

Os animais foram divididos em grupos I (1-6), II (7-12) e III (13- 18) e identificados na cauda por tatuagens com tinta indelével. Após a identificação foram colocados numa caixa de indução anestésica, construída em acrílico transparente com tampa parafusada e administrado o gás anestésico (Halotane^R) na indução e durante a manutenção.

A mistura de oxigênio (fluxo de 0,5 l/min) e Halotane^R (4%) foi administrada através de um aparelho de anestesia inalatória portátil (vaporizador Ohmeda^R) conectando a válvula de inspiração do aparelho ao engate superior da caixa de indução por meio de uma cânula de extensão .

Conectou-se a saída dos gases (canto inferior da caixa) à valvula unidirecional do aparelho e os animais induzidos e mantidos sob anestesia por meio de uma máscara de plástico, conectada ao mesmo aparelho mantendo a concentração anestésica de 2,5% e o fluxo de O₂ de 0,5 l/min. (após substituição da caixa de acrílico).

4.2.2Técnica Cirúrgica

- Após tricotomia bilateral das coxas , foi feita a antissepsia com povidine tópico a 1% e posicionados os campos estéreis.
- Incisão em pele de aproximadamente um centímetro na região da articulação do joelho, com controle de hemostasia, diérese dos tecidos moles com pinça Kelly curva e tesoura Metzembraum delicada, e revisão da hemostasia.

- Elevação subperiosteal dos fêmures com descolador de Freer
- Perfuração dos fêmures direito e esquerdo na cortical lateral da epífise distal estendendo-se até a cortical medial sem perfurá-la, logo abaixo da cartilagem de crescimento, utilizando motor elétrico sob pressão manual, com broca de titânio de dois milímetros de diâmetro sob irrigação com soro fisiológico a 0,9%.
- Sutura dos tecidos moles com fio mononylon 4-0 em pontos isolados.



Fig 2. Modelo de falha óssea padronizada na epífise distal do fêmur de ratos Wistar.

4.2.3 Administração do marcador ósseo

Foi administrada oxitetraciclina na dose de 20mg/Kg peso, através de injeções intraperitoneais após as cirurgias, seguindo o seguinte cronograma: Uma injeção logo após a cirurgia, uma injeção no 6^o e 7^o dia pós-operatório (grupo I), 13^o e 14^o dia (grupo II) e 20^o e 21^o (grupo III).

4.2.4 Protocolo de aplicação de estimulação ultra-sônica

Foi utilizado um aparelho investigativo para consolidação de fraturas da marca Ohmic - UPM- DT10, nº 1024 (KLD Biosistemas Equipamentos Eletrônicos Ltda/ Amparo, São Paulo) calibrado com os seguintes parâmetros físicos de acordo com XAVIER e DUARTE (1983):

Potência de saída :30 mW/cm²

Área do transdutor: 3,0 cm²

Frequência de Pulso: 1.5 MHz

Duração do pulso: 1:4

Frequência de repetição: 1,0 KHz

A fase de estimulação por ondas de baixa frequência e pulsáteis foi executada a partir do primeiro dia até o sétimo, décimo quarto e vigésimo primeiro dias nos grupos I, II e II respectivamente.

Cada aplicação teve a duração de 20 minutos, uma vez ao dia, aplicando-se a superfície do transdutor na região operada em movimentos circulares, utilizando-se gel hidrossolúvel como meio de difusão das ondas ultra-sônicas. Foi utilizado um estabilizador de tensão de corrente elétrica, conectando o aparelho de ultrassom à rede elétrica do laboratório. Os animais foram submetidos à estimulação em patas alternadas direita ou esquerda, onde o lado contralateral foi considerado o controle, pata esta que foi isolada com papel laminado, evitando a difusão do ultrassom, totalizando dezoito fêmures estimulados e dezoito não estimulados.

Foram operados trinta e seis fêmures, divididos em lado direito e esquerdo:

4.2.5 Protocolo de Eutanásia

Os animais foram sacrificados após sete, quatorze e vinte e um dias de estimulação, os fêmures dissecados com remoção do terço distal e acondicionados em álcool a 70%. A eutanásia obedeceu ao seguinte protocolo:

- Anestesia total obtida com Halotane®
- Injeção endovenosa de Pentobarbital sódico (100mg/kg)
- Injeção endovenosa de KCl (5 min. após o Pentobarbital)

Os critérios seguidos pelo estudo durante todas as fases de experimentação seguiram os princípios expressos nas normas internacionais que regulamentam a experimentação em animais:

- **Declaração de Helsinki**
- **Guiding Principles in the Care and Use of Animals**. Aprovado pelo conselho da Sociedade Americana de Fisiologia, revisado em 1991.
- **Guide for care Use of Laboratory Animals, NNI publications n° 85-23**, revisada em 1985.
- **Panel on Euthanasia** , J Am Vet Med Assoc , 188: 252-268, 1988.
- **ISSO 10993-2: 1992 (E)**: Biological evaluation of medical devices; Part 2: animal welfare requirements

4.2.6 Preparo das peças

Os fêmures de cada animal foram dissecados e divulsionados entre a epífise distal e a cartilagem de crescimento, de maneira a conservar esta última. Os fragmentos ósseos receberam o seguinte tratamento em seqüência:

- a. permanência no etanol a 70% por 6 dias.
- b. permanência no etanol a 100% por 6 dias.
- c. permanência no tolueno por 1 dia.
- d. permanência na Sol.A (Metilmetacrilato 75% + Dibutilftalato 25%) por 6 dias.
- e. permanência na Sol.A + peróxido de benzoila a 1% por 6 dias.
- f. permanência na Sol. A + peróxido de benzoíla a 2% por 6 dias.
- g. transferência do fragmento para uma estufa a 37 C até endurecimento do bloco.
- h. secção do bloco em cortes histológicos utilizando-se um micrótomo de impacto Jung (modelo K).

Os blocos obtidos foram seccionados em cortes de 5 μ m e 10 μ m, utilizando-se micrótomo de impacto Jung K com navalha de tungstênio. De cada bloco obtiveram-se 6 lâminas com 2 cortes cada. As lâminas com cortes de 5 μ m foram coradas com azul de toluidina a 0,1%. Duas lâminas foram mantidas sem o corante para análise através de luz ultravioleta, onde foi observada a dupla marcação pela tetraciclina.

4.2.7 Avaliação histomorfométrica

As medidas foram realizadas em 30 campos na área da epífise distal dos fêmures, imediatamente proximal à placa de crescimento epifisária, equidistante das duas corticais. Fig.3

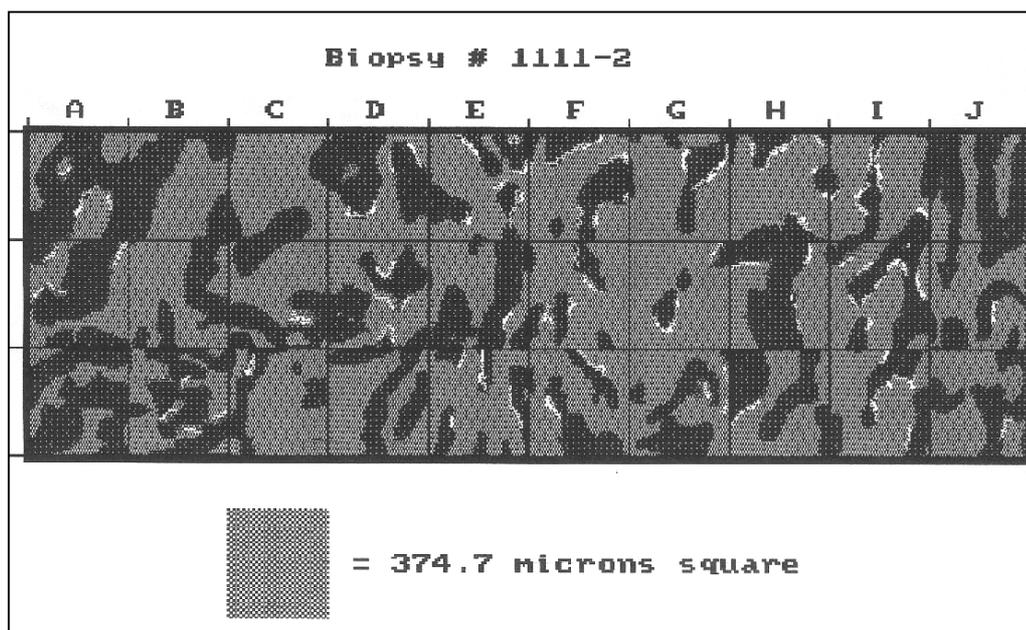


Fig.3 – Contagem dos campos de avaliação em um corte após a quantificação dos elementos estruturais, com o uso do programa Osteomeasure.

