

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA e CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E HISTOMORFOMÉTRICA
DO REPARO ÓSSEO EM TÍBIAS OSTEOTOMIZADAS
DE RATOS (*Rattus norvegicus albinus*) FRENTE À
AUSÊNCIA DE CARGA E TRATAMENTO COM
ULTRASSOM**

Priscila Silvério Meira
Fisioterapeuta

Araçatuba-SP
2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA e CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E HISTOMORFOMÉTRICA
DO REPARO ÓSSEO EM TÍBIAS OSTEOTOMIZADAS
DE RATOS (*Rattus norvegicus albinus*) FRENTE À
AUSÊNCIA DE CARGA E TRATAMENTO COM
ULTRASSOM**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia – Unesp, Campus de Araçatuba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal).

Orientadora: Prof^a. Dr^a Márcia Marinho
Co-Orientador: Prof. Adj. Mário Jefferson
Quirino Louzada

ARAÇATUBA – SP
2009

Catálogo-na-Publicação (CIP)

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

M514a Meira, Priscila Silvério
Avaliação histológica e histomorfométrica do reparo ósseo em
tíbias osteotomizadas de ratos (*Rattus norvegicus albinus*) frente
à ausência de carga e tratamento com ultrassom / Priscila Silvério
Meira. - - Araçatuba : [s.n.], 2009
81 f.: il. ; tab. + 1 CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária, 2009
Orientadora: Profa. Márcia Marinho
Coorientador: Prof. Mário Jefferson Quirino Louzada

1. Simulação de ausência de peso 2. Regeneração óssea
3. Ultrassom de baixa intensidade

CDD 636.0896

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

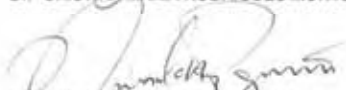
TÍTULO: Avaliação histológica e histomorfométrica do reparo osseo em
tíbias osteotomizadas de ratos (Rattus norvegicus albinus)
frente à ausência de carga e tratamento com ultrassom.

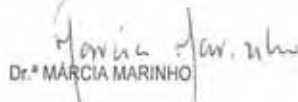
AUTOR: PRISCILA SILVÉRIO MEIRA

ORIENTADOR: Dr.ª MÁRCIA MARINHO

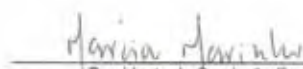
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL
(MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA E PRODUÇÃO ANIMAL) pela Comissão Examinadora.


Dr.ª CRISTINA MARIA RODRIGUES MONTEIRO


Dr. NIVALDO ANTONIO PARIZOTTO


Dr.ª MÁRCIA MARINHO

DATA DA REALIZAÇÃO: 10 de dezembro de 2009.


Presidente da Comissão Examinadora
Dr.ª MÁRCIA MARINHO
- Orientadora -

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Priscila Silvério Meira – nascida em 18 de dezembro de 1978, na cidade de Ilha Solteira – SP, formada em Fisioterapia pela Fundação Educacional de Santa Fé do Sul em 2005. Iniciou oficialmente o curso de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciência Animal pela universidade Estadual paulista “Julio de Mesquita Filho”- Unesp em 17 de março de 2008.

As palavras dos sábios devem em silêncio ser ouvidas, mais do que o clamor do que domina sobre os tolos. Melhor é a sabedoria do que as armas de guerra.
Eclesiastes 9 :17-18

*Dedico este trabalho a Deus, meu refúgio e fortaleza. Aos meus pais, **Meira e Geni**, por seu amor incondicional, por abrirem mão de seus sonhos, para sonharem os meus sonhos, por suas orações e pelas palavras de estímulo e amor. Aos meus irmãos **Fábio e Patrícia**, meus cunhados **Sergio e Priscila** e aos meus sobrinhos **Breno, Eduardo e Davi**. Família bendita, meu presente de Deus. E com imenso carinho aos meus orientadores, **Márcia Marinho e Mario Jefferson**.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, que colocou em meu coração esse sonho, capacitando e fortalecendo-me para cumpri-lo. Porque d'Ele e por Ele, e para Ele, são todas as coisas; glória, pois, a Ele eternamente, amém. (Romanos 11:36).

À minha Família, a descendência bendita do Senhor. Minha base, meu sustento, meu porto seguro.

A Unesp, Universidade Estadual Paulista, na pessoa do Senhor Diretor, Professor Dr. Pedro Felício Estrada Bernabé e a Seção de Pós Graduação – Campus Araçatuba, por fazerem parte desta fase tão importante da minha vida.

À professora Márcia Marinho, por aceitar me orientar. Obrigada pelo incentivo, confiança e ensinamentos, durante a execução desse trabalho.

Ao professor Mário Jefferson Q. Louzada, pela coorientação. Professor obrigado pela acessibilidade inicial e por me indicar os caminhos para realização deste sonho.

À Juliana Apolinário, companheira de laboratório, que juntamente com seu orientador, professor Mário Jefferson, fornecerem as amostras das tíbias, essenciais para a realização deste estudo.

Às bibliotecárias, Isabel, Fátima e Alexandra pelo sorriso e educação com que sempre me atenderam, gestos simples, mas essenciais.

Aos secretários da pós-graduação, Diogo e Valéria, pela incrível paciência, atenção e carinho dispensados. Vocês são pessoas incríveis. Obrigada por tudo.

À professora Marion e a assistente Patrícia de Athayde Barnabé, do departamento de clínica, Cirurgia e Reprodução Animal - UNESP/Araçatuba, pela indispensável ajuda na realização da análise histomorfométrica.

À professora Cristina Monteiro e a técnica Marta Paccanaro Peres, pelo carinho e ensino das técnicas envolvidas para o preparo histológico.

*Ao professor **Tetuo Okamoto**, meus sinceros agradecimentos pela ajuda nas análises das lâminas histológicas e minha admiração, por continuar o ofício do ensino, mesmo afastado oficialmente das funções de docência.*

*A professora **Silvia Helena Perri**, pela orientação e análise estatística.*

*À minha companheira, amiga e “irmã” **Bruna** (Bruca), um presente de Deus em minha vida. Amiga que encontrei no início desta jornada, e com o passar do tempo descobrimos a nossa imensa cumplicidade. O carinho, afeto e admiração cresceram, e hoje sei por vivência o significado do provérbio bíblico que diz: Em todo o tempo ama o amigo e na angústia nasce o irmão. Obrigada minha “irmã” por estar ao meu lado.*

*À **Cristiane** (Cris), amiga de graduação e pós-graduação. Não imaginei que após os nossos quatro anos de graduação em Santa Fé do Sul, compartilharia de sua amizade novamente. Mas agradeço muito a Deus pela nova oportunidade, pois pude te conhecer melhor e vivenciar contigo, momentos de alegria e companheirismo. Você é muito especial. O doutorado que nos aguarde!*

*Ao **Pedro**, técnico do laboratório de Biofísica, pelo carinho e auxílio, nas atividades diárias do laboratório, por trazer alegria e descontração aos dias de estresse e correria.*

*Ao professor e Amigo **Sérgio Diniz Garcia**. Louvo a Deus por sua amizade. Amizade essa que só cresceu durante esses anos de convivência e inúmeras caronas.*

*Ao amigo **Alexandre**, pelas palavras de incentivos, ótimos conselhos e principalmente por estar “por perto” quando precisei.*

*Ao professor **Antônio**, pelos ensinamentos e palavras de incentivo.*

*A minha Irmã em Cristo e amiga **Tercília**, pelas madrugadas de correções. Desejo toda sorte de bênção em sua vida.*

*Aos meus pastores **Valdecir** e **Susilaine** e a igreja Fonte da Vida de Birigui, pelas orações, palavras de carinho e por sonharem comigo este sonho.*

*Aos **meus amigos**, que entenderam a ausência em muitos eventos importantes em suas vidas, mas que mesmo distantes contribuíram para a concretização deste trabalho.*

*Meus agradecimentos a **todos** que direta ou indiretamente, contribuíram para a elaboração desse trabalho.*

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVO	18
3 REVISTA DA LITERATURA	19
3.1 Tecido ósseo.....	19
3.2 Reparo ósseo.....	20
3.3 Efeitos da Micro gravidade.....	21
3.4 Ultrassom.....	23
3.5 Estudos Histológicos.....	28
4 MATERIAL E METODOS	29
4.1 Respaldo ético da pesquisa.....	29
4.2 Animais	29
4.3 Grupos experimental.....	30
4.4 Cirurgia	30
4.5 Técnicas de Suspensão.....	31
4.6 Tratamentos com Ultrassom.....	33
4.7 Eutanásia.....	34
4.8 Análise Histológica.....	35
4.9 Análise Histomorfométrica	35
4.10 Análise Estatística.....	37
5 RESULTADOS	38
5.1 Histologia	38
5.1.1 Grupo 1: defeito ósseo + ultrassom + não suspensos	38
5.1.2 Grupo 2: Defeito ósseo + suspensão por 15 dia + ultrassom ...	41
5.1.3 Grupo 3: Suspensão inicial de 21 dias + defeito ósseo + ressuspensão por 15 dias + ultrassom	43

5.2 Histomorfometria.....	46
6 DISCUSSÃO.....	48
7 CONCLUSÃO	52
8 REFÊNCIAS	53
ANEXO A Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEAA)	61
ANEXO B Artigo Científico	62

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 - Modelo de suspensão pela cauda. Fonte KASPER et al. (1993)	33
FIGURA 2 - Aparelho de ultrassom (cedido pela EESC – USP).....	34
FIGURA 3 - (A) Fotomicrografia da região do Defeito ósseo. Objetiva 4. Coloração em Tricômico de Mallory (B) Fotomicrografia região do defeito ósseo após a marcação das cores pelo programa.....	36
FIGURA 4 – Fotomicrografias do G1 tratado. (A) Área total do defeito ósseo. (B) O detalhe (zoom de digital) mostra o fechamento do defeito em toda sua extensão com presença de tecido ósseo neoformado indicados pelas setas, e a cabeça de seta indica a região com ausência células e tecido em diferenciação. Coloração em Hematoxilina e Eosina. Objetiva 4.	39
FIGURA 5 – Fotomicrografias do G1 controle: (A) Área total do defeito ósseo. A seta azul indica o fechamento do defeito ósseo por delgadas trabéculas ósseas. Coloração em Hematoxilina e Eosina. Objetiva 4. Em (B) observa-se na imagem em maior aumento, as espículas ósseas indicadas pelas setas pretas. Coloração em Hematoxilina e Eosina. Objetiva 20	40

FIGURA 6 – Fotomicrografias do G2 tratado: (A) Área do defeito ósseo, totalmente preenchido por trabéculas ósseas neoformadas. Coloração em Hematoxilina e Eosina. Objetiva 4. Em (B) na imagem em maior aumento, observam-se as áreas ocupadas por estruturas com características de coágulo em degeneração. Coloração em Tricômico de Mallory. Objetiva 40.	41
FIGURA 7 – Fotomicrografias grupo G2 controle: Em (A) e (B) observa-se as extensas áreas ocupadas por coágulos sanguíneos indicados pelas setas. Hematoxilina/Eosina. Objetiva 4(zoom digital)	42
FIGURA 8 – Fotomicrografias do G3 tratado: (A) Área total do defeito ósseo. Tricômico de Mallory. Objetiva 4. Em (B), imagem em maior aumento, as setas indicam as áreas ocupadas por coágulo em degeneração e tecidos em diferenciação. Tricômico de Mallory. Objetiva 20.	44
FIGURA 9 – Fotomicrografias G3 controle: (A) Área do defeito ósseo. Tricômico de Mallory. Objetiva de 4. Em (B) As setas pretas indicam as delgadas trabéculas sendo preenchidas por coágulos sanguíneos, representado pela seta rosa. Tricômico de Mallory. Objetiva de 20.	45

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E HISTOMORFOMÉTRICA DO REPARO
ÓSSEO EM TÍBIAS OSTEOTOMIZADAS DE RATOS (*RATTUS
NOVERGICUS ALBINUS*) FRENTE À AUSÊNCIA DE CARGA E
TRATAMENTO COM ULTRASSOM.**

RESUMO: A resposta do metabolismo ósseo está diretamente relacionada a fatores hormonais e ao estímulo mecânico que o osso está exposto. A energia ultrassônica na cicatrização do reparo ósseo têm se mostrado de fundamental importância para o estímulo e melhora na qualidade do tecido neoformado durante o processo de cicatrização óssea. O objetivo deste estudo foi analisar a ação do ultrassom de baixa intensidade no reparo ósseo de tíbias osteotomizadas de ratos submetidos à suspensão pela cauda, por meio das análises histológica e histomorfométrica. Dezoito *Rattus novergicus albinus*, Wistar adultos foram divididos em três grupos, (G1, G2 e G3), dispostos da seguinte maneira: G1 (n=6), que permaneceram livres por um período de 15 dias; G2 (n=5), suspenso pela cauda por um período de 15 dias e G3 (n=7), suspensos pela cauda por um período de 36 dias. Todos os animais foram submetidos à cirurgia para confecção do defeito ósseo experimental na região medial da diáfise, em ambas as tíbias. A tíbia direita foi tratada com ultrassom pulsado (frequência de 1,5 MHz, ciclo 1:4, 30mW/cm²), por 12 sessões de 20 minutos, e o membro contralateral foi o controle. As amostras das tíbias foram submetidas à análise histológica, às cegas, com microscopia de luz comum e a análise histomorfométrica, pelo software específico Image-pro 6.1. As médias percentuais de neoformação óssea foram submetidas à análise de variância em parcela subdividida e teste de comparação múltipla “Student-Newman-Keuls” (SNK), com nível de significância de 5%. Os valores das médias e desvios padrão, da porcentagem de osso neoformado para os grupos, demonstraram uma menor quantidade no reparo ósseo do G1t(13,62 ± 4,88) - G1c (8,68 ± 4,16) quando comparado aos grupos G2t (27,17 ± 11,36) - G2c (10,10 ± 7,90) e G3t (23,19 ± 5,61) - G3c (15,74 ± 7,08). No entanto, os valores das médias e desvios padrão da porcentagem de osso neoformado do reparo nas tíbias tratadas dos G2 e G3 foram significativamente maiores quando comparados ao reparo das tíbias do grupo controle. Pelo exposto, conclui-se que o ultrassom contribuiu para acelerar o reparo ósseo, tanto na presença como na ausência de carga.