O estudo histomorfométrico foi realizado com microscópio provido de luz ultravioleta (Labophot 2^A Nikon) com ampliação de 125 vezes, objetiva com retículo integrada de 100 pontos (Integrationsplatte II) e de outra com régua micrométrica, cursor, placa digitalizadora e o software Osteomeasure (OsteoMetrics, Inc. - Atlanta - EUA). O examinador não tinha conhecimento do tratamento recebido pelos animais.

Os parâmetros histomorfométricos estudados foram divididos em estáticos e dinâmicos, sendo os últimos analisados pela dupla marcação com a tetraciclina. As denominações dos parâmetros medidos (traduzidos para o português), assim como

suas abreviaturas (não traduzidas) seguiram a nomenclatura padronizada pela American Society of Bone and Mineral Research. (PARFITT, 1987):

I. Estáticos:

1. **Volume ósseo (BV/TV %):** percentual do volume ósseo total (medula e trabécula), constituído por osso trabecular, mineralizado ou não.

2. **Volume osteóide (OV/BV%):** percentual do volume ósseo trabecular constituído por osso não mineralizado (osteóide)

3. **Espessura osteóide (O.th):** espessura do rebordo da matriz osteóide depositada nas trabéculas ósseas, expressa em micra.

4. **Superfície osteóide (OS/BS%):** percentual da superfície trabecular recoberta por matriz osteóide.

5. **Superfície de Reabsorção (ES/BS %):** percentual de superfície trabecular que apresenta lacunas de reabsorção, com ou sem osteoclastos.

6. **Superfície Osteoblástica (Ob.S/BS%):** percentual da superfície trabecular que apresenta osteoblastos.

7. **Superfície Osteoclástica (Oc.S/BS%):** percentual da superfície trabecular que apresenta osteoclastos.

8. **Tb.th:** espessura trabecular em micras.

9. **Tb.sp:** separação entre trabéculas em micras.

10. **Tb.N:** número de trabéculas em mm/mm^2

II. Dinâmicos:

- - **Taxa de Aposição Mineral (MAR $\mu\text{m}/\text{dia}$)** a distância entre as duas marcações pela tetraciclina dividida pelo intervalo de tempo entre as duas marcações, expresso em micra por dia.

4.2.8 Análise estatística.

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística descritiva, determinando-se valores referidos como média (M), desvio padrão (DP), erro padrão da média (EPM), valor máximo (Max) e mínimo (Min).

Para verificar a diferença entre o grupo controle e estimulado, segundo o tempo de estimulação, aplicamos o teste de t de *Student* pareado para amostras paramétricas e teste de Wilcoxon para amostras não-paramétricas.

As diferenças entre os diversos parâmetros analisados foram consideradas significativas para os valores de $p < 0.05$ e assinalados com asteriscos.

5. RESULTADOS

Os valores obtidos após a coleta de dados estão agrupados nas seguintes tabelas e referem-se aos índices histomorfométricos de volume (BV/TV; OV/BV), superfície (OS/BS; Ob.S/BS; ES/BS; Oc.S/BS), espessura (Tb.th; O.th) e numéricos (Tb.sp; Tb.N).. Também estão tabulados os resultados referentes a espessura da cortical óssea, Taxa de aposição mineral dada pela dupla marcação pela tetraciclina e variação do peso inicial e final dos animais de acordo com o tempo de estímulo pelo US.

Tabela 1: Valores médios das corticais ósseas dos fêmures direito e esquerdo expressos em micras.

	Espessura Cortical [μm]					
	1ª semana		2ª semana		3ª semana	
	direito	esquerdo	direito	esquerdo	Controle	Estimulado
	-	696	453	406	406	411
	794	658	525	453	510	476
	380	564	466	465	540	465
	461	634	455	363	469	496
	563	591	502	555	506	417
	528	542	516	522	599	489
M	545,20	614,17	486,17	460,67	505,00	459,00
DP	155,64	58,78	32,02	71,08	65,09	36,50
EPM	69,60	24,00	13,07	29,02	26,57	14,90
MIN	380,00	542,00	453,00	363,00	406,00	411,00
MAX	794,00	696,00	525,00	555,00	599,00	496,00
N	5	6	6	6	6	6
t de Student pareado	----- t = -0,89 p = 0,21		----- t = 1,15 p = 0,15		----- t = 2,07 p = 0,04*	

Tabela2: Taxa de aposição mineral dada pela marcação por tetraciclina

	MAR - μ /dia					
	1ª semana		2ª semana		3ª semana	
	Controle	Estimulado	Controle	Estimulado	Controle	Estimulado
	1,08	1,43	0,52	0,56	0	0
	0,85	0,92	0,61	0,5	0,51	0,52
	0,78	0,82	0,56	0,64	0,52	0,56
	0,6	0,88	0,55	0,65	0,46	0,48
	0,91	1,03	0,56	0,58	0,44	0,47
	0	0	0,67	0,73	0,41	0,5
M	0,70	0,85	0,58	0,61	0,39	0,42
DP	0,38	0,47	0,05	0,08	0,20	0,21
EPM	0,15	0,19	0,02	0,03	0,08	0,09
MIN	0,00	0,00	0,52	0,50	0,00	0,00
MAX	1,08	1,43	0,67	0,73	0,52	0,56
N	6	6	6	6	6	6
t de Student pareado	----- t = -2,5 p = 0,02*		----- t = -1,03 p = 0,17		----- t = -2,43 p = 0,02*	

Tabela3: Peso inicial e final dos animais distribuídos de acordo com o tempo de estimulação

	Peso do animal em mg					
	1ª semana		2ª semana		3ª semana	
	Controle	Estimulado	Controle	Estimulado	Controle	Estimulado
	349	345	452	458	440	443
	421	418	402	410	340	345
	450	448	395	398	380	387
	391	400	375	383	427	425
	446	440	382	391	427	429
	404	410	416	424	440	438
M	410,17	410,17	403,67	410,67	409,00	411,17
DP	37,78	36,70	27,78	27,32	40,43	37,96
EPM	15,42	14,98	11,34	11,15	16,50	15,50
MIN	349,00	345,00	375,00	383,00	340,00	345,00
MAX	450,00	448,00	452,00	458,00	440,00	443,00
N	6	6	6	6	6	6
t de Student pareado	----- t = 0,0 p = 0,5		----- t = -7,82 p = 0,0005 *		----- t = -1,45 p = 0,10	

Tabela 4: Volume ósseo total, mineralizado ou não, expresso em percentagem.

	Bv/Tv %					
	1ª semana		2ª semana		3ª semana	
	Controle	Estimulado	Controle	Estimulado	Controle	Estimulado
	19,86	25,37	25,68	26,42	26,5	27,97
	22,22	28,86	28,91	29,94	24,1	25,17
	26,03	35,79	27,5	31,89	24,38	55,38
	21,78	42,02	10,61	22,14	18,92	30,87
	10,7	30,43	29,66	27,43	21,32	31,47
	29,13	25,06	17,89	19,37	34,73	35,01
M	21,62	31,26	23,38	26,20	24,99	34,31
DP	6,30	6,57	7,56	4,71	5,45	10,84
EPM	2,57	2,68	3,08	1,92	2,23	4,43
MIN	10,70	25,06	10,61	19,37	18,92	25,17
MAX	29,13	42,02	29,66	31,89	34,73	55,38
N	6	6	6	6	6	6
t de Student pareado	----- t = -2,55 p = 0,02*		----- t = -1,45 p=0,10		----- t = -1,94 p = 0,054	

Tabela 5: Volume ósseo trabecular constituído por osso não mineralizado.

	Ov/Bv %					
	1ª semana		2ª semana		3ª semana	
	Controle	Estimulado	Controle	Estimulado	Controle	Estimulado
	0,35	0,44	0,98	0,37	0,31	0,13
	2,2	1,29	0,11	0,17	0,6	0,7
	0,42	0,89	0,35	0,34	0,57	0,18
	0,19	5,98	0,4	1,56	0,73	0,34
	0,35	3,34	0,33	0,32	0,21	1,3
	0,02	0,02	0,8	2,32	0,92	0,15
M	0,59	1,99	0,50	0,85	0,56	0,47
DP	0,80	2,27	0,33	0,88	0,26	0,46
EPM	0,33	0,93	0,13	0,36	0,11	0,19
MIN	0,02	0,02	0,11	0,17	0,21	0,13
MAX	2,20	5,98	0,98	2,32	0,92	1,30
N	6	6	6	6	6	6
Wilcoxon	----- W = - 9 p = 0,1563		----- W = - 7 p=0,2813		----- W = 7 p = 0,2813	

Tabela 6: Superfície trabecular recoberta por matriz osteóide.

	OS/BS %					
	1ª semana		2ª semana		3ª semana	
	Controle	Estimulado	Controle	Estimulado	Controle	Estimulado
	3,34	6,8	7,15	3,25	3,33	1,04
	25,69	16,46	1,68	1,62	5,39	5,45
	5,59	8,61	3,57	3,75	6,06	2,6
	2	44,77	3,62	9,05	5,98	2,77
	5,06	26,89	3,76	3,92	1,9	9,29
	0,5	0,14	8	15,61	9,49	1,56
M	7,03	17,28	4,63	6,20	5,36	3,79
DP	9,33	16,29	2,42	5,25	2,61	3,10
EPM	3,81	6,65	0,99	2,14	1,06	1,26
MIN	0,50	0,14	1,68	1,62	1,90	1,04
MAX	25,69	44,77	8,00	15,61	9,49	9,29
N	6	6	6	6	6	6
Wilcoxon	----- W = - 11 p = 0,1563		----- W = - 11 p=0,1563		----- W = 9 p = 0,2188	

Tabela 7: Superfície trabecular que apresenta osteoblastos

	Ob.S/BS %					
	1ª semana		2ª semana		3ª semana	
	Controle	Estimulado	Controle	Estimulado	Controle	Estimulado
	1,9	4,15	4,26	2,31	1,92	0,65
	23,34	12,33	1,23	0,74	2,48	2,15
	4,09	6,68	1,82	1,99	3,32	1,63
	1,52	35,89	2,66	5,48	4,09	1,49
	4,36	20,74	2,19	2,62	1,18	5,17
	0,45	0,15	4,49	9,03	5,83	0,97
M	5,94	13,32	2,78	3,70	3,14	2,01
DP	8,66	13,17	1,33	3,05	1,67	1,63
EPM	3,53	5,38	0,54	1,24	0,68	0,67
MIN	0,45	0,15	1,23	0,74	1,18	0,65
MAX	23,34	35,89	4,49	9,03	5,83	5,17
N	6	6	6	6	6	6
Wilcoxon	----- W = - 11 p = 0,1563		----- W = - 7 p=0,2813		----- W = 11 p = 0,1563	

Tabela 8: Superfície trabecular que apresenta lacunas de reabsorção, com ou sem osteoclastos.

	ES/BS %					
	1ª semana		2ª semana		3ª semana	
	Controle	Estimulado	Controle	Estimulado	Controle	Estimulado
	11,32	8,2	1,62	7,29	3,24	2,27
	18,44	14,9	6,58	2,45	0,78	2,14
	8,02	9,4	4,02	3,5	1,3	4,32
	10,2	8,56	1,31	0,12	2,06	3,19
	13,97	12,78	2,34	2,86	1,41	0,6
	2,36	3,49	1,31	2,24	0,39	0,66
M	10,72	9,56	2,86	3,08	1,53	2,20
DP	5,44	3,96	2,09	2,36	1,01	1,44
EPM	2,22	1,62	0,85	0,96	0,41	0,59
MIN	2,36	3,49	1,31	0,12	0,39	0,60
MAX	18,44	14,90	6,58	7,29	3,24	4,32
N	6	6	6	6	6	6
Wilcoxon	----- W = 13 p = 0,1094		----- W = 0 p=0,5000		----- W = -11 p = 0,1563	

Tabela 9: Superfície trabecular que apresenta osteoclastos

	Oc.S/BS %					
	1ª semana		2ª semana		3ª semana	
	Controle	Estimulado	Controle	Estimulado	Controle	Estimulado
	2,9	2,44	1,24	4,53	1,15	1,06
	6,46	4,68	4,26	1,12	0,15	0,32
	2,99	3,1	2,31	1,54	0,06	2,17
	6,99	3,48	0,38	0,08	1,17	2,21
	9,7	4,85	0,94	1,09	0,85	0,33
	1,65	2,53	0,53	1,51	0,16	0,41
M	5,12	3,51	1,61	1,65	0,59	1,08
DP	3,09	1,04	1,47	1,51	0,52	0,90
EPM	1,26	0,43	0,60	0,62	0,21	0,37
MIN	1,65	2,44	0,38	0,08	0,06	0,32
MAX	9,70	4,85	4,26	4,53	1,17	2,21
N	6	6	6	6	6	6
Wilcoxon	----- W = 13 p = 0,1094		----- W = -1 p=0,5000		----- W = -11 p = 0,1563	

Tabela 10: Espessura das trabéculas ósseas.

	Tb.Th/ μm					
	1ª semana		2ª semana		3ª semana	
	Controle	Estimulado	Controle	Estimulado	Controle	Estimulado
	46,86	54,42	55,35	49,21	53,22	57,56
	52,96	49,74	49,72	52,76	54,77	49,41
	58,66	51,51	57,2	60,51	58,39	92,75
	47,24	38,93	42,02	48,97	58,93	64,5
	43,6	49,55	50,3	51,57	57,17	53,76
	49,44	44,38	52,3	54,06	72,07	62,33
M	49,79	48,09	51,15	52,85	59,09	63,39
DP	5,33	5,55	5,32	4,24	6,72	15,40
EPM	2,18	2,27	2,17	1,73	2,74	6,29
MIN	43,60	38,93	42,02	48,97	53,22	49,41
MAX	58,66	54,42	57,20	60,51	72,07	92,75
N	6	6	6	6	6	6
t de Student pareado	----- t = 0,6 p = 0,283		----- t = -0,9 p=0,1902		----- t = -0,6 p = 0,2681	

Tabela 11: Espessura do rebordo da matriz osteóide depositada nas trabéculas ósseas.