Palavras - chave: Regeneração óssea, simulação de ausência de peso, ultrassom de baixa intensidade.

HISTOLOGIC AND HISTOMORPHOMETRIC BONE HEALING IN OSTEOTOMIZED TIBIA OF RATS (RATTUS NORVEGICUS ALBINUS) GIVEN THE LACK OF LOADING AND TREATMENT ULTRASOUND

ABSTRACT: The response of bone metabolism is directly related to hormonal factors and mechanical stimulation to the bone is exposed. The ultrasonic energy on the healing of bone repair have been shown to be of fundamental importance to promoting and improving the quality of newly formed tissue during the bone healing process. The objective of this study was to analyze the action of low-intensity ultrasound on bone healing of tibial osteotomy in rats subjected to tail suspension, by means of histological and histomorphometric analysis. Eighteen *Rattus norvegicus Albinus*, Wistar rats were divided into three groups (G1, G2 and G3), arranged as follows: G1 (n = 6), who remained free for a period of 15 days, G2 (n = 5), suspended by the tail for a period of 15 days and G3 (n = 7), suspended by the tail for a period of 36 days. All animals underwent surgery to make the experimental bone defect on the medial aspect of the diaphysis in both tibias. The right tibia was treated with pulsed ultrasound (frequency of 1,5 MHz, duty cycle 1:4, 30mW/cm²), for 12 sessions of 20 minutes, and the contralateral limb was the control. Samples of tibia were subjected to histological analysis, blindly, with common light microscopy and histomorphometric analysis by specific software Image-Pro 6.1. The average percentage of new bone formation were subjected to analysis of variance in a split plot test and multiple comparison Student-Newman-Keuls (SNK), with a significance level of 5%. The mean values and standard deviations of the percentage of newly formed bone for the groups showed a smaller amount in the healing of G1T (13,62 ± 4,88) - G1C (8,68 ± 4,16) in comparison with the G2T (27,17 ± 11,36) - G2C (10,10 ± 7,90) and G3t (23,19 ± 5,61) - G3C (15,74 ± 7,08). However, the mean values and standard deviations of the percentage of newly formed bone repair in tibia treated in G2 and G3 were significantly higher when compared to repair the tibia of the control group. For these reasons, it is concluded that ultrasound has helped to accelerate bone repair in both the presence and absence of cargo.

Keywords: Bone regeneration, Low-intensity ultrasound, Simulation of weightlessness.

1 INTRODUÇÃO

Enfermidades restritivas de movimentos, traumas medulares e o envelhecimento são exemplos de patologias que frequentemente restringem o ser humano ao leito ou à diminuição dos estímulos mecânicos

A compreensão das forças que agem sobre o sistema esquelético, bem como o conhecimento de novas técnicas que proporcionem a qualidade, a integridade e a reparação deste sistema vem sendo exaustivamente estudada, entretanto, ainda permanecem com dados a serem elucidados (DOBLARÉ; GARCIA; GOMÉZ, 2004).

Diniz e colaboradores (2005), afirmam que é comum o atendimento de pessoas e animais portadores de fraturas não consolidadas ou com atraso na consolidação, devido aos inúmeros fatores que podem alterar o estado do metabolismo ósseo e consequentemente sua resposta diante de alterações fisiológicas ou patológicas. Segundo Demulder e colaboradores (1998), a remoção de carga mecânica por um período crônico, causa uma diminuição mensal de 3% a 6% na massa dos ossos sob desuso.

No entanto, em algumas situações o repouso é inevitável e muitas vezes essencial para a recuperação da fratura. Dessa forma, muito tem se pesquisado no intuito, de eliminar ou minimizar ao máximo os fatores ocasionados pelo repouso prolongado.

O ambiente de micro gravidade e situações de restrição ao leito são estudados, com o emprego de modelos de suspensão pela cauda ou elevação pelo corpo, sendo o modelo de suspensão pela cauda do animal o mais utilizado (APOLINARIO, 2008; KASPER et al., 1993; MUSACCHIA et al., 1983; RISO, 2008; SHIMANO E VOLPON, 2007; SILVA; VOLPON, 2004; VICENTINI, 2007). De acordo com um estudo feito por Morey-Holton e Globus (1998), os animais que permanecem em situações de micro gravidade simulada, utilizando o modelo de suspensão pela cauda, apresentam alterações fisiológicas semelhantes aos indivíduos ou animais expostos aos longos

períodos de restrição ao leito e vôos espaciais. Portanto, constitui-se em um modelo efetivo para avaliar os mecanismos fisiológicos e celulares do sistema músculo-esquelético, que se alteram em resposta a um novo estímulo.

Apesar dos crescentes avanços no conhecimento das alterações ósseas e nos tratamentos de fraturas completas e incompletas, há ainda um desafio às comunidades cirúrgica e ortopédica, que pouco podem fazer para aumentar a velocidade de consolidação óssea, principalmente quando a osteopenia ou osteoporose está associada à fratura (RISO, 2008).

A utilização sinérgica de recurso bioestimulante, não invasivo, na tentativa de acelerar o reparo ósseo, com a diminuição da probabilidade de complicações no processo de recuperação completa da estrutura, tem conquistado cada vez mais a credibilidade da comunidade médico-científica (LIRANI, 2004).

O uso do ultrassom de baixa intensidade na terapia regenerativa vem sendo estudado há alguns anos (YAMADA, 2003). A base fisiológica para a utilização do ultrassom como método terapêutico para o estímulo da osteogênese está fundamentada nas propriedades biomecânicas do osso (NARUSE et al., 2000). Contudo, Takikawa et al., (2001), afirmam que não estão bem estabelecidos os mecanismos específicos pelo qual a aplicação da energia ultrassônica pode induzir a osteogênese e quais os fatores extrínsecos ou intrínsecos poderiam interferir neste processo, sendo um assunto de contínua especulação científica.

São raros os trabalhos como o uso do ultrassom de baixa intensidade como fator de bioestimulação do reparo ósseo, em animais expostos a ambiente de micro gravidade simulada.

Sendo assim, os estudos relacionados à micro arquitetura óssea são importantes para o conhecimento dos fatores relacionados ao dano ósseo e à cinética do processo cicatricial, com vistas a traçar estratégias de tratamento que melhor se associem na busca da recuperação tecidual plena e precoce.

2 OBJETIVO

O presente trabalho tem os seguintes objetivos:

- a) Analisar a ação do ultrassom de baixa intensidade no reparo ósseo de tíbias osteotomizadas;
- b) Analisar a ação do ultrassom de baixa intensidade no reparo ósseo de tíbias osteotomizadas de ratos suspensos pela cauda por um período de 15 dias;
- c) Analisar a ação do ultrassom de baixa intensidade no reparo ósseo de animais previamente suspensos por 21 dias, submetidos à osteotomia e novamente suspensos por mais um período de 15 dias;
- d) Analisar se a suspensão pela cauda influencia no reparo ósseo, quando associado ao ultrassom de baixa intensidade.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Tecido ósseo

O osso é um tecido vivo que se renova permanentemente durante a vida toda (GUYTON; HALL, 1997). O tecido ósseo é constituído por um tipo de tecido conjuntivo formado por células e matriz extracelular. São necessárias pelo menos três células especializadas no osso para a síntese, modelagem e remodelagem desse tecido: os osteoblastos, os osteócitos e os osteoclastos.

Os osteoblastos são células ramificadas responsáveis pela atividade de formação óssea, que sintetizam a parte orgânica da matriz óssea; os osteócitos são células achatadas, encontradas no interior da matriz extracelular, essenciais para a manutenção e atividade da matriz óssea, e os osteoclastos células grandes e extensamente ramificadas, que juntamente com os osteoblastos participam da rotatividade e remodelação constantes do osso (GUYTON; HALL, 1997; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; YOUNG; HEATH, 2000). A matriz óssea é constituída por uma parte inorgânica, que representa cerca de 70% do peso seco do osso, composta de fosfato de cálcio e carbonato de cálcio. Esses minerais estão presentes principalmente em forma de pequenos cristais de hidroxiapatita, fosfato amorfo entre outros, conferindo ao osso sólida resistência às forças de compressão. Os outros 30% da matriz óssea é composta da parte orgânica, formada em sua maioria por fibras colágenas (colágeno tipo I) e por uma pequena quantidade de proteoglicanas e glicoproteínas adesivas, dando ao osso sua flexibilidade e elasticidade (NORDIN; FRANKEL, 2000; MOTTA, 1996).

A superfície externa do osso é revestida por uma densa camada fibrosa chamada perióstio e as superfícies internas revestidas por uma camada delicada chamada endóstio. O endóstio e perióstio contêm células osteogênicas responsáveis pelo crescimento, remodelagem contínua e reparo

das fraturas ósseas (GUYTON; HALL, 1997; YOUNG; HEATH, 2000).

De acordo com Nordin e Frankel (2001), histologicamente existem dois tipos de ossos: o osso lamelar e o não lamelar. O tecido ósseo primário ou não lamelar é menos mineralizado, sendo considerado osso imaturo. Esse tipo de osso é encontrado na região da metáfise de ossos em crescimento e em calo de fratura, bem como em algumas patologias ósseas. No adulto é pouco frequente, persistindo apenas próximo às suturas dos ossos do crânio, alvéolos dentários e em alguns pontos de intersecção de tendões. O tecido ósseo secundário ou lamelar substitui o osso não lamelar e é geralmente encontrado no adulto (FORTIER, 2005).

Segundo Young e Heath (2000) o tecido ósseo pode ser classificado em osso cortical, formador da parte externa ou córtex do osso, composto por uma estrutura densa que envolve os ossos trabeculares. Estes, por sua vez, são ossos semelhantes a uma malha frouxa composto por finas placas ou trabéculas. A quantidade relativa de cada tipo de osso, o número, a espessura e orientação das trabéculas ósseas dependem das forças as quais o osso está exposto (NORDIN; FRANKEL, 2001; YOUNG; HEATH, 2000).

Em inúmeras situações, o tecido ósseo possui capacidade de se restabelecer. Entretanto, falhas de vascularização e instabilidade mecânica podem influenciar na extensão, velocidade e na qualidade do reparo, dificultando ou até mesmo impedindo o reparo ósseo adequado (PINHEIRO: GERBI et al., 2006).

3.2 Reparo ósseo

O osso é um material vivo que está rotineiramente exposto a ambientes que desafiam a sua integridade estrutural (DOBLARÉ; GARCIA; GOMÉZ, 2004). O fenômeno da regeneração óssea é altamente complexo e compreende uma série de mecanismos sucessivos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Sempre que a continuidade de um osso é interrompida, seja por uma

lesão traumática, patológica ou cirúrgica, imediatamente se estabelece uma sequência de reações com objetivo de preencher o espaço da lesão. Comumente, quando ocorre uma fratura há laceração do periósteo e do endósteo e os vasos sanguíneos do osso e dos tecidos moles adjacentes se rompem, ocorre o extravasamento de sangue e formação de um coágulo ou hematoma dentro e ao redor do local da fratura e, imediatamente, o osso adjacente, por lesão indireta, torna-se necrótico (CARANO; FILAROFF, 2003; DOBLARÉ; GARCIA; GOMÉZ, 2004).

Nos estágios iniciais de uma inflamação aguda, o coágulo sanguíneo ainda pode ser reconhecido entre as cavidades medulares e entre as extremidades fraturadas, atuando como um arcabouço de fibrina que facilita a migração das células de reparação. Posteriormente, este coágulo será substituído por tecido de granulação que se tornará progressivamente mais fibroso (BARR; BARBE, 2004; DOBLERÉ, GARCÍA; GOMÉZ, 2004; YOUNG; HEATH, 2000). Simultaneamente, as células osteogênicas do endósteo também se proliferam, desenvolvendo um anel ou um colar conjuntivo ao redor dos fragmentos, denominado calo ósseo. O calo de fixação (externo) é o calo que se forma ao redor das extremidades, enquanto o calo de ligação (interno) é aquele que se forma entre os fragmentos ósseos (DOBLERÉ, GARCÍA; GOMÉZ, 2004; CHAKKALAKAL et al., 1999).