	O.Th / μm					
	1ª semana		2ª semana		3ª semana	
	Controle	Estimulado	Controle	Estimulado	Controle	Estimulado
	2,41	1,99	3,66	2,66	2,52	3,55
	2,17	1,95	1,78	2,87	3,21	2,98
	2,22	2,62	2,75	2,62	2,85	3,01
	2,03	2,46	2,15	4,2	4,08	2,96
	1,78	3,12	2,36	2,08	3,25	3,7
	1,84	0,3	2,56	4,07	3,48	2,94
M	2,08	2,07	2,54	3,08	3,23	3,19
DP	0,24	0,97	0,64	0,86	0,54	0,34
EPM	0,10	0,40	0,26	0,35	0,22	0,14
MIN	1,78	0,30	1,78	2,08	2,52	2,94
MAX	2,41	3,12	3,66	4,20	4,08	3,70
N	6	6	6	6	6	6
t de Student pareado	-----		----- t = -1,1 p=0,1574		----- t = 0,13 p = 0,4491	
	----- W = - 1 p = 0,5000					

Tabela 12: Separação entre as trabéculas ósseas

	Tb.sp / μm					
	1ª semana		2ª semana		3ª semana	
	Controle	Estimulado	Controle	Estimulado	Controle	Estimulado
	189,08	160,06	160,44	137	147,61	148,2
	185,31	122,56	122,21	123,41	172,48	146,89
	166,63	92,38	150,78	129,19	181,01	74,71
	169,65	53,7	353,8	172,18	252,4	144,44
	363,66	113,25	119,27	136,41	210,96	117,04
	120,25	132,7	239,97	225,06	135,39	115,68
M	199,10	112,44	191,08	153,88	183,31	124,49
DP	84,27	36,43	90,92	38,81	42,97	28,54
EPM	34,40	14,87	37,12	15,84	17,54	11,65
MIN	120,25	53,70	119,27	123,41	135,39	74,71
MAX	363,66	160,06	353,80	225,06	252,40	148,20
N	6	6	6	6	6	6
Wilcoxon	----- W = 19 p = 0,0313*		----- W = 13 p=0,1094			
t de Student pareado					----- t = 2,93 p= 0,016*	

Tabela 13: Número de trabéculas ósseas

	Tb.N / mm^2					
	1ª semana		2ª semana		3ª semana	
	Controle	Estimulado	Controle	Estimulado	Controle	Estimulado
	4,23	4,66	4,64	5,37	4,97	4,86
	4,19	5,8	5,81	5,67	4,4	5,09
	4,43	6,94	4,8	5,27	4,17	5,97
	4,61	10,79	2,52	4,52	3,21	4,78
	2,45	6,14	5,89	5,31	3,72	5,85
	5,89	5,64	3,42	3,58	4,81	5,61
M	4,30	6,66	4,51	4,95	4,21	5,36
DP	1,10	2,15	1,33	0,77	0,67	0,52
EPM	0,45	0,88	0,54	0,32	0,27	0,21
MIN	2,45	4,66	2,52	3,58	3,21	4,78
MAX	5,89	10,79	5,89	5,67	4,97	5,97
N	6	6	6	6	6	6
t de Student pareado	----- t = -2,46 p = 0,0283*		----- t = -1,20 p=0,1403		----- t = -3,36 p = 0,0099*	

6. DISCUSSÃO

A necessidade de se suprirem perdas ósseas, fisiológicas ou não, é um fator importante na cirurgia ortopédica e maxilofacial. Vários estudos foram desenvolvidos no sentido de se conseguir mecanismos adequados para reverter processos onde a perda óssea ou alterações no processo de reparo estejam comprometidos.

A partir dos estudos iniciais de LANGEVIN apud FURINI e LONGO (1996) a produção de ondas ultra-sônicas originadas de cristais piezoelétricos impulsionou um novo campo de pesquisa utilizando meios biofísicos para estimular a reparação tanto de tecido duro quanto de tecido mole. Outro fator que impulsionou a utilização de meios físicos no tratamento de fraturas, foram os trabalhos de FUKADA (1957) sobre as propriedades piezoelétricas do osso. FUKADA determinou que o osso atuava como um perfeito transdutor piezoelétrico, absorvendo impulsos elétricos e convertendo-os em estímulos mecânicos diretamente na estrutura óssea.

BENDER (1954) realizou um dos primeiros estudos sobre o efeito do ultrassom no tecido ósseo de cães. Àquela época, havia maior interesse pelos efeitos térmicos da ação do US, pois sabia-se que havia geração de calor quando da sua aplicação em tecidos vivos. DYSON (1968) realizou trabalhos testando diferentes parâmetros de intensidade ultra-sônica na cicatrização de tecido mole em coelhos. Além do benefício do tratamento na cicatrização das feridas, os resultados indicaram que os efeitos térmicos tinham menor importância no mecanismo pelo qual o US estimulava a regeneração tecidual. As evidências mostram que o aumento de

temperatura está diretamente relacionado ao aumento de intensidade da onda ultrassônica, mantendo-se o mesmo tempo de aplicação (PAYTON et al., 1975). Atualmente, sabe-se que o aumento de temperatura gerado por ondas de alta frequência e baixa intensidade, em torno de 0,75 a 3 MHz a $0,3\text{W}/\text{cm}^2$, é desprezível (FURINI e LONGO, 1996; XAVIER e DUARTE, 1983).

No nosso trabalho, apesar de não termos avaliado variações de temperatura no local de aplicação do US, três animais desenvolveram lesões de pele semelhantes a queimadura. Isso pode ser explicado possivelmente pela manipulação inadequada do cabeçote transdutor, ainda que tenha sido seguido criteriosamente os cuidados em mover o transdutor em movimentos circulares durante todo o tempo de aplicação sobre a região operada. Outra possibilidade seria uma possível variação de corrente elétrica durante a estimulação. Entretanto, ao utilizarmos um estabilizador de corrente elétrica, supomos haver controlado ou reduzido quaisquer possibilidades de variações que viessem a prejudicar o experimento. Mesmo quando em modo pulsado, podem-se desenvolver ondas estacionárias quando o transdutor é mantido numa mesma posição por muito tempo e isso pode gerar um aumento de temperatura além do esperado (FURINI e LONGO, 1996; HADJIARGYROU et al., 1998).

A partir do trabalho inicial de LANGEVIN apud FURINI e LONGO(1996) até o início da década de 80, os trabalhos publicados tinham como objetivo maior descrever os efeitos térmicos das ondas ultrassônicas como resultado de sua absorção pelos tecidos vivos (BENDER, 1954; DYSON, 1968; PAYTON, 1975).

No final da década de 70, XAVIER e DUARTE desenvolveram estudos sobre a utilização de um tipo de US em modo pulsado, gerado por cristais sintéticos de chumbo, zircônio e titânio, culminando com a publicação em 1983 de um trabalho

considerado um marco nos estudos sobre a utilização do US terapêutico no tratamento de fraturas e pseudoartroses.

Em seu trabalho pioneiro, XAVIER e DUARTE (1983) descreveram o primeiro relato da aplicação bem sucedida do US pulsado de baixa intensidade (30mW/cm^2) em humanos. A exposição do sítio de pseudoartrose a 20 minutos de US diariamente, resultou em consolidação da pseudoartrose em 70% dos casos tratados sem nenhum efeito térmico observado. Os resultados foram avaliados através de análises radiográficas seriadas ao longo do tratamento.

Desde então, diversos trabalhos foram publicados com o objetivo de mostrar a eficácia do US pulsado de baixa intensidade no tratamento de retardo de consolidação de fraturas e pseudoartroses, na aceleração no tempo de consolidação óssea e reparo de alvéolos dentários (BARROS et al., 1985; REUTER, 1987; SANTOS JR e MELHADO, 1990).