O formato do osso é remodelado de forma a permitir a funcionalidade e restaurar a resistência normal ou pelo menos próxima da normal (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

3.3 Efeitos da Micro gravidade

O tecido ósseo é altamente evoluído. Sua rigidez e resistência devem-se a alta impregnação mineral de uma matriz osteóide, onde os minerais do osso depositam-se sob forma de milhares de micro cristais em uma estrutura entrelaçada definida. Por se tratar de um tecido auto reparador, suas

propriedades e sua geometria são alteradas em resposta às mudanças na demanda mecânica, adotando uma disposição atômica em relação às tensões ou estímulos mecânicos a que está submetido o osso (NORDIN; FRANKEL, 2001; LIRANI, 2004). Segundo Guyton e Hall (1997), a deposição de osso é parcialmente regulada pela quantidade de tensão imposta ao osso. Ossos com maior tensão e maior curvatura apresentam osteoblastos mais ativos, e assim, ossos mais fortes e mais resistentes, enquanto os ossos não submetidos à tensão, como os ossos de uma pessoa ou animal acamado tornam-se mais fracos. Além disso, a remodelagem segundo Douglas (2006) é igualmente controlada e ajustada por fatores hormonais entre outros.

No entanto, segundo Carvalho e Cliquet (2001) a redução na massa óssea está associada à perda de sua estrutura e consequentemente a diminuição da força óssea. Sendo assim, a hipoatividade provoca reduções significativas nas propriedades mecânicas do osso, levando ao seu enfraquecimento (SHIMANO E VOLPON, 2007; SILVA; VOLPON, 2004).

Johnson (1998), afirma que períodos de sete ou quatorze dias de ausência de contato com o solo são suficientes para promover alterações ósseas, principalmente naqueles que servem de apoio para o peso corporal como, por exemplo, o fêmur e a tíbia.

Em estudo realizado por Silva e Volpon (2004), utiliza-se um modelo de suspensão de rato pela cauda, visando simular as alterações no esqueleto que ocorrem em um ambiente de micro gravidade, observou-se que a hipoatividade provoca reduções significativas nos valores da maioria das propriedades mecânicas no osso, levando ao seu enfraquecimento.

Abram et al. (1998), investigaram as mudanças histomorfométricas e mecânicas do osso em membros posteriores de ratos, utilizando o teste de flexão e torção em fêmures intactos, com o peso simulado, por períodos de uma, duas e três semanas. O grupo experimental exibiu baixa densidade e menores propriedades mecânicas em consequência da hipotrofia estrutural.

Em medicina veterinária, o emprego deste modelo, é útil para compreender o processo de consolidação óssea em animais traumatizados nos

membros pélvicos, que permanecem imobilizados e sofrem alterações da microarquitetura óssea (VICENTINI et al., 2007).

3.4 Ultrassom

Entre as diversas áreas relacionadas à medicina, a literatura revela que os estudos direcionados à consolidação óssea, ganham cada vez mais destaque, principalmente no que se refere à diminuição do tempo de reparo (CROCI et al., 2003).

Estudos direcionados sobre a consolidação óssea de fraturas na ortopedia veterinária e humana são importantes, em virtude da dificuldade de se promover um pós-operatório adequado aos pacientes e, dessa forma impedir sobrecarga precoce do osso fraturado mesmo após a osteossíntese (MORAES et al., 2007). Dentre os recursos disponíveis para o tratamento de lesões, a utilização de terapias alternativas não invasivas, como a energia ultrassônica na cicatrização tecidual, tem se mostrado de fundamental importância para o estímulo da preservação das funções fisiológicas, da estrutura celular e para a melhora na qualidade do tecido neoformado (YAMADA, 2003).

O osso é um material piezelétrico e está sujeito a cargas mecânicas como o próprio peso do corpo do indivíduo e a deambulação. Para todos estes estímulos, o osso tem uma resposta elétrica que aciona a divisão celular, mantendo o equilíbrio entre remodelamento e reabsorção. Diante de uma lesão, o foco da fratura encontra-se com diminuição da vascularização e/ou insuficiência do potencial elétrico. Considera-se que estímulos na região da lesão ocasionam o aumento do potencial elétrico, pela capacidade piezelétrica do osso, e o aumento fluxo sanguíneo local. Assim, a presença de cargas elétricas no osso é vital para o desenvolvimento e para o reparo ósseo (DUARTE; XAVIER, 1983).

De acordo com a lei de Wolff, a carga mecânica promove deformação no

osso e, conseqüentemente, gera um estímulo para uma resposta óssea local. O ultrassom é uma forma de energia mecânica transmitida por ondas de pressão acústica de altas freqüências, acima de 16 KHz. Esta energia é transmitida por movimentos das partículas no meio pelo qual a onda se propaga, sendo necessário para isso um meio elástico (Ter HARR, 1987).

O aparelho de ultrassom consiste de um gerador que produz uma corrente alternada de alta freqüência que é convertida por um transdutor em vibrações mecânicas ou acústicas. O transdutor, que é constituído basicamente por um cristal (elemento piezelétrico) introduzido entre dois eletrodos, faz a conversão da voltagem alternada de alta freqüência (energia elétrica) em vibrações mecânicas (energia acústica) pela inversão do efeito piezelétrico. É uma corrente alternada que flui através de um cristal piezelétrico, produz contrações e expansões deste cristal e a transmissão ocorre pelas vibrações das moléculas do meio através do qual a onda se propaga (XAVIER; DUARTE, 1983). Este meio irradiado oscila ritmicamente com a freqüência do gerador ultrassônico por efeito piezelétrico ao comprimir e expandir a matéria (GUIRRO et al., 1995). As deformações micro mecânicas ocorridas no tecido ósseo, por ação do ultrassom, são similares àquelas ocorridas sob carga mecânica e passam agir como sinalização para a formação de tecido ósseo.

Duarte (1983) demonstrou a aceleração do processo de reparo ósseo, utilizando o ultrassom de baixa intensidade, na freqüência de 1,5MHz (30mW/cm² SATA), com intervalos de 200µs, freqüência de repetição de 1 KHz e ciclo de trabalhos de 20% (1:4), como um método não invasivo em osteotomias de fíbulas e em perfurações nos fêmures de coelhos. O ultrassom foi aplicado durante 4 a 18 dias, com um tempo de aplicação de 15min/dia. As análises radiográficas e histológicas demonstraram nos ossos osteotomizados um aumento do calo ósseo após 10 e 12 dias de tratamento, estabilizando após esse período, ao contrário do grupo controle que apresentou nos primeiros 10 a 12 dias um lento aumento do calo ósseo. Nas radiografias, foi possível observar a formação mais rápida do calo ósseo nos membros tratados, quando comparados aos controles.

Carvalho e Cliquet (2003), analisaram a ação do ultrassom pulsado de baixa intensidade, 30mW/cm², frequência de repetição de 1 kHz e ciclo de trabalho de 20 %, durante 20 dias consecutivos, por 20 minutos diários, como método não invasivo, em modelo de ratas osteopênicas. A estimulação ultrassônica foi realizada na região proximal dos fêmures, bilateralmente. Apesar dos resultados quantitativos do conteúdo mineral ósseo (cálcio e fósforo) não terem demonstrado diferenças significativas entre os grupos tratados e controles, as investigações histológicas mostraram que o fêmur tratado apresentou uma menor deterioração micro arquitetural que o grupo não tratado, além da ocorrência de neoformação óssea, a qual não foi observada no grupo não tratado. Os resultados sugerem que o ultrassom pulsado de baixa intensidade pode interferir positivamente sobre a osteoporose.

Em um estudo utilizando o modelo experimental de não união de fraturas em tíbias de ratos, Takikawa e colaboradores (2001) submeteram esses animais ao tratamento com ultrassom de baixa intensidade, em sessões de 20 min./dia para acelerar o processo de reparo ósseo. Após seis semanas de tratamento diário, 50% das fraturas tratadas foram consolidadas, enquanto nenhuma fratura do grupo controle obteve cura.

Santos et al. (2005) avaliaram a influência da aplicação de ultrassom (forma contínua e pulsada) em epífises de tíbias de coelhos em crescimento, para identificar doses que provocassem alterações macro e/ou microscópicas, e prejudica-se o crescimento ósseo normal. Foram utilizados 32 coelhos com oito semanas de idade, divididos em três grupos, nos quais se aplicou, na face medial da extremidade superior da tíbia direita, ultrassom pulsado e contínuo em diferentes áreas e intensidades de radiação; as tíbias esquerdas nos três grupos foram utilizadas como controle. Fêmures e tíbias de todos os animais foram radiografados dois dias antes da primeira aplicação e ao completarem 16 semanas. A análise histomorfométrica demonstrou que no grupo 1, grupo que recebeu ultrassom pulsado, não houve diferença estatisticamente significativa no lado direito em relação ao esquerdo. O mesmo não ocorreu com os grupos 2 e 3 (tratados com ultrassom contínuo), que apresentaram alterações

histomorfométricas e radiográficas. Concluíram que, em coelhos, o tratamento no modo pulsado em 20% a 2 W/cm² (ISATP) não tem efeito lesivo na epífise de crescimento ósseo.

Gonçalves et al. (2007) avaliou histologicamente os efeitos do ultrassom de baixa intensidade no processo em reparo de defeitos ósseos realizados experimentalmente no colo do côndilo de ratos (n = 40). Os animais foram separados em dois grupos: grupo controle e experimental, distribuídos nos seguintes períodos de observação 7, 15, 30 e 45 dias. Foi criado um defeito ósseo no colo do côndilo em todos os ratos. Após 24 horas da cirurgia, o grupo experimental foi estimulado com ultrassom de baixa intensidade pelo período de 20 minutos por dia. Os resultados demonstram que na região do defeito ósseo, tratado com ultrassom, ocorreu aceleração de neoformação óssea e proliferação angioblástica, fibroblástica e osteoblástica, maiores que no grupo controle.

Apolinário (2008) verificou o efeito do ultrassom no defeito ósseo, criado experimentalmente, em tíbias de ratos sob ausência de carga (suspensão pela cauda) por meio de análise densitométrica e biomecânica. Foram utilizados 30 ratos adultos divididos em três grupos. Os animais foram submetidos à osteotomia em ambas as tíbias e à aplicação do ultrassom com frequência de 1,5 MHz, ciclo 1:4, 30 mW/cm² na tíbia direita, aplicações diárias de 20 minutos cada, até completarem 12 sessões. O conteúdo mineral ósseo, área e densidade mineral óssea, não demonstraram diferenças significantes quando comparados ao grupo controle.

Jorge (2004) investigou a influência da estimulação ultrassônica de baixa intensidade no processo de reparo ósseo em fraturas de tíbias tratadas por meio da fixação flexível. Na avaliação das propriedades mecânicas torque máximo e rigidez não foram observadas diferenças significativas entre os grupos estimulados e controle.

Ao estudar os efeitos do ultrassom de baixa intensidade na região distal do fêmur e proximal da tíbia de ratas ovariectomizadas, Warden (2001), utilizou os seguintes parâmetros 30mW/cm² de intensidade, 200μs de largura,

frequência fundamental de 1,0MHz subaquático. Os animais foram tratados durante 12 semanas. As análises por densitometria de dupla energia de raios (DXA) e histomorfometria mostraram que a ovariectomia resultou em mudanças ósseas significativas, mas o ultrassom não influenciou essas mudanças.

Kristiansen et al. (1997), em estudo clínico multicêntrico, prospectivo, randomizado e duplo-cego com controle placebo, testaram a eficácia do ultrassom pulsado de baixa intensidade na redução do tempo de cura de fraturas de rádio tratadas com manipulação e gesso. Trinta pacientes receberam o tratamento que teve início sete dias após a fratura, e foi realizado por 20 minutos diários por dez semanas. O grupo controle recebeu tratamento placebo. O tempo de reparo, em dias, foi significativamente menor no grupo tratado (61 ± 3), comparado ao grupo placebo (98 ± 5).

A atuação do ultrassom tem sido demonstrada também em estudos utilizando intensidades de 30 mW/cm² em culturas de osteoblastos de camundongo, a fim de verificar sua influência na prostaglandina E₂. A exposição do ultrassom provocou um aumento na síntese de prostaglandina E₂, considerado um regulador importante da formação óssea (KOKUBO et al., 1999).

Naruse et al. (2000), investigaram células ST2, originadas do estroma medular, sob os efeitos da estimulação ultrassônica de baixa intensidade, com frequência fundamental de 1,5 MHz, frequência de pulso de 1,0 KHz. Observaram que essas células responderam com níveis elevados de mRNAs de fator de crescimento insulina (IGF), osteocalcina, sialoproteína óssea e também houve aumento da expressão transitória de mensageiro de ciclooxigenase – 2. Esses resultados forneceram subsídios para os autores sugerirem que o ultrassom induz uma reação anabólica de células osteogênicas, e formação da matriz óssea.

3.5 Estudos histológicos

Embora a massa óssea seja o principal determinante da resistência mecânica do osso, ela implica somente entre 30 a 40% dessa característica (CORTET; MARCHANDISE, 2001). Segundo Revell (1983), a quantidade de tecido ósseo, as características micro estruturais, o arranjo espacial, as formas e preservação das conexões ósseas são fatores determinantes para a competência e resistência ósseas.

Estudos densitométricos demonstram quantitativamente o tecido ósseo e sua evolução. Porém, a análise micro anatômica é considerada uma investigação mais precisa para observar alterações estruturais ósseas (GAMEIRO; SCHOTT, 2006).

Sendo assim, a micro arquitetura é um elemento importante do osso e contribui para a sua qualidade, integridade e competência mecânica. A avaliação da micro arquitetura pode ser útil para o diagnóstico do risco de fratura, a qualidade do reparo ósseo, como também os mecanismos de ação de drogas (DOBLARÉ; GARCIA; GOMÉZ, 2004).

Na última década diversos métodos foram elaborados e aplicados para avaliar esta propriedade específica do osso. Utilizando desde a tradicional histologia quantitativa, como também as recentes aplicações da tomografia computadorizada e ressonância magnética (CARBONERE et al., 2005). A histologia é um método considerado descritivo, no entanto, uma abordagem quantitativa, às vezes é necessária, principalmente para as patologias e alterações ósseas. Sendo assim, o estudo da morfometria óssea, é um importante aliado no conhecimento de determinados distúrbios metabólicos e seus tratamentos (REVELL, 1983).

Nesse sentido, os exames histológicos e histomorfométricos são análises importantes que permitem o conhecimento quantitativo da estrutura óssea, bem como a distribuição dos componentes morfológicos (MARINO et al., 2003).

4 MATERIAL E MÉTODO

O presente estudo visa dar prosseguimento à pesquisa que foi desenvolvido junto ao Laboratório de Biofísica da Faculdade do curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista - Unesp / Campus de Araçatuba, sob a responsabilidade do Prof. Adj. Mário Jefferson Quirino Louzada, que gentilmente cedeu as amostras para as análises histológica e histomorfométrica.

4.1 Respaldo Ético da Pesquisa

O presente estudo foi submetido à apreciação e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Unesp – Campus de Araçatuba - Protocolo nº 2007-002868 (Anexo A).

4.2 Animais

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus albinus*), machos, adultos da raça Wistar, de massa corporal média (348 ± 14 g), provenientes do biotério da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista - Unesp / Campus de Araçatuba - SP.

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Biofísica da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista - Unesp / Campus de Araçatuba – SP. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno padrão, em ambiente de acesso restrito com temperatura controlada de 23°C, com iluminação em ciclo claro/escuro de 12 horas, com água e ração balanceada para rato (Primor[®]) *ad libitum*. As gaiolas eram lavadas em dias alternados para a troca de maravalha.

4.3 Grupo experimental

Os animais foram distribuídos aleatoriamente, por meio de sorteio simples, em três grupos experimentais conforme o tipo de tratamento:

Grupo 1 (G1): constituído de 6 animais. Os animais foram submetidos à cirurgia para a realização do defeito ósseo e permaneceram livres em gaiolas individuais por um período de 15 dias.

Grupo 2 (G2): constituído de 5 animais, submetidos à cirurgia para realização do defeito ósseo e suspensão pela cauda por um período 15 dias.

Grupo 3 (G3): constituído de sete animais, submetidos inicialmente a suspensão por 21 dias. Após esse período, foi feita a cirurgia para a realização do defeito ósseo e, posteriormente, suspensa novamente por mais 15 dias

Em todos os três grupos, ambas as tíbias foram submetidas à criação do defeito ósseo. O membro contralateral foi utilizado como controle, sendo apenas o membro direito submetido ao protocolo de tratamento com ultrassom (US).

4.4 Cirurgia

Os animais foram pesados e anestesiados com a associação de Ketamina e Xilazina nas doses 100 mg/Kg e 10 mg/Kg respectivamente, via intraperitoneal. Após a comprovação da anestesia, os animais foram colocados em decúbito dorsal, com ambos os membros em rotação externa de quadril e tríplice flexão (quadril/joelho/tornozelo). Procedeu-se a tricotomia sobre a superfície ântero-posterior na região medial da diáfise da tíbia direita e esquerda e assepsia da região com iodopovedina. Foi realizada uma incisão

linear no sentido longitudinal do membro posterior. Os músculos foram afastados para permitir o acesso à tíbia. A tíbia contralateral também foi osteotomizada, para ser o membro controle.

Para confecção do defeito ósseo, utilizou-se uma broca esférica de aço comum de 22 mm de comprimento, número 6 para contra-ângulo, acionado por um motor de baixa rotação (1.500 rpm). O defeito ósseo foi criado com a broca mantida na posição horizontal e perpendicular em relação ao eixo longitudinal do osso, passando pela cortical, danificando o canal medular, ou seja, atingindo o endósteo, mas sem romper a outra cortical na face contralateral, promovendo-se ao final um defeito de 4x2 mm. Durante todo o procedimento, a tíbia foi irrigada com soro fisiológico na pressão manual.

Finalizando, o tecido muscular foi reposicionado e a pele suturada com fio de seda montado em agulha 4-0 (Johnson & Johnson®), com suturas interrompidas simples. Feito a limpeza local com iodopovedina. Durante o pós-operatório foi ministrado aos animais Buprenorfina, (0,02 mL/Kg peso vivo de 12/12 horas) pela via subcutânea e Pentabiótico (0,035mL/Kg peso vivo), via subcutânea, dose única.

4.5 Técnica de Suspensão

Os procedimentos para suspensão foram baseados na técnica de Riso (2008). Para a preparação da cauda no processo de instalação da suspensão, os animais do grupo G2 e G3 foram anestesiados com a associação de ketamina e xilazina nas doses de 30 mg/Kg e 3 mg/Kg respectivamente, via intramuscular. Posteriormente a assepsia da cauda com sabonete líquido anti-séptico, foi aplicado iodopovedina por toda extensão do tecido caudal. Em seguida, a cauda foi envolvida por espuma adesiva (Reston®) desde sua origem até os dois terços proximais, com o objetivo de proteger o tecido e evitar fraturas e lesões cutâneas. Sobre a espuma adesiva foi aplicada uma bandagem elástica denominada Coban® (modelo 1582 da marca 3M®) que foi

tencionada homogeneamente envolvendo toda a espuma. Sobre o envoltório da tira elástica foi colocada uma fita de cadarço sarja que foi fixado por enfaixamentos adicionais de bandagem elástica e de esparadrapo, de modo a formar uma alça que serviu para conectar o animal ao sistema de suspensão por meio de uma presilha metálica. A região distal da cauda não enfaixada foi amputada para evitar a necrose da região (SILVA E VOLPON, 2004). Após os procedimentos de preparação da cauda foi aplicado Banamine® (analgésico, antiinflamatório e antitérmico) subcutâneo na dose de 2,5 mg/Kg. Esta aplicação foi realizada a cada 12 horas por um período de três dias consecutivos (RISO, 2008).

O sistema de suspensão constou de uma gaiola comum, única, onde foi instalado o sistema de fixação e suspensão do animal. O sistema de fixação foi composto por:

- Uma presilha que serviu de encaixe da alça que fez parte do sistema de acoplamento do animal;
- Haste rosqueada de aço retilínea com 40 cm de comprimento e 4,5 mm de diâmetro;
- Arruelas presas por duas porcas próximas à presilha, para delimitar o espaço de movimentação do animal no interior da gaiola, com limite de curso para movimentação de 5 cm.
- Porcas sextavadas;
- Porcas borboleta e arruelas para fixação da haste na grade da gaiola;

A haste foi colocada transversalmente na região superior da gaiola. A alça da cauda do animal foi presa na presilha do sistema de suspensão e logo após, regulada a altura do animal para que seus membros pélvicos ficassem totalmente suspensos. Após esta verificação, fixou-se a haste nas grades pelas porcas borboletas. A estrutura da gaiola permitiu aos animais livre movimentação com os membros dianteiros, mantendo os membros pélvicos suspensos sem apoio no piso da gaiola ou nas paredes laterais, mantendo o animal, visualmente inclinado aproximadamente 30 graus em relação ao assoalho (Figura 1). No assoalho da gaiola foram colocados ração e

maravalha. A higienização foi realizada a cada 3 dias para a substituição da maravalhas. Os animais tiveram acesso a água e ração e puderam se movimentar.

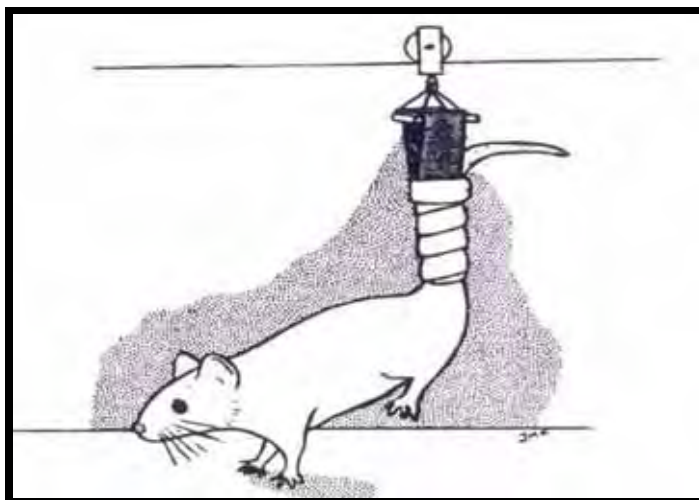


FIGURA 1- Modelo de suspensão pela cauda. Fonte KASPER et al. (1993).

4.6 Tratamento com Ultrassom

O aparelho de ultrassom foi fornecido pelo departamento de Bioengenharia da Universidade de São Paulo (USP) - Campus de São Carlos (Figura 2), com um transdutor de PZT (titânio zirconato de chumbo), com ondas ultrassônicas com frequência fundamental de 1,5 MHz, largura de pulso de 200 μ s, ciclo de trabalho 1:4, e intensidade espacial e temporal média (SATA) de 30mW/cm².



FIGURA 2- Aparelho de ultrassom (cedido pela EESC – USP).

O tratamento teve início 24 horas após a realização do defeito ósseo. Após delimitar a região do defeito ósseo o ultrassom foi aplicado de forma local, movimentando-se o cabeçote de maneira lenta e circular, utilizando-se gel hidrossolúvel, como meio condutor. O tempo de aplicação foi de 20 minutos/dia perfazendo um total de 12 sessões (DUARTE, 1983). A estimulação ultrassônica foi realizada na tíbia direita de cada animal.

4.7 Eutanásia

Os animais foram anestesiados com Ketamina e Xilazina e a eutanásia foi realizada com Pentobarbital na dose 1,5 mL via intravenosa. Após a dissecação, os ossos foram envolvidos em gaze umedecidas em soro fisiológico e estocados em “freezer” (-20° C), para posteriores análises.

4.8 Análise Histológica

No momento das análises, as amostras foram descongeladas em temperatura ambiente e encaminhadas ao Laboratório de Patologia da Santa Casa Saúde de Araçatuba/SP.

Para confecção das lâminas seguindo o protocolo para tecido ósseo descalcificado, as tíbias foram fixadas em paraformaldeído 4% tamponado, Fluka® por 24 horas e descalcificadas em EDTA a 10% até atingirem o ponto de corte. Foram processadas no auto-processador Shandon Elliott®, modelo Duplex Processer, durante 13 horas, seguindo uma escala álcool, xilol e incluídas em parafina, por meio do auto inclusor, Reichert-Jung®, modelos 8044. Foram realizados cortes seriados com espessura de 5 µm (micrômetros) na região do terço médio por meio do micrótomo American Optical®, modelo 820. Aplicaram-se aos cortes a técnica de coloração de Hematoxilina/ Eosina (HE) para a análise morfológica e o tricômico de Mallory (TM) para a análise morfométrica.

Após o processo o processo histológico, as lâminas foram examinadas (às cegas), sob microscopia de luz no microscópio Opton – TIM – 2005 - B^{®1}. A região do defeito ósseo foi localizada, avaliada e descrita as características das trabéculas ósseas e a remodelação do tecido.

4.9 Análise Histomorfométrica

Para a análise histomorfométrica as lâminas foram fotografadas no microscópio Olympus BX-50[®] (objetiva de 4X) e as imagens capturadas pelo programa DPZ-BSW. Foram submetidas à padronização do programa específico Image - pro 6.1, que utiliza cores diferentes para as áreas a serem analisadas. A No presente estudo utilizamos vermelho para as áreas com trabécula óssea e amarelo para áreas em branco e ou tecidos pouco diferenciados (Figura 3). Após a marcação das cores, o software quantifica

¹ Processo FAPESP 07/54443-0

percentualmente a área correspondente de tecido neoformado em relação à área total de tecido presente na região do defeito. (COLUCCI, 2002). Após a delimitação da área na parte interna do defeito ósseo, foram avaliados em média 5 campos ou até que se completasse a leitura de toda a região do defeito. A média da soma dos campos foi utilizada para a análise estatística.