As pesquisas evoluíram inicialmente com estudos experimentais em animais, onde foram avaliados diversos modelos de falha óssea e métodos de avaliação dos resultados. BENDER (1954) utilizou perfurações monocorticais em fêmures de cães e fez avaliação histológica para observar as alterações teciduais sob a influência do US. DYSON et al.(1968) padronizaram ferimentos de tecido mole em orelhas de coelhos, submetidos a diferentes configurações de intensidade das ondas ultrassônicas. Perfurações monocorticais em tíbias de coelho têm sido utilizadas com frequência como modelo de pseudoartrose (DUARTE, 1983; BARROS et al.,1985; REUTER et al., 1987). Nesses modelos, o principal instrumento de avaliação de alterações teciduais foi o exame histológico acompanhado por exames radiográficos. Observou-se, com frequência, que o US induziu alterações benéficas no reparo

ósseo, evidenciadas radiograficamente por preenchimento da falha óssea mais precoce quando comparado ao controle (BARROS et al., 1985) e, histologicamente, pela presença de tecido fibroso com áreas de cartilagem jovem e osso neoformado de características histológicas diferenciadas (BARROS et al., 1985; REUTER et al., 1987). Embora a maioria dos trabalhos experimentais sugiram efeitos benéficos do US no reparo de fraturas em modelos animais, SPADARO e ALBANESE (1998), utilizando ratos jovens, avaliaram o efeito do US no crescimento de ossos longos e no aumento da densidade óssea. No entanto, não identificaram diferença significativa no crescimento e na densidade óssea, entre o grupo estimulado e não estimulado, indicando que a fase de crescimento não é afetada pelo estímulo ultrassônico.

No nosso estudo não observamos o preenchimento da falha óssea com osso cortical em nenhum dos períodos de avaliação, embora houvesse intensa área de reparo ósseo com alguma reorganização do trabeculado margeando as corticais adjacentes, principalmente nos animais que receberam ultrassom por três semanas. Esse resultado contrapõe-se aos achados de BARROS et al. (1985) que observaram fechamento cortical em tíbias de coelho, após quinze dias de aplicação do ultrassom e CARRO (1998) que observou fechamento da falha óssea, em modelo semelhante, submetidas ao ultrassom pulsado de baixa intensidade, embora com um período de observação mais longo, em torno de 45 dias.

Apesar da maioria dos trabalhos utilizarem defeitos de segmento em ossos longos ou perfurações monocorticais em tíbia e fíbula de coelhos e ratos, utilizou-se para este trabalho a padronização de um defeito ósseo cilíndrico de 2mm de diâmetro, realizado com brocas de titânio sob irrigação com soro fisiológico,

localizado na epífise distal do fêmur de ratos Wistar adultos. Isto foi necessário para que houvesse a possibilidade de se incluírem as peças em resina acrílica e fazer os cortes do osso de 5µm de espessura, sem danificar o tecido. A técnica da histomorfometria requer cortes tangenciais ao longo eixo do fêmur, passando pela cartilagem de crescimento epifisária, o que inviabilizaria qualquer outro modelo de falha óssea, sem o risco de comprometimento do processo de preparo das lâminas, dentro dos parâmetros estabelecidos pela nossa metodologia. Ainda, os animais deambulam normalmente logo após a cirurgia sem qualquer dispositivo de fixação óssea interna ou externa que possa interferir no processo de reparo.

Não foi encontrado, na literatura consultada, nenhum modelo semelhante de avaliação com a mesma proposição desse trabalho. Os modelos experimentais de reparo ósseo, incluem fraturas e falhas ósseas em fêmur, tibia, fibula, crânio, metatarso, rádio e ulna e na grande maioria envolvem fraturas com algum dispositivo de fixação do tipo fixador externo, pinos intramedulares e microplacas e parafusos de titânio (SCHMITZ e HOLLINGER, 1985; HOLLINGER e KLEINSCHMIDT, 1990; KLEINSCHMIDT e HOLLINGER, 1992; HIETANIEMI et al.,1995; NUNAMAKER, 1998) entretanto sem apresentar semelhança quanto ao método de preparo da peça e metodologia de avaliação.

Embora possam haver diferentes metodologias para avaliar o reparo de fraturas ósseas, a utilização da histomorfometria apresentou-se como uma opção de avaliação quantitativa do processo de remodelação do osso, possível de ser utilizada ao se criar defeitos cilíndricos na epífise femural de ratos, fornecendo informações de ordem estrutural e cinéticas não disponíveis em técnicas histológicas convencionais. O fato de ter sido utilizada a técnica semi-automática de leitura das

lâminas, o que poderia induzir a erros de observação, é minimizado pela atuação de apenas um observador, padronizando desta maneira possíveis erros de leitura e interpretação dos resultados.

ENWEMEKA (1989), sugeriu que a ondas ultra-sônicas poderiam aumentar a síntese de colágeno em tendões de coelhos. Estes, aumentaram significativamente a resistência a tração e capacidade de absorção de energia, quando submetidos ao US pulsado de baixa intensidade. Por outro lado, formação precoce de tecido de granulação, diminuição do tempo de remodelamento e aceleração do processo de cicatrização, foi atribuído ao efeito do US aplicado em alvéolos dentários pós extração de ratos Wistar, observados histologicamente (SANTOS JR. e MELHADO, 1990).

A influência do US sobre a resistência biomecânica de ossos fraturados foi estudada. A resistência máxima do calo ósseo a torção foi conseguida mais precocemente, em um fator de 1,7 vezes mais rápido, quando comparado ao controle (PILLA et al.,1990) e houve aumentos da ordem de 22% na resistência a torção (WANG et al., 1994). GUERINO et al. (1997), após a padronização de defeitos transcorticais em tíbias de ratos Wistar, submetem-nas a ensaios biomecânicos para avaliar a rigidez flexural e encontraram um aumento da ordem de 45% no grupo tratado em relação ao controle, atribuído ao aumento na mineralização do tecido ósseo. O US também foi capaz de aumentar a resistência tênsil de ferimentos de tecido mole em 24% e aumentar a deposição de colágeno em 29% quando comparado ao controle (BYL et al., 1992) concordando com os estudos prévios realizados por DYSON (1968) e ENWEMEKA (1989). Esses achados sugerem fortemente, um efeito do US sobre os fibroblastos e a síntese de colágeno.

Entretanto, YANG et al. (1996) estudando o reparo de fraturas fechadas em fêmures de rato através de análises bioquímicas, não observaram diferenças significativas no número de células e nos níveis de colágeno e de cálcio, entre o grupo estimulado e o controle, embora tenham confirmado aumento na resistência a torção. Outro dado interessante do trabalho de YANG et al. (1996), foi a avaliação da expressão de genes associados a formação de cartilagem, indicando uma agregação genética maior nas fase inicial do reparo, reduzindo substancialmente no 21º dia. Os dados sugeriram que o US estimula precocemente as proteínas da matriz extra-celular, possibilitando alterações na maturação dos condrócitos e na formação de osso endocondral.

Alguns trabalhos discorreram sobre a capacidade do US em induzir a integração de material aloplástico *in vivo*. Quando colocado DP-Bioglass (material sintético e biodegradável) em cêndilos femurais de coelhos adultos e aplicadas ondas ultra-sônicas, observou-se o aumento da reabsorção do Bioglass associado ao desenvolvimento de osteócitos dentro do material. Concomitantemente, foi observado o aumento no reparo ósseo (LIN et al.,1995).

O US mostrou ter efeito positivo na integração intra-óssea de implantes de titânio com cobertura porosa, posicionados em fêmur de cães. Após a estimulação, houve um aumento de 18% no trabeculado ósseo dentro do implante comparado ao controle contralateral (TANZER et al., 1996). Essa evidência, apesar de necessitar de maior fundamentação experimental, sugere a possibilidade de aplicação do US em cirurgias para colocação de próteses com cobertura porosa não cimentada e talvez como um fator de aceleração da integração intra-óssea de implantes dentais de titânio.