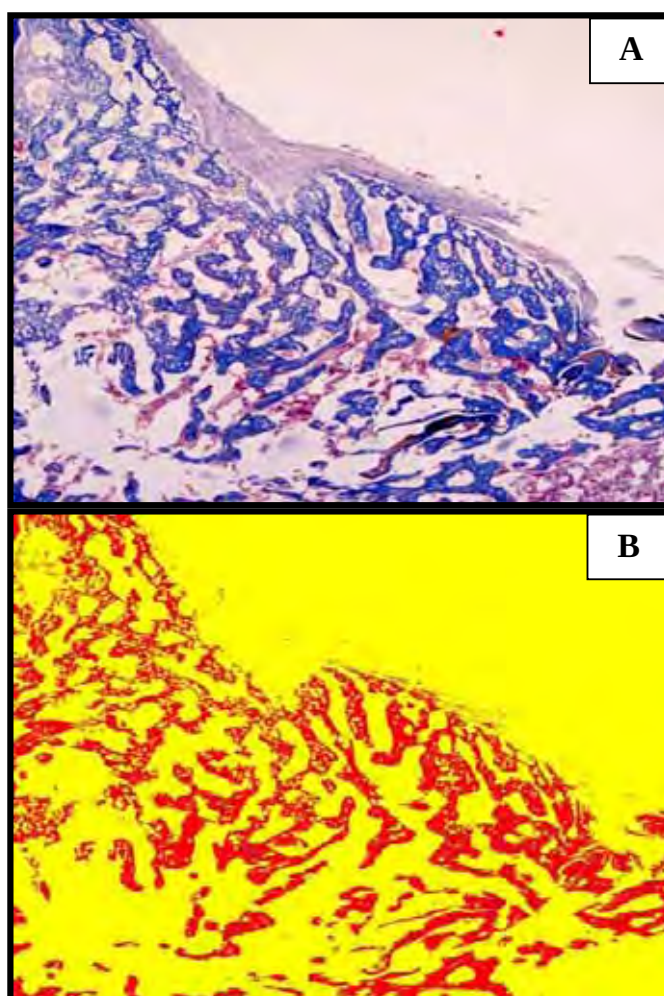


FIGURA 3 - (A) Fotomicrografia da região do Defeito ósseo. Objetiva 4 . Tricômico de Mallory.
(B) Fotomicrografia região do defeito ósseo após a marcação das cores pelo programa.

4.10 Análise Estatística

Os dados obtidos foram tabulados e submetidos à análise estatística. As médias percentuais de neoformação óssea foram submetidas à análise de variância em parcela subdividida e ao teste de comparação múltipla “Student-Newman-Keuls” (SNK), com nível de significância de 5%. Para o processamento e análise destes dados foi utilizado o “software” estatístico “Statistical Analysis System” (SAS²).

² SAS INSTITUTE. Version 9.1.3, Cary, NC: SAS Institute, 2005

5 RESULTADOS

5.1 Histologia

5.1.1 Grupo 1: Defeito ósseo + ultrassom + não suspensos

Na análise histológica da maioria dos espécimes pertencentes ao grupo G1 observou-se a presença de trabéculas ósseas neoformadas ocupando todo o espaço entre a parede óssea preexistente (Figura 4). Entretanto, notou-se a presença de delgadas trabéculas ósseas neoformadas, muitas vezes isoladas, ocupando o espaço entre as bordas do defeito ósseo. Nos espaços entre as trabéculas neoformadas, observou-se ausência de matriz óssea não ossificada.

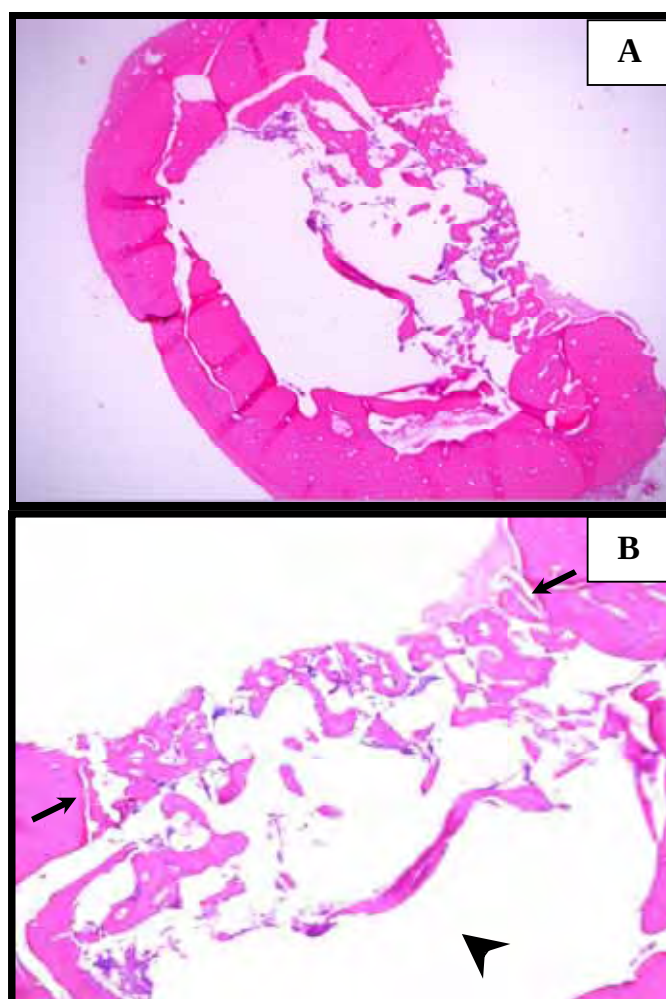


FIGURA 4 – Fotomicrografias do G1 tratado. **(A)** Área total do defeito ósseo. **(B)** O detalhe (zoom digital) mostra o fechamento do defeito em toda sua extensão com presença de tecido ósseo neoformado indicados pelas setas, e a cabeça de seta indica a região com ausência células e tecido em diferenciação. Hematoxilina e Eosina.Objetiva 4.

No grupo controle do Grupo 1 (G1_c) observou-se uma delgada camada de tecido ósseo neoformado, ocupando toda a extensão da borda da parede óssea preexistente. Entretanto, observou-se tecido ósseo neoformado ocupando um espaço maior entre a parede óssea preexistente. Verificaram-se, inúmeras espículas ósseas isoladas (Figura 5 A-B). Ressalta-se a ausência de células osteogênicas.

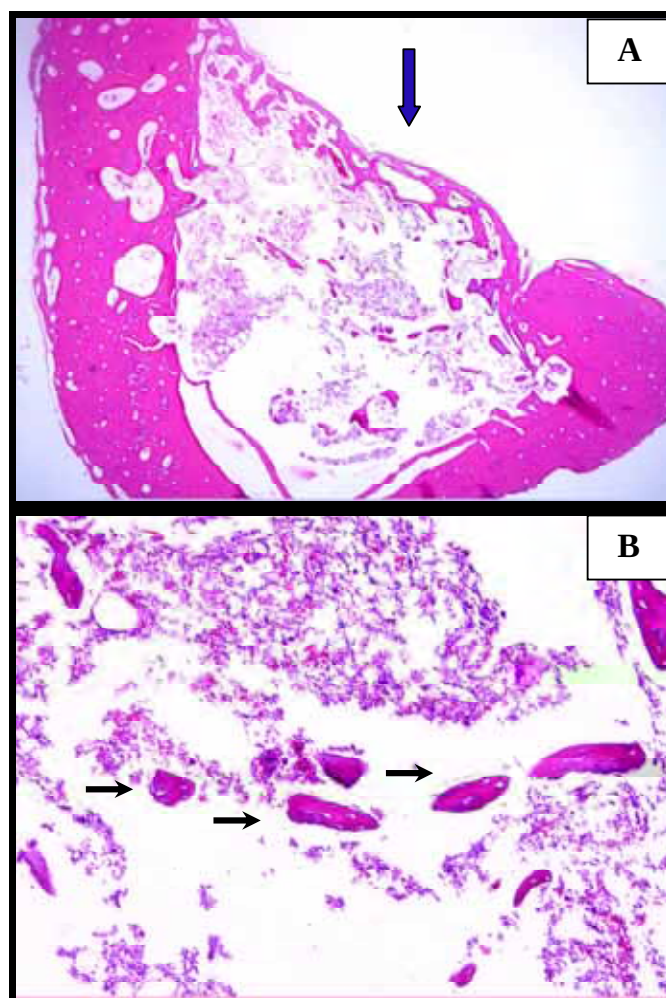


FIGURA 5 – Fotomicrografias do G1 controle: **(A)** Área total do defeito ósseo. A seta azul indica o fechamento do defeito ósseo por delgadas trabéculas ósseas. Hematoxilina e Eosina. Objetiva 4. Em **(B)** observa-se na imagem em maior aumento, as espículas ósseas indicadas pelas setas pretas. Hematoxilina e Eosina. Objetiva 20.

5.1.2 Grupo 2: Defeito ósseo + suspensão pela cauda por 15 dias +ultrassom

Nos espécimes do G2, foi observada a presença de trabéculas neoformadas, preenchendo totalmente o espaço entre as paredes pré-existent. Entretanto, em dois espécimes, observaram-se na parte lateral das trabéculas, discretas áreas ocupadas por estruturas pouco definidas, com características de coágulo em reabsorção (Figura 6 A-B).

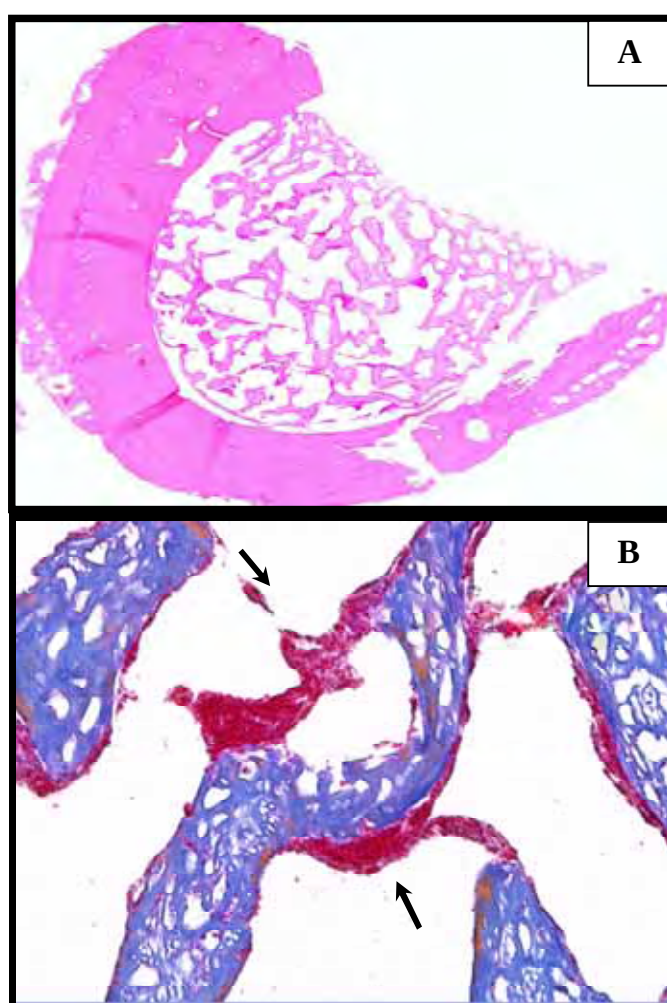


FIGURA 6 - Fotomicrografias do G2 tratado: **(A)** Área do defeito ósseo, totalmente preenchido por trabéculas ósseas neoformadas. Hematoxilina e Eosina. Objetiva 4. Em **(B)** na imagem em maior aumento, observam-se as áreas ocupadas por estruturas com características de coágulo em degeneração. Tricômico de Mallory. Objetiva 40.

Com relação ao grupo controle G2c, observou-se a presença de trabéculas ósseas neoformadas preenchendo totalmente o espaço entre o tecido ósseo preexistente. Além disso, em inúmeros pontos observaram-se ainda trabéculas ósseas isoladas, notadamente nas áreas situadas mais distantes da borda externa. Evidenciaram-se também ao lado das trabéculas ósseas neoformadas, extensas áreas ocupadas por coágulo sanguíneo (Figura 7 A-B). Similarmente ao Grupo1, observou-se no Grupo 2 a ausência de osteoblastos e matriz óssea não ossificada entre o trabeculado ósseo neoformado.

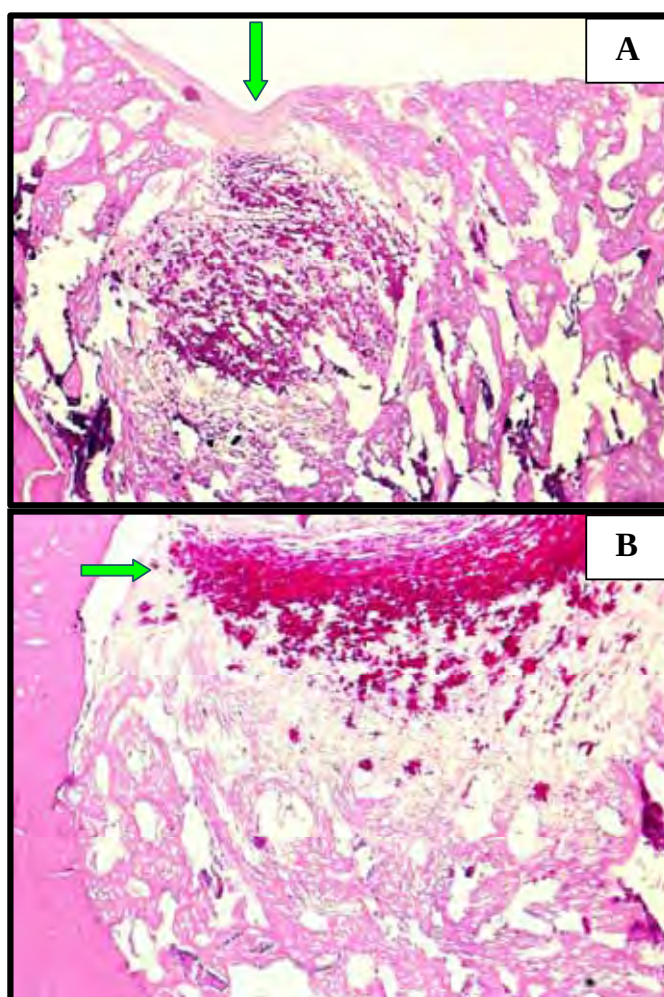


FIGURA 7- Fotomicrografias grupo G2 controle: Em **(A)** e **(B)** observa-se as extensas áreas ocupadas por coágulos sanguíneos indicados pelas setas. Hematoxilina e Eosina. Objetiva 4 (zoom digital).

5.1.3 Grupo 3 – Suspensão inicial de 21 dias + defeito ósseo + ressuspensão por 15 dias + ultrassom

Os animais do G3 evidenciaram a presença de trabéculas ósseas neoformadas ocupando parcialmente o espaço entre a parede óssea preexistente. Adjacentes ao trabeculado ósseo neoformado, observou-se nestes espécimes, extensas áreas ocupadas por matriz óssea não ossificada, assim como também, a presença de coágulo em degeneração. No espaço, entre as paredes ósseas preexistentes ocorre a presença de trabéculas ósseas pouco definidas (Figura 8 A-B).

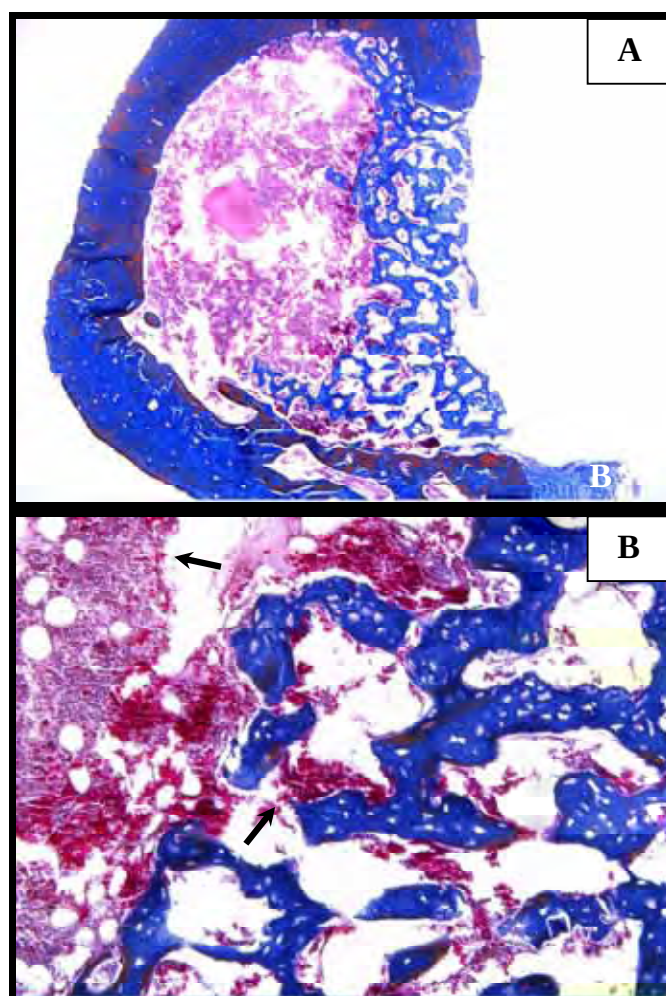


FIGURA 8 – Fotomicrografias do G3 tratado: **(A)** Área total do defeito ósseo. Tricômico de Mallory. Objetiva 4. Em **(B)** imagem em maior aumento, as setas indicam as áreas ocupadas por coágulo em degeneração e tecidos em diferenciação. Tricômico de Mallory. Objetiva 20.

Em dois animais do Grupo 3 (controle), observou-se a presença de delgadas trabéculas ocupando o espaço entre as paredes ósseas preexistentes. Nos demais casos (cinco espécimes), notaram-se a presença de trabécula óssea neoformadas ocupando parcialmente o espaço entre as paredes ósseas preexistentes. As áreas com ausência de neoformação óssea encontraram-se ocupadas por estrutura com características de coágulo

sanguíneo em degeneração (Figura 9). Outro fato relevante foi à ausência de células osteogênicas entre as trabéculas ósseas neoformadas.

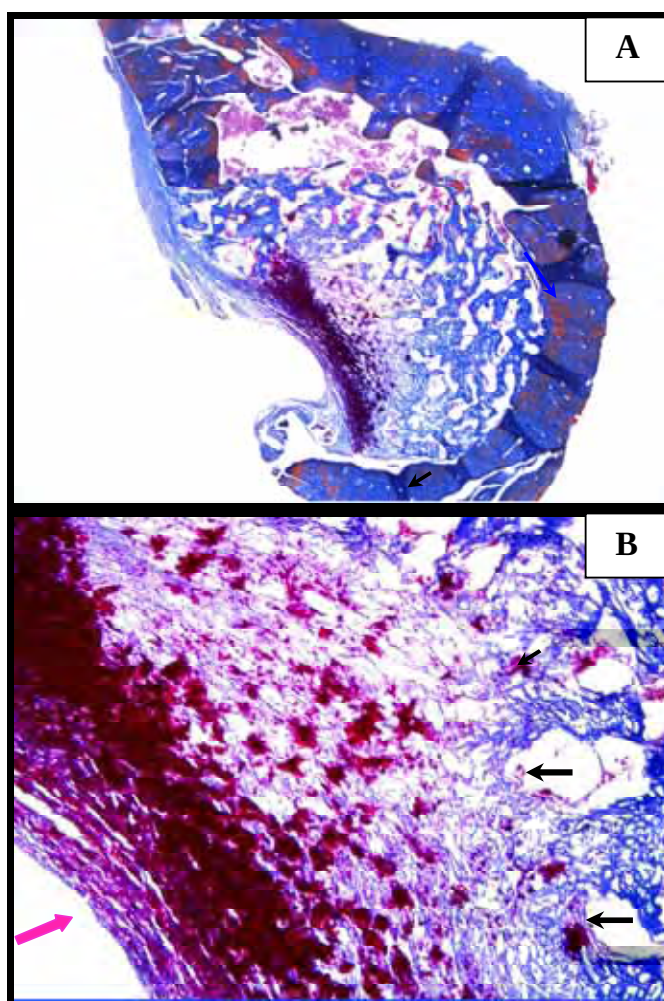


FIGURA 9 – Fotomicrografias G3 controle: **(A)** Área do defeito ósseo. Tricômico de Mallory. Objetiva de 4. Em **(B)** As setas pretas indicam as delgadas trabéculas sendo preenchidas por coágulos sanguíneos, representado pela seta rosa. Coloração em Tricômico de Mallory. Objetiva de 20.

5.2 Histomorfometria

As análises dos resultados da histomorfometria encontram-se discriminados por média ($\bar{x}$) e desvio padrão (S) de acordo com o grau de significância estatística (Tabela1).

Na análise dos resultados da porcentagem de osso neoformado **entre os grupos**, pode-se observar que as tíbias do grupo tratado **G_{t1}**(13,62 ± 4,88), grupo não suspenso, apresentaram uma menor porcentagem de neofomação óssea, estatisticamente significativa, quando comparado ao **G_{t2}**(27,17 ± 11,36), grupo suspensos por 15 dias e **G_{t3}**(23,19 ± 5,61), grupo suspenso por 36 dias. No entanto, as tíbias do grupo controle **G_{c1}**(8,68 ± 4,16), **G_{c2}**(10,10 ± 7,90) e **G_{c3}**(15,74 ± 7,08) não apresentaram diferenças estatisticamente significativas (Tabela1).

Ainda na Tabela1, podemos observar, que quando comparamos os valores de neoformação óssea entre as **tíbias tratadas e controle dentro de cada grupo**, as tíbias do **G_{t1}** não diferem das tíbias **G_{c1}**. Contudo, tanto as tíbias do **G_{t2}** e **G_{t3}** apresentaram maior porcentagem de tecido neoformado, estatisticamente significativa, em relação às tíbias do **G_{c2}** e **G_{c3}**.

Tabela 1 - Resultados expressos das Médias ($\bar{x}$) e desvio padrão (S) da porcentagem de osso neoformado, segundo os grupos: G1 defeito ósseo + ultrassom + não suspensos; G2 defeito ósseo + suspensão pela cauda por 15 dias + ultrassom; G3 Suspensão inicial de 21 dias + defeito ósseo + ressuspensão por 15 dias + ultrassom

Grupo/n	Porcentagem de osso neoformado ($\bar{x} \pm S$)	
	Grupos Tratado - tíbia direita (G _d)	Grupo Controle - tíbia esquerda (G _c)
G1 (n=6)	13,62 $\pm$ 4,88 bA	8,68 $\pm$ 4,16 aA
G2 (n=5)	27,17 $\pm$ 11,36 aA	10,10 $\pm$ 7,90 aB
G3 (n=7)	23,19 $\pm$ 5,61 aA	15,74 $\pm$ 7,08 aB

*(p> 0,05)

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de "Student-Newman-Keuls" (SNK).

6 DISCUSSÃO

O ultrassom pulsado de baixa intensidade, ao ser aplicado em regiões ósseas, fornece estímulos mecânicos caracterizados por uma baixa intensidade em torno de 30mW/cm^2 , mas com uma frequência elevada, inúmeras vezes maior que qualquer frequência recebida pelo osso durante atividades físicas. Esta forma de geração de cargas é capaz de estimular o metabolismo e pode contribuir para o remodelamento ósseo (KODAMA, 2003). Segundo Silva (2002), existe a necessidade de se compreender e manipular as forças que agem sobre o corpo humano e simultaneamente influenciam o movimento, visando identificar os fatores de risco, estabelecer medidas preventivas, como também instituir medidas terapêuticas de reabilitação adequada ao enfraquecimento ósseo provocado pela inatividade, destaca-se grande importância de pesquisas relacionadas aos assuntos abordados em nosso estudo.

O modelo de suspensão utilizado em nosso estudo mostra-se um modelo eficaz, simples e com boa tolerância dos animais segundo Silva e Volpon (2004). A eleição deste modelo baseou-se também na semelhança com as alterações observadas no esqueleto humano relacionado à deficiência de estímulo mecânico (GETTY, 1980). O uso do ultrassom para acelerar o reparo ósseo, já foi estabelecido e aprovado pela Food and Drug Administration - FDA (LIRANI, 2004).

No presente trabalho, a avaliação histológica das amostras de tíbias tratadas do Grupo 1 não demonstraram diferenças consideráveis, quando comparado ao grupo controle. Observou-se em ambos a presença de delgadas trabéculas neoformadas ocupando todo o espaço entre as bordas do defeito ósseo preexistente, o que pode indicar a formação de um calo de fixação externa (DOBLARÉ; GARCIA; GOMÉZ, 2004). Nos Grupos 2 e 3, diferentemente do G1 observou-se presença de trabéculas neoformadas, preenchendo totalmente o espaço entre as paredes preexistentes, nos animais do grupo tratado. Diferentemente das tíbias dos grupos controle 2 e 3 que apresentaram áreas ocupadas por coágulo sanguíneo e estruturas em

diferenciação, indicando um estágio inicial de reparo. De acordo com Einhorn (1998), o processo de reparo ósseo e diferenciação celular passam por dois estágios: o primeiro envolve o processo inflamatório, a diferenciação e o início da ossificação; e por último, a ossificação e remodelação gradual com o restabelecimento da arquitetura com a formação original óssea.

Em todos os espécimes dos grupos não há evidencia de células osteogênicas, e em alguns grupos observou-se a ausência de tecido conjuntivo em diferenciação, entre as trabéculas ósseas neoformadas. Tal efeito pode ser explicado pelo uso da técnica de congelamento a -20°C e as amostras terem sido submetidas a outros procedimentos, sendo provável que devido ao manuseio excessivo, associado às alterações bruscas de temperatura, danos teciduais possam ter ocorrido. No entanto, Hoyer e Lippert (1982) determinaram as propriedades mecânicas do fêmur, da tíbia e do úmero de animais testados em flexão, e concluíram que não houve diferença nas propriedades analisadas entre os ossos frescos e os congelados a -20°C . Silva e Volpon também utilizaram a mesma técnica para conservação de suas peças, e não observaram qualquer alteração as propriedades estudadas. Outro motivo aventado à ausência de células osteogênicas, deve-se provavelmente ao tipo de procedimento utilizado na descalcificação, a qual foi submetida o material biológico antes da análise histológica.

Os resultados da análise histomorfométrica do Grupo1 revelaram uma diferença significativa quando comparados com os resultados do Grupo 2 e 3 tratados e controle, sendo o volume de tecido neoformado dos animais do G1 (grupo não suspenso) inferior aos demais. Silva e Volpon (2004) diferentemente observaram que a simulação de micro gravidade por suspensão de 7 a 21 dias, promoveu uma redução significativa na maioria das propriedades mecânicas da tíbia e fíbula, quando comparado aos grupos controles não suspenso.