A década de 90 representou um período de investigação sobre a utilização do ultra-som terapêutico, no qual trabalhos clínicos em humanos e trabalhos *in vitro* com culturas de células foram mais enfatizados. A redução do custo do tratamento de fraturas de tíbia em humanos, foi relatado por HECKMAN e SARANSOHN (1997). Em sua investigação, os autores concluíram que o US reduziu o tempo de consolidação das fraturas. O estudo clínico de KRISTIANSEN et al. (1997) foi conclusivo em observar uma redução no tempo de consolidação de fraturas distal de rádio, comparando grupos tratados com US e placebo. Esse trabalho foi desenhado de modo, prospectivo, randomizado e multicentro o que confere credibilidade aos resultados do estudo.

Há evidências de que o US pode acelerar a cicatrização de fraturas de rádio e tíbia em pacientes fumantes, inclusive revertendo os efeitos do fumo sobre o processo de catrização (COOK et al., 1997).

A avaliação sérica de marcadores de formação e reabsorção óssea em pacientes adultos portadores de fraturas de tíbia e fixação intramedular, tratados e não tratados com US de baixa intensidade, demonstrou que o marcador para reabsorção manteve-se mais baixo em pacientes submetidos ao US do que em pacientes que receberam placebo. Não foi observada diferença nos marcadores de formação óssea entre os grupos tratado e controle, sugerindo que o US de baixa intensidade (1,5MHZ de frequência de onda, 1,0KHZ de frequência de repetição e intensidade de 30mW/cm^2) pode reduzir a reabsorção óssea, sem no entanto ter efeito na formação óssea. Esse resultado contradiz a maioria dos trabalhos clínicos que defendem o efeito benéfico do US na neoformação do osso.

Nosso estudo demonstrou que a superfície de reabsorção e o número de osteoclastos, foi diminuindo gradativamente com o tempo de observação dos animais e houve um aumento estatisticamente significativo na espessura das travessuras ósseas que coincidiu com a redução da reabsorção. Isto sugere que o ultrassom pode ter efeito reduzindo a reabsorção óssea de acordo com o tempo de aplicação, desse modo concordando com os achados de COOK et al. (1997).

Há relatos de casos de tratamentos bem sucedidos de alongamento de ossos longos, onde a aplicação do US pulsado de baixa intensidade acelerou a mineralização do calo ósseo e encurtou o período de reparação (SATO et al., 1999) e no tratamento de fraturas de mão, onde além da consolidação da fratura houve a recuperação da força de preensão (FUJIOKA et al., 2000).

Recentemente, MAYR et al.(2000) publicaram resultados de uma grande série de tratamento de retardo de consolidação e pseudoartrose de ossos longos com índice de sucesso de 91% e 86% respectivamente. Esses resultados estão de acordo com os resultados obtidos por Xavier e Duarte quando ao desenvolvimento do ultrassom pulsado de baixa intensidade para uso clínico.

Apesar de haver evidências clínicas do efeito benéfico do US pulsado de baixa intensidade no tratamento de alterações do reparo de fraturas ósseas, o mecanismo pelo qual é conseguido o efeito final não está bem estabelecido. Uma série de trabalhos tentam avaliar *in vitro* o modo como a onda ultra-sônica age a nível celular. O US pulsado parece agir no processo de ossificação endocondral na zona proliferativa da cartilagem na primeira semana de exposição (WILTNIK et al., 1995). Culturas de osso de crânio de rato submetidas ao US a $0,1 \text{ W/cm}^2$ e 3MHz, aumentaram significativamente a síntese de colágeno e proteínas não colagênicas.

Quando a intensidade foi aumentada a 2,0MHz, houve inibição da síntese de colágeno (REHER et al., 1997). Esses resultados indicam que a síntese proteica sofre algum tipo de regulação sob o efeito do US e que é dependente da intensidade utilizada.

REHER et al., (1998) e DOAN et al.,(1999) avaliaram *in vitro* o efeito do US pulsado de alta e baixa frequência sobre culturas de fibroblastos gengivais, osteoblastos mandibulares humanos e monócitos. Ondas de baixa frequência induzem igualmente a formação óssea pelo aumento da síntese de colágeno, e superam as ondas de alta frequência na indução de formação do colágeno pelo osteoblasto.

A dificuldade em correlacionar nossos resultados com os achados da literatura deve-se ao fato de não haver trabalhos semelhantes na literatura consultada avaliando os parâmetros histomorfométricos.

Nosso estudo avaliou o efeito do ultra-som pulsado de baixa intensidade em falhas ósseas padronizadas em fêmures de ratos, através da histomorfometria, e a taxa de aposição mineral dada pela marcação com tetraciclina .

Os animais que receberam tratamento com o US, elevaram o volume trabecular. Esse aumento foi significativo e se deu às custas de um número significativamente maior de traves ósseas, apresentando aumento da ordem de 54,9% na primeira semana e 21,4% na terceira semana. (Tab.13). Os animais estimulados aumentaram a remodelação óssea com aumento dos índices de formação óssea (OV/BV; OS/BS; Ob.S/BS) porém não foi significativo devido a grande dispersão dos dados. Observamos também que esse grupo aumentou a velocidade de mineralização e esses valores ficaram muito próximos da significância. Houve um

aumento estatisticamente significativo, no volume ósseo total (BV/TV) da ordem de 44,5% na primeira semana de aplicação do ultrassom.

Observamos que a mensuração da taxa de aposição mineral, é possível de ser avaliada pela dupla marcação com a tetraciclina. Em dois animais (tab.12) não foi possível determinar a dupla marcação, provavelmente por falha na administração do marcador, ou ainda por alteração no metabolismo do animal. Ainda que as marcações possam ser feitas utilizando-se a alizarina e a calceína, a metodologia utilizada no nosso trabalho, mostrou-se eficiente em evidenciar o processo de mineralização.

O estímulo de duas semanas não modificou os índices histomorfométricos, e com três semanas os animais voltaram a aumentar o volume trabecular novamente as custas de um maior número de traves ósseas e uma redução de 32% no espaço entre as trabéculas.

O US atuou também nas corticais pois elevou a sua espessura especialmente no grupo de três semanas, porém sem atingir significância no dois primeiro grupos (tab.1). Entretanto, este resultado deve ser analisado criticamente uma vez que, durante o processo de preparo das peças, há a possibilidade de distorção do osso cortical pelo micrótomo de impacto utilizado, o que poderia causar alterações na espessura cortical.

Quando os controles foram comparados nos três períodos de tempo, não observamos diferença no volume trabecular e nos índices de formação óssea. Porém a superfície de reabsorção e o número de osteoclastos foi diminuindo gradativamente sugerindo que esses parâmetros diminuem com a evolução do processo de reparo ou talvez por influência do ultrassom.

Observamos um aumento significativo das espessuras das traves que coincide com a redução da reabsorção. Houve também um aumento significativo da espessura osteóide o que talvez tenha contribuído para o aumento da espessura das traves. Foi notado uma redução progressiva da velocidade de mineralização não significativa, mas que também pode ter contribuído para o aumento da espessura osteóide.

O aumento significativo na espessura osteóide, deve ser interpretado como um efeito positivo da aplicação do ultrassom de baixa intensidade em áreas de reparo ósseo, porém maiores observações são necessárias para determinar se com a evolução do tratamento, o osteóide depositado na superfície trabecular, pode tornar-se mineralizado e contribuir para a reparação precoce da falha óssea ou de uma fratura em consolidação, ou então estacionar em determinado estágio sem beneficiar o resultado final esperado, quando da aplicação do ultrassom para o tratamento de retardo de consolidação de fraturas.

A dispersão entre os dados obtidos e o pequeno número da amostra utilizada, limitou a observação de alguns dos eventos registrados pela histomorfometria, alguns dos quais mostraram uma tendência a um resultado estatisticamente significativo, embora não confirmado (Tab.4).