Para Schimitz e Hollinger (1986) uma lesão óssea de 4x2mm é um tamanho crítico, pela sua extensão, ou seja, não cicatriza espontaneamente, sendo necessário a colocação de algum tipo de enxerto ou biomaterial para o

preenchimento. Tal situação, pode elucidar os achados do Grupo 1, onde foi observado na maioria dos espécimes, a formação de calo ósseo, característico de cicatrização secundária. Segundo Dobleré et al. (2004) e Pinheiro (2006), este tipo de cicatrização ocorre quando não há estabilidade necessária para o reparo do defeito. Belangero (2000) afirma que a formação do calo osso é amplamente influenciada pela movimentação inter-fragmentária, sendo observadas pequenas formações de calo ósseo em fixações estáveis, e grande formação em fixações instáveis. Entretanto, se a movimentação inter-fragmentária for elevada e gerar instabilidade excessiva, podem ocorrer retardo de consolidação, pseudoartroses e até mesmo a não formação do calo ósseo (DUDA et al., 1998; KENWRIGHT; GOODSHIP, 1989).

No entanto, os animais dos Grupos 2 e 3 com o mesmo defeito ósseo que o Grupo 1, não foram submetidos à descarga de peso no local da lesão, uma vez que, por permanecerem suspensos, não sofreram movimentação da região lesionada, proporcionando assim, estabilidade ao defeito ósseo.

Na comparação entre os resultados histomorfométricos do reparo ósseo, as tíbias tratadas revelaram um aumento no volume tecidual em relação às tíbias controles. Onde apenas o G2 e G3 demonstraram diferença estatisticamente significativa em relação ao G2c e G3c, demonstrando que o tratamento com ultrassom influenciou no reparo ósseo, apesar desses animais terem sido submetidos a ambientes de micro gravidade. Dados semelhante foi encontrado por Lirani (2004) que em seu estudo avaliou e comparou, pela histomorfometria e ensaio mecânico de flexão em três pontos a ação do ultrassom e do laser, concluindo que o ultrassom acelerou o reparo ósseo (em relação ao grupo controle), por viabilizar mais rapidamente a fase de reabsorção. No entanto na comparação de Lirani o laser foi melhor. Colucci (2002) utilizando o tratamento de ultrassom de baixa intensidade, a análise histomorfométrica verificou junto das espiras do pós implante, a presença de tecido calcificado mais intenso.

É importante ressaltar, que em nosso estudo o membro contralateral foi utilizado como controle. Estudos experimentais e clínicos elegem um membro

para ser submetido a um tratamento e o membro contralateral para controle, considerando que os membros possuem simetria bilateralmente, ou seja, não apresentam diferença significativa que possa influenciar os resultados (HOYER E LIPPERT, 1982). Justificando, deste modo, o uso de ambos os membros e os resultados positivo em nosso experimento. No entanto, é preciso ponderar que a confecção de grupos distintos, permite ao pesquisador eliminar e garantir que as ondas ultrassônicas não penetrem no membro controle. (KODAMA, 2003).

Desta forma, este estudo demonstrou que a evolução da consolidação óssea depende de muitos fatores, sendo o estresse mecânico um importante ativador da osteogênese. No entanto, embora esses estímulos sejam importantes no âmbito clínico, outros fatores devem estar associados, como uma adequada orientação aos pacientes quanto aos excessos de estímulos e sobrecargas no local da fratura.

Contudo, estudos relacionados com a consolidação da fratura denotam um importante tópico de pesquisa na fisioterapia ortopédica devido à dificuldade de se promover um pós - operatório adequado.

7 CONCLUSÃO

Diante das condições experimentais e dos resultados observados neste estudo, concluímos que:

- a. O tratamento com ultrassom contribuiu pra acelerar o reparo ósseo em tíbias osteotomizadas. Embora não estatisticamente significativa, o ultrassom promoveu o aumento na porcentagem de osso neoformado na tíbia tratada, quando comparada ao controle, nos animais do grupo não suspenso.
- b. Os grupos de animais osteotomizados, que foram suspensos pela cauda, demonstram que a suspensão por 15 não interferiu diretamente na resposta ao reparo ósseo das tíbias tratadas com ultrassom. Sendo o resultado das tíbias tratadas com ultrassom significativamente maior quando comparado as tíbias não tratadas nestes grupos.
- c. A prévia suspensão realizada no grupo 3, não influenciou na resposta ao tratamento com o ultrassom, sendo que neste grupo a porcentagem de osso neoformado foi significativamente maior, quando comparado ao controle.

No entanto, fatores relacionados com a metodologia possam ter corroborado para os nossos resultados. Sugerimos, portanto que outros trabalhos devam ser realizados nesta mesma área.

8 REFERÊNCIAS

ABRAM, A.C; KELLER, T.S.; SPLENGER, D.M. The effects of simulated weightlessness on bone and biochemical properties in the mature rat. **J. Biomech.** v.21, p.755-767, 1988.

APOLINARIO, J.C. **Aplicação de ultrassom de baixa intensidade na reparação óssea em ratos sob ausência de carga. Análise densitométrica e biomecânica.** 2008. 57f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia, Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2008.

BARR, A.E.; BARBE, M. F. Inflammation reduces physiological tissue tolerance in the development of work-related musculoskeletal disorders. **J electromyogr kinesiol.** v.14, p.77-85, 2004.

BELANGERO, W. D. Princípios gerais de osteossíntese e fixação das fraturas. In: REIS, F.B. **Fraturas.** cap. 7 p. 59-66.

CARANO, R.A.D.; FILAVAROFF, E.H. Angiogenesis and bone repair. **Drug Discov Today.** v.8 n.21, p.980-989, 2003

CARBONERE, L.D. et al. Bone microarchitecture evaluated by histomorphometry. **Micron.** v.36 ,2005.

CARVALHO, D.C.L.; CARVALHO, M. M.; CLIQUE, A. Osteoporose por Desuso: Aplicação na Reabilitação do Lesado Medular. **Acta Ortop Bras.** v.9, n.3, 2001.

CHAKKALAKAL, D. A. et al. Repair of segmental bone defects in the rat: an experimental model of human fracture healing. **Bone.** v.25, n.3, p.321-332, 1999.

COLUCCI, A.R.S., **Efeitos do ultrassom de baixa intensidade na osteointegração de implantes de titânio em tíbias de coelhos: Avaliação histomorfométrica e mecânica.** 2002. 101f. Dissertação (Mestrado)-Interunidades em bioengenharia - Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, Curso de Pós - Graduação em Bioengenharia, São Carlos, 2002.

CORTET, B.; MARCHANDISE, X. Bone microarchitecture and mechanical resistance. **Joint Bone Spine.** v.68 p.297-305, 2001

CROCI, A.T. et al. Efeito do concentrado de plasma em falhas ósseas provocadas em fêmures de camundongos como estimulação de formação óssea – estudo experimental. **Acta Ortop Bras.** v.11, n.4, p.230-239, 2003.

COWIN, S.C. On Mechanosensation in bone under microgravity. **Bone.** v.22, n.5, p.119-125, 1998.

DEMULDER, A. et al. Increased osteoclast-like cells formation in long-term bone marrow cultures from patients with a spinal cord injury. **Calcif Tissue Int.** v.63, p.396-400, 1998.

DINIZ, J.S.; DIONISIO, V.C.; NICOLAOU, R.A.; PACHECO, M.T.T.; Propriedades mecânicas do osso: uma revisão bibliográfica. 9º ENCONTRO LATINO AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2005; 5º ENCONTRO LATINO AMERICANO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 2005; **Anais...** São José dos Campos. São José dos Campos: Universidade do Vale do Paraíba, 2005. p.1363 -1366.

DOBLARÉ, M.; GARCÍA, J.M.; GÓMEZ, M.J. Modeling bone tissue fracture and healing: a review. **Eng Fract Mech.**, v.17, n. 13/14, p.1809-1840, 2004.

DOUGLAS, C.R.; DOUGLAS, N.A. Fisiologia do osso. In: DOUGLAS, C. R. **Tratado de fisiologia aplicada às ciências médicas**. São Paulo: Guanabara Koogan, 2006. p.1243-1257.

DUDA, G. N. et al. Analysis of inter-fragmentary movement as a function of musculoskeletal loading conditions in sheep. **J. Biomech.** v.31, n.3, p. 201-210, 1998.

DUARTE, L.R. The stimulation of bone growth by ultrasound. **Arch Orthop Trauma Surg.** v.101, p.153-159, 1983.

EINHORN T.A. The cell and molecular biology of fracture healing. **Clin Orthop Rel Res.** v.355, p.7–21, 1998.

FORTIER, L.A. Invited review - Stem Cells: classifications, controversies, and clinical Applications. **Vet Surg.** v.34, p.415–423, 2005.

FRANKEL, V.H.; NARDIN, M. Biomecânica do osso. In: NARDIN, M.; FRANKEL, V.H. **Biomecânica básica do sistema músculo esquelético**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

GAMEIRO, V.S; SCHOTT, P.C.M. A osteoporose em fraturas próximas do fêmur: estudo histomorfométrico. **Rev Bras Ortop.** v.41, n3, p.61-69, 2006.

GETTY, R. **Anatomia dos animais domésticos**. 5. ed. Rio de Janeiro: Interamericana, 1980, p.47.

GONÇALVES, R.C.; GONÇALVES, A.L.; BALDUCCI-ROSLINDO, E. Efeitos do ultrassom de baixa intensidade em defeito ósseo do ramo da mandíbula. Estudo histológico em ratos. **Rev de Odontol UNESP**. v 3 n 36 p. 193-199, 2007. 36(3): p193-199, 2007.

GUIRRO, R.R.J. **O uso da hidroxiapatita associada à estimulação ultrassônica pulsada de baixa intensidade na correção de falha óssea. Estudo experimental em coelhos**. 1995. 72f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto Universidade de São Paulo, São Carlos, 1995.

GUYTON, A.C., HALL, J.E. **Tratado de fisiologia médica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

HOYER, H.E; LIPPER, T.H. Biomechanical change in long bones of han – wistar rats during postnatal development. **Anat Embryol**. v.64, n.1, p.101-111, 1982

JOHNSON, R.B. The bearable lightness of being: bones, muscles, and spaceflight. **Anat Rec**. v.253, p.24-27, 1998.

JORGE, F.A.J. **Influencia da estimulação ultrassônica de baixa intensidade no reparo de osteotomias de tíbias fixadas com fixação flexível**. 2004. 61f. Dissertação (Mestrado). Escola de engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Instituto de Química de São Carlos/Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Tecido ósseo. In: _____. **Histologia básica**. 10. ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 2004. p.111-128.

KASPER, C.E., WHITE, T.P, MAXWELL, L.C. Running during recovery from

hindlimb suspension induces muscular injury. **J. Appl Physiol.**, v.68, p.533-539, 1990.

KENWRIGHT, J.; GOODSHIP, A.E. Controlled mechanical stimulation in the treatment of tibial fractures. **Clin. Orthop.** v.241, p. 36-47, 1989.

KODAMA, A.C. **Efeitos do ultrassom pulsado de baixa intensidade em um modelo osseo de ratas ovariectomizadas analisados por meio do ensaio de flexão-compressão.** 2003. 89f. Dissertação (Mestrado). Escola de engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Instituto de Química de São Carlos/Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003.

KOKUBU, T. et al. Low Intensity Pulsed Ultrasound Exposure Increases Prostaglandin E₂ Production via the Induction of Cyclooxygenase-2 mRNA in Mouse Osteoblasts. **Biochem and Biophys Res Commun.** v.256, n.2, p.284-287, 1999

KRISTIANSEN, T.K. et al. Accelerated healing of distal radial fractures with the use of specific, low-intensity ultrasound. **J Bone Jt Surg Am.** n.79, p.961–973, 1997.

LIRANI, A.P.R. **Estudo comparativo dos efeitos do Ultrassom e do Laser de Baixa Potência no reparo ósseo de tíbia de rato.** 2004. 109f. Dissertação (Mestrado) Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.

MARINO, J.A.M. **Efeito do laser terapêutico de baixa potência sobre o processo de reparação óssea em tíbia de rato.** 2003. 106f. Dissertação (Mestrado). Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos.

MORAES, P.C. et al. Uso do ultrassom de baixa intensidade em falhas ósseas produzidas experimentalmente em raios de coelhos, preenchidas ou não com cimento de fosfato de cálcio. **Vet. Not.** v.13, n.1, p.67-74, 2007.

MOREY-HOLTON E.R.; GLOBUS R.K. Hindlimb unloading of growing rats: a model for predicting skeletal changes during space flight. **Bone.** v.22, p.83-88, 1998.

MOTTA, V.T. Metabolismo Mineral e Ósseo. In: _____. **Bioquímica clínica: princípios e Interpretações.** São Paulo: CRIESp, 1996. p.143-163.

MUSACCHIA, X.J., STEFFEN, J.M., DEEVERS, D.R. Rat hind limb muscle responses to suspension hyperkinesias/hipodynamia. Aviation space and environmental. **Medicine.** v.54,p.1015-1020, 1983

NARUSE, K., MIYAUCHI, A., ITOMAN, M., MIKUNI-TAKAGAKI, Y. Anabolic response of mouse –morrow- derived stromal clone ST2 cells to low-intensity pulsed ultrasound. **Biochem and Biophys Res Commun.** v. 268, p. 216-220, 2000.

PINHEIRO, A.L.B.; GERBI, M. E. Photoengineering of bone repair processes. **Photomed Laser Surg.** v.21, p.169-78, 2006.

REVELL, P.A. Histophometry of bone. **J Clin Pathol.** v.36, p.1323-1331, 1983.

RISO, N.D.M. **Influência do laser terapêutico no reparo de defeito ósseo de ratos submetidos à ausência de carga: análise densitométrica.** 2008. 79f. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Odontologia, Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2008.