A padronização de uma metodologia que possa avaliar qualitativa e quantitativamente o processo de reabsorção/formação do tecido ósseo, assim como identificar as alterações induzidas no osso em períodos evolutivos do reparo, é necessário para minimizar dúvidas quanto ao efeito do ultrassom no tecido ósseo. Há evidências de que mesmo aplicando-se ondas de baixa frequência, pode-se induzir a proliferação celular e aumento da síntese de colágeno pelos fibroblastos. Talvez uma

nova possibilidade de aplicação clínica do ultrassom, uma vez que ondas de baixa frequência tem uma capacidade maior de penetração nos tecidos biológicos.

Os resultados do nosso trabalho, sugerem que mais investigações devam ser feitas com o objetivo de determinar os reais benefícios do ultrassom pulsado de baixa intensidade em promover fechamento das corticais ósseas, aumentar a quantidade de tecido neoformado e o seu grau de mineralização, a velocidade com que isso ocorre e investigar os mecanismos celulares que se traduzam em prováveis benefícios clínicos.

7. CONCLUSÕES

1. A aplicação do US pulsado de baixa intensidade teve efeito sobre o reparo ósseo no modelo estudado.
2. A histomorfometria demonstrou alterações significativas dos índices histomorfométricos de formação óssea no grupo estimulado em relação ao grupo controle.
3. O efeito do ultrassom foi mais pronunciado na primeira semana de aplicação.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS Standard practice for choice of sample size to estimate a measure of quality for a lot or process.

Annual book of ASTM standards. V. 14.02, Philadelphia, Pa , 1989.

BARROS, J.W.; XAVIER, C.A.M.; GONÇALVES, R.P.; PAULIN, J.B.P. Efeito do estímulo do ultra-som na formação do calo ósseo em perfurações de tíbias de coelhos. **Rev. Bras. Ortop.** v.20, n. 5, p.171-76, 1985.

BENDER, L. F.; JANES, J. M.; HERRICK, J. F. Histologic studies following exposure of bone to ultrasound. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation.** p. 555-559, 1954.

BYL, N.; MCKENZIE, A. L.; WEST, J. M.; WHITNEY, J. D.; HUNT, T. K.; SCHEUENSTUHL, B. S. Low-dose ultrasound effects on wound healing: a controlled study with yucatan pigs. **Arch. Phys. Med. Rehabil.** v.73, p. 656-64, 1992.

CARRO, A. P. M. C. **Uso de matriz óssea desmineralizada associada a estimulação ultra sônica pulsada de baixa intensidade na correção de falha óssea: Estudo experimental em coelhos.** São Carlos, 1998. 49 p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos e Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

COOK, S. D.; RYABY, J. P.; McCABE, J.; FREY, J. J.; HECKMAN, J. D.; KRISTIANSEN, T. K. Acceleration of tibia and distal radius fracture healing in patients who smoke. **Clinical Orthopedics and Related research.** n. 337, p. 198-207, 1997.

COMPSTON, J. Bone histomorphometry. In: FELDMAN, D.; GLORIEUX, F. N.; PIKE, J.W. ed. **VITAMIN D.** San Diego, Califórnia, Academic Press, 1997. p. 573-86.

COMPSTON, J. Bone histomorphometry. In: ARNETT, T.D.; HERDENSON, B. ed. **Methods in Bone Biology** London, Chapman & Hall, 1998. p. 177-194.

CUNHA, A. C. **Estrutura e apresentação de dissertações e teses.** São Paulo, Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 48p., 1991.

DOAN, N.; REHER, P.; MEGHJI, S.; HARRIS, M. In Vitro effects of therapeutic ultrasound on cell proliferation, protein synthesis, and cytokine production by human fibroblasts, osteoblast, and monocytes. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery.** v.57, p. 409-19, 1999.

DUARTE, L. R. The stimulation of bone growth by ultrasound. **Archives of Orthopaedic and Traumatic Surgery.** v. 101, p. 153-159, 1983.

DYSON, M. Mechanisms involved in therapeutic ultrasound. **Physiotherapy**. v.73, n.3, p.116-120, 1987.

DYSON, M.; POND, J. B.; JOSEPH, J.; WARWICK, R. The stimulation of tissue regeneration by means of ultrasound. **Clinical Science**. v. 35, p. 273-285, 1968.

EMAMI, A.; LARSSON, A.; PETRÉN-MALLMIN, M.; LARSSON, S. Serum bone markers after intramedullary fixed tibial fractures. **Clinical Orthopaedics and Related Research**. n.368, p.220-29, 1999.

ENWEMEKA, C.S. The effects of therapeutic ultrasound on tendon healing. **Am. J. Phys. Med. Rehabil**. v.68, n.6, p. 283-87, 1989.

ERIKSEN, E. F.; AXELROD, D. W.; MELSEN, F. Bone Hystomorphometry. **American Society for Bone and Mineral Research**. ed. New York, Raven Press. 1994. 74P.

FURINI JR., N.; LONGO, G.J. **Ultrason**. Amparo – São Paulo, KLD – Biosistemas Equipamentos Eletrônicos, 1996, 51P.

FUJIOKA, H.; TSUNODA, M.; NODA, M.; MATSUI, M.; MIZUNO, K. Treatment of ununited fracture of the hook of hamate by low-intensity pulsed ultrasound: A case report. **The Journal of Hand Surgery**. v. 25, n.1, p. 77-79, 2000.

GLAZER, P. A.; HEILMANN, M. R.; LOTZ, J. C.; BRADFORD, D. S. Use of ultrasound in spinal arthrodesis. A rabbit model. **Spine**. v. 23, n.10, p. 1142-48, 1998.

GUERINO, M.R.; LUCIANO, E.; GONÇALVES, M.; LEIVAS, T.P. Aplicação do ultra-som pulsado terapêutico sobre a resistência mecânica na osteotomia experimental. **Rev. Bras. Fisiot.** v.2, n.2, p.63-6, 1997.

GUIDE FOR CARE USE OF LABORATORY ANIMALS, NNI publications n° 85-23, revisada em 1985.

HADJIARGYROU, M; MCLEOD, K.; RYABY, J. P.; RUBIN, C. Enhancement of fracture healing by low intensity ultrasound. **Clinical Orthopedics and Related research**. n. 355S, p. S216- S229, 1998.

HECKMAN, J. D.; RYABY, J.P.; McCABE, J.; FREY, J.J.; KILCOYNE, R.R. Acceleration of tibial fracture-healing by non-invasive, low-intensity pulsed ultrasound. **J. Bone J. Surg [Am]**. v.76, n.1, p. 26-34, 1994.

HECKMAN, J.D.; SARASOHN, J. K.; The economics of treating tibia fractures: the cost of delayed unions. **Bull Hosp Jt Dis**. v. 56, n.1, p.63-72, 1997.

HIETANIEMI, K.; PELTONEN, J.; PAAVOLAINEN, P. An experimental model for nonunion in rats. **Injury**. v. 26, n.10, p.681-686, 1995.

HOLLINGER, J. O.; KLEINSCHMIDT, J. C. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. **The Journal of Craniofacial Surgery.** v.1, n.1, p. 60-68, 1990.

HOLLINGER, J. O.; SCHMITZ, J. P.; MARK, D. E.; SEYFER, A. E. Osseous wound healing with xenogeneic bone implants with a biodegradable carrier. **Surgery.**, v. 107, n. 1, p. 50-54, 1990.

ISSO 10993-2: 1992 (E): Biological evaluation of medical devices; Part 2: animal welfare requirements.

HOTZ, G.; HERR, G. Bone substitute with osteoinductive biomaterials- current and future clinical applications. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 23, n. 6, p. 413-17, 1994.

KLEINSCHMIDT, J. C.; HOLLINGER, J. O. Animal models in bone research. In: HABAL, M. B.; REDDI, A. H. ed. **Bone grafts & Bone Substitutes.** Philadelphia, WB Saunders Co. 1992, p.133-146.

KRISTIANSEN, T. K.; RYABY, J. P.; McCABE, J.; FREY, J. J.; ROE, L. R. Accelerated healing of distal radial fractures with the use of specific, low-intensity ultrasound. **The Journal of Bone and Joint Surgery.** v. 79-A, n. 7, p. 961- 73, 1997.

- LIN, F.H.; LIN, C.C.; LU, C.M.; LIU, H.C.; WANG, C.Y. The effects of ultrasonic stimulation on DP-Bioglass bone substitute. **Med. Eng. Phys.** v.17, n.1, p.20-6, 1995.
- MAYR, E.; FRANKEL, V.; RÜTER, A. Ultrasound – na alternative healing for nonunions? **Arch. Orthop. Trauma Surg.** v.120, n.1-2, p. 1-8, 2000.
- MULLIKEN, J. B.; GLOWACKI, J.; KABAN, L.; FOLKMAN, J.; MURRAY, J.E. Use of demineralized allogenic bone implants for the correction of maxillocraniofacial deformities. **Ann. Surg.**, v. 194, n. 3, p.366-72, 1981.
- NARUSE, K.; MIKUNI-TAGAKARI, Y.; AZUMA, Y; ITO, M.; OOTS, T.; KAMEYAMA, K-Z.; ITOMAN, M. Anabolic response of mouse bone-marrow-derived stromal cell clone ST2 cells to low-intensity pulsed ultrasound. **Biochemical and Biophysical Research Communications.** v. 268, n.1, p.216-20, 2000.
- NUNAMAKER, D.M. Experimental models of fracture repair. **Clinical Orthopedics and Related research.** n. 355S, p. S56- S65, 1998.
- OBE, M. K. P. Applications of therapeutic pulsed ultrasound. **Physiotherapy.** v. 64, n.4, p. 103-104. 1978.

PARFITT, A. M.; DREZNER, M. K.; GLORIEUX, F. H.; KANIS, J. A.; MALLUCHE, H.; MEUNIER, P. J.; OTT, S. M.; RECKER, R. R. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. **J. Bone Min. Res.**, v. 2, p. 595-610, 1987.

PANEL ON EUTHANASIA , **J Am Vet Med Assoc** , 188: 252-268, 1988.

PAYTON, O. D.; LAMB, R. L.; KASEY, M. E. Effects of therapeutic ultrasound on bone marrow in dogs. **Physical Therapy**. v. 55, n. 1, p. 20-27, 1975.

PILLA, A.A.; MONT, M.A.; NASSER, P.R.; KHAN, A.S.; FIGUEIREDO, M.; KAUFMAN, J.J.; SIFFERT, R.F. Non-invasive low-intensity pulsed ultrasound accelerates bone healing in the rabbit. **J. Orthop. Trauma**. v.4, n. 3, p.246-53, 1990.

RAGNI, P.; LINDHOLM, S. Interaction of allogenic demineralized bone matrix and porous hydroxyapatite bioceramics in lumbar interbody fusion in rabbits. **Clinic. Orthop.**, n. 272, p. 292-99, 1991

REHER, P.; DOAN, N.; BRADNOCK, B.; MEGHJI, S.; HARRIS, M. Therapeutic ultrasound for osteoradionecrosis: na In Vitro comparison between 1 MHz and 45 Khz machines. **European Journal of Cancer**. v.34, n.12, p. 1962-68, 1998.

- REHER, P.; ELBESHIR, EL-N.; HARVEY, W.; MEGHJI, S.; HARRIS, M. The stimulation of bone formation in vitro by therapeutic ultrasound. **Ultrasound in Med & Biol.** v.23, n.8, p. 1251-58, 1997.
- REIS, L. M. **Análise histomorfométrica de biópsias ósseas de crista ilíaca em uma amostra da população normal Brasileira.** São Paulo, 1998. 69 p. Dissertação (Mestrado) – instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.
- REUTER, U.; STREMPPEL, F.; JOHN, F.; DURIG, E. Modification of fracture healing by ultrasonics in an animal model: radiologic and histologic results. **Z Exp Chir Transplant Kunstliche Organe.** v.20, n.5, p. 294-302, 1987.
- SANTOS JUNIOR, P.V.; MELHADO, R.M. Effects of ultrasonic stimulation on tooth extraction wound healing: hitological study in rats. **Rev. Odontol. Unesp.** v.19, n.1, p. 291-9, 1990.
- SANTOS NETO, F. L.; VOLPON, J. B. Experimental nonuion in dogs. **Clinical Orthopedics and Related research.** n.187, p. 260-271, 1984.
- SATO, W.; MATSUSHITA, T.; NAKAMURA, K. Acceleration of increase in bone mineral content by low-intensity ultrasound energy in leg lengthening. **J. Ultrasound Med.** v.18, n.1, p.699-702, 1999.

SCHEPERS, E. J. G.; DUCHEYNE, P.; BARBIER, L.; SCHEPERS, S. Bioactive glass particles of narrow size range: a new material for the repair of bone defects. **Impl. Dent.**, v. 2, n. 3, p. 151-56, 1993.

SCHMITZ, J. P.; HOLLINGER, J. O. The critical size defect as an experimental model for craniomandibular nonunions. **Clinical Orthopedics and Related research.** n.205, p.299- 308, 1985.

SPADARO, J. A.; ALBANESE, S.A. Application of low-intensity ultrasound to growing bone in rats. **Ultrasound Med. Biol.** n24, v.4, p.567-73, 1998.

SPECTOR, M. Anorganic bovine bone and ceramic analogs of bone mineral implants to facilitate bone regeneration. **Clin. Plast. Surg.**, v. 21, n. 3, p. 437-44, 1994.

SUN, J-S.; TSUANG, Y-H.; LIN, F-H.; LIU, H-C.; TSAI, C-Z.; CHANG, W. H-S. Bone defect healing enhanced by ultrasound stimulation: An in vitro tissue culture model. **J. Biomed. Mater. Res.** v.46, n.2, p.253-261, 1999.

TANZER, M.; HARVEY, E.; KAY, A.; MORTON, P.; BOBYN, J.D. Effect of non-invasive low-intensity ultrasound on bone growth into porous-coated implants. **J. Orthop. Res.** v.14, n.6, p. 901-6, 1996.

ter HAAR, G. Basic physics of therapeutic ultrasound. **Physiotherapy**. v.73, n.3, p.110-113, 1987.

URIST, M.R. Bone: formation by autoinduction. **Science**, v. 150, p. 893-99, 1965.

WANG, S.J.; LEWALLEN, D.G.; BOLANDER, M.E.; CHAO, E.Y; ILSTRUP, D.M.; GREENLEAF, J.F. Low-intensity ultrasound treatment increases strength in a rat femoral fracture model. **J. Orthop. Res**. v.12, n.1, p. 40-7, 1994.

WILLIAMS, R. Production and transmission of ultrasound. **Physiotherapy**. v.73, n.3, p.113-116, 1997.

WILTNIK, A.; NIJWEIDE, P. J.; OOSTERBAAN, W. A.; HEKKENBERG, R. T.; HELDERS, P. J. M. Effect of therapeutic ultrasound on endochondral ossification. **Ultrasound in Medicine & Biology**. v. 21, n.1, p. 121-27, 1995.

XAVIER, C.A.M.; DUARTE, L.R. Estimulação ultra-sônica de calo ósseo: aplicação clínica. **Rev. Bras. Ortop**. v.18, , n.3, p. 73-80, 1983.

YANG, K-H; PARVIZI, J.; WANG, S-J; LEWALLEN, D. G.; KINNICK, R. R.; GREENLEAF, J. F.; BOLANDER, M. E. Exposure to low-intensity ultrasound increases aggrecan gene expression in a rat femur fracture model. **Journal of Orthopaedic Research**. v.14, p. 802-9, 1996.