SANTOS, C.A.; FIALHO, H.S.A.; PINTO, J.A.; ALVES, M.T. Influencia do ultrassom terapêutico na epífise de crescimento de coelhos. **Fisioterapia e pesquisa**. v.12, n. 2 p. 13-21, 2005

SILVA, A.V. **Modelo de suspensão pela cauda e seu efeito em algumas propriedades mecânicas do osso do rato**. 2002. 82f. Dissertação (Mestrado). Escola de engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Instituto de Química de São Carlos/Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2002.

SILVA, A.V.; VOLPON J.B. Modelo de simulação de micro gravidade e seu efeito em algumas propriedades mecânicas do osso do rato. **Acta Ortop. Bras.**, v.12, p.22-31, 2004.

SHIMANO, M.M.; VOLPON J. B. Comportamento Mecânico do terço proximal de fêmures de ratos após período de suspensão pela causa e exercitação. **Acta Ortop Bras**. v.15, n.5, p. 22-31, 2007.

SHIMITZ, J.P.; HOLLINGER, J.O. The critical size defect as an experimental model for cranio mandibulofacial nonunion. **Clin Orthop**. v.205, p.299-308, 1986.

TAKIKAWA, S. et al. Low-intensity pulsed ultrasound initiates bone healing in rat nonunion fracture model. **J. Ultrasound Med**. v.20, n.3, p.197-205, 2001.

Ter HARR, G. Basic physics of therapeutic ultrasound. **Physiotherapy**. v.73, p.110-123, 1987.

VICENTINI, C.R. et al. Análise biomecânica em fêmures de ratos submetidos à ausência de carga e atividade física em esteira. **Vet zootec**. v.14, n.1, p.62-71, 2007.

WARDEN, S.J. et al. Skeletal effects of low-intensity pulsed ultrasound on the ovariectomized rodent. **Ultrasound Med Biol.** v.27, n.7, p. 989-998, 2001.

YAMADA, B.F.A. Úlceras venosas. In: JORGE, S. S.; DANTAS, S. R. P. E. **Abordagem multiprofissional no tratamento de feridas.** São Paulo: Atheneu, 2003. p.247-259.

YOUNG, B.; HEATH J.H. Tecidos esqueléticos. In:_____. **Histologia funcional.** 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

XAVIER, C.A.M.; DUARTE, L. R. Estimulação ultrassônica do calo ósseo. **Rev. Bras Ortop.** v. 18, n. 3, p. 73-80, mai/ jun. 1983.

ANEXO A



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba

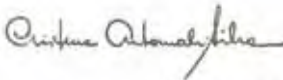


COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
(CEEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "APLICAÇÃO DE ULTRA-SOM DE BAIXA POTÊNCIA NA REPARAÇÃO ÓSSEA DE TÍBIAS, OSTEOPÊNICAS INDUZIDAS, DE RATOS" sob responsabilidade do Prof Ass Dr **MÁRIO JEFFERSON QUIRINO LOUZADA** e colaboração de Juliana de Carvalho Apolinário está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela CEEA em 29 de junho de 2007, de acordo com o protocolo no. 2007-002868.

Araçatuba, 6 de julho de 2007.



Pro^{fa} Dr^a CRISTINA ANTONIALI SILVA
Presidente da CEEA - FOA/UNESP

Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária
Rua José Bonifácio, 1183 CEP 16015-020 Araçatuba - SP
Tel (16) 3636-3200

ANEXO B

AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E HISTOMORFOMÉTRICA DO REPARO ÓSSEO EM TÍBIAS OSTEOTOMIZADAS DE RATOS (*RATTUS NORVEGICUS ALBINUS*), FRENTE À AUSÊNCIA DE CARGA E TRATAMENTO COM ULTRASSOM.

HISTOLOGIC AND HISTOMORPHOMETRIC BONE REPAIR OSTEOTOMIZED TIBIA IN RATS (*RATTUS NORVEGICUS ALBINUS*), GIVEN THE LACK OF LOADING AND TREATMENT ULTRASOUND.

HISTOLÓGICO Y LA REPARACIÓN ÓSEA HISTOMORFOMÉTRICOS TIBIA OSTEOTOMIZADO EM RATAS (*RATTUS NORVEGICUS ALBINO*), DADA LA FALTA DE CARGA Y TRATAMIENTO DE ULTRASONIDO.

Priscila Silvério Meira¹
 Mário Jefferson Quirino Louzada²
 Juliana de Carvalho Apolinário³
 Tetuo Okamoto²
 Sílvia Helena Venturoli Perri²
 Márcia Marinho²

Priscila Silvério Meira - Rua: Clóvis Pestana, 793, Bairro Dona Amélia, CEP 16050-680, Araçatuba/SP.
 Telefone (18) 3636-1382– Fax (18) 3622-6487 e-mail: prismeira@hotmail.com

1. Mestranda do Programa de Pós Graduação em Ciência Animal – UNESP/Araçatuba, SP. prismeira@hotmail.com
2. Professora Ass. Dr^a. do Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal – UNESP/Araçatuba, SP. mmarinho@fmva.unesp.br
2. Professor Adj. do Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal – UNESP/Araçatuba, SP. louzada@fmva.unesp.br
2. Professor Titular Voluntário do Departamento de Cirurgia Clínica Integrada – UNESP/Araçatuba, SP
2. Professora Ass. Dr^a. do Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal – UNESP/Araçatuba, SP. shvperri@fmva.unesp.br
3. Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas – UNESP/Araçatuba, SP. juapolinario@hotmail.com

Avaliação histológica e histomorfométrica do reparo ósseo em tíbias osteotomizadas de ratos (*Rattus norvegicus albinus*), frente à ausência de carga e tratamento com ultrassom

RESUMO: A resposta do metabolismo ósseo está diretamente relacionada a fatores hormonais e ao estímulo mecânico que o osso está exposto. A energia ultrassônica na cicatrização do reparo ósseo têm se mostrado de fundamental importância para o estímulo e melhora na qualidade do tecido neoformado durante o processo de cicatrização óssea. O objetivo deste estudo foi analisar a ação do ultrassom de baixa intensidade no reparo ósseo de tíbias osteotomizadas de ratos submetidos à suspensão pela cauda, por meio das análises histológica e histomorfométrica. Dezoito *Rattus norvegicus albinus*, Wistar adultos foram divididos em três grupos, (G1, G2 e G3), dispostos da seguinte maneira: G1 (n=6), que permaneceram livres por um período de 15 dias; G2 (n=5), suspenso pela cauda por um período de 15 dias e G3 (n=7), suspensos pela cauda por um período de 36 dias. Todos os animais foram submetidos à cirurgia para confecção do defeito ósseo experimental na região medial da diáfise, em ambas as tíbias. A tíbia direita foi tratada com ultrassom pulsado (frequência de 1,5 MHz, ciclo 1:4, 30mW/cm²), por 12 sessões de 20 minutos, e o membro contralateral foi o controle. As amostras das tíbias foram submetidas à análise histológica, às cegas, com microscopia de luz comum e a análise histomorfométrica, pelo software específico Image-pro 6.1. As médias percentuais de neoformação óssea foram submetidas à análise de variância em parcela subdividida e teste de comparação múltipla “Student-Newman-Keuls” (SNK), com nível de significância de 5%. Os valores das médias e desvios padrão, da porcentagem de osso neoformado para os grupos, demonstraram uma menor quantidade no reparo ósseo do G1t(13,62 ± 4,88) - G1c (8,68 ± 4,16) quando comparado aos grupos G2t (27,17 ± 11,36) - G2c (10,10 ± 7,90) e G3t (23,19 ± 5,61) - G3c (15,74 ± 7,08). No entanto, os valores das médias e desvios padrão da porcentagem de osso neoformado do reparo nas tíbias tratadas dos G2 e G3 foram significantemente maiores quando comparados ao reparo das tíbias do grupo controle. Pelo exposto, conclui-se que o ultrassom contribuiu para acelerar o reparo ósseo, tanto na presença como na ausência de carga.

Palavras - chave: Regeneração óssea, simulação de ausência de peso, ultrassom de baixa intensidade.

Histologic and histomorphometric bone repair osteotomized tibia in rats (*Rattus Norvegicus Albinus*), given the lack of loading and treatment Ultrasound

ABSTRACT: The response of bone metabolism is directly related to hormonal factors and mechanical stimulation to the bone is exposed. The ultrasonic energy on the healing of bone repair have been shown to be of fundamental importance to promoting and improving the quality of newly formed tissue during the bone healing process. The objective of this study was to analyze the action of low-intensity ultrasound on bone healing of tibial osteotomy in rats subjected to tail suspension, by means of histological and histomorphometric analysis. Eighteen *Rattus norvegicus Albinus*, Wistar rats were divided into three groups (G1, G2 and G3), arranged as follows: G1 (n = 6), who remained free for a period of 15 days, G2 (n = 5), suspended by the tail for a period of 15 days and G3 (n = 7), suspended by the tail for a period of 36 days. All animals underwent surgery to make the experimental bone defect on the medial aspect of the diaphysis in both tibias. The right tibia was treated with pulsed ultrasound (frequency of 1,5 MHz, duty cycle 1:4, 30mW/cm²), for 12 sessions of 20 minutes, and the contralateral limb was the control. Samples of tibia were subjected to histological analysis, blindly, with common light microscopy and histomorphometric analysis by specific software Image-Pro 6.1. The average percentage of new bone formation were subjected to analysis of variance in a split plot test and multiple comparison Student-Newman-Keuls (SNK), with a significance level of 5%. The mean values and standard deviations of the percentage of newly formed bone for the groups showed a smaller amount in the healing of G1T (13,62 ± 4,88) - G1C (8,68 ± 4,16) in comparison with the G2T (27,17 ± 11,36) - G2C (10,10 ± 7,90) and G3t (23,19 ± 5,61) - G3C (15,74 ± 7,08). However, the mean values and standard deviations of the percentage of newly formed bone repair in tibia treated in G2 and G3 were significantly higher when compared to repair the tibia of the control group. For these reasons, it is concluded that ultrasound has helped to accelerate bone repair in both the presence and absence of cargo.

Keywords: Bone regeneration, Low-intensity ultrasound, Simulation of weightlessness.

Histológico y la reparación ósea histomorfométricos tibia osteotomizado en ratas (*Rattus norvegicus* Albino), dada la falta de carga y tratamiento de ultrasonido.

RESUMEN: La respuesta del metabolismo óseo está directamente relacionada con factores hormonales y la estimulación mecánica en el hueso está expuesto. La energía ultrasónica en la cicatrización de la reparación ósea han demostrado ser de fundamental importancia para promover y mejorar la calidad de los tejidos recién formados durante el proceso de curación del hueso. El objetivo de este estudio fue analizar la acción de ultrasonido de baja intensidad en la cicatrización ósea de la osteotomía tibial en ratas sometidas a la suspensión de la cola, por medio de análisis histológicos e histomorfométricos. Dieciocho *Rattus norvegicus* Albino, ratas Wistar se dividieron en tres grupos (G1, G2 y G3), dispuestos de la siguiente manera: G1 (n = 6), quien permaneció en libertad durante un período de 15 días, G2 (n = 5), suspendido por la cola por un período de 15 días y G3 (n = 7), suspendido por la cola por un período de 36 días. Todos los animales fueron sometidos a cirugía para el defecto óseo experimental en la cara medial de la diáfisis de ambas tibias. La tibia derecha, fue tratado con ultrasonido pulsado (frecuencia de 1,5 MHz, ciclo de trabajo 1:4, 30mW/cm²), durante 12 sesiones de 20 minutos, y la extremidad contralateral fue el control. Las muestras de la tibia se sometieron a análisis histológico, a ciegas, con el microscopio de luz común y el análisis histomorfométricos de la imagen de software específico-Pro 6.1. El porcentaje medio de la formación de hueso nuevo se sometieron a análisis de varianza en un ensayo en parcelas divididas y Estudiantes de comparación múltiple-Newman-Keuls (SNK), con un nivel de significación del 5%. Los valores medios y desviaciones estándar del porcentaje de hueso recién formado para los grupos mostraron una menor cantidad en la curación de G1T (13,62 ± 4,88) - G1C (8,68 ± 4,16) en comparación con el G2T (27,17 ± 11,36) - G2C (10,10 ± 7,90) y G3t (23,19 ± 5,61) - G3C (15,74 ± 7,08). Sin embargo, los valores medios y desviaciones estándar del porcentaje de la reparación del hueso recién formado en la tibia tratados en el G2 y G3 fueron significativamente mayores en comparación con la reparación de la tibia del grupo de control. Por estas razones, se concluye que la ecografía ha ayudado a acelerar la reparación ósea en presencia y ausencia de carga.

Palabras clave - Palabras clave: Regeneración ósea, la ingravidez simulada, el ultrasonido de baja intensidad.

INTRODUÇÃO

São inúmeros os fatores que podem alterar o metabolismo ósseo e consequentemente sua resposta diante de alterações fisiológicas ou patológicas. É comum o atendimento de pacientes portadores de fraturas não consolidadas ou com atraso na consolidação. Estima-se que a contração muscular e a descarga de peso facilitam o processo de reparação (1). Johnson (2) afirma que períodos de sete ou quatorze dias de ausência de contato com o solo são suficientes para promover alterações ósseas, principalmente naqueles que servem de apoio para o peso corporal como, por exemplo, o fêmur e a tíbia. Estas alterações ocorrem porque segundo Douglas (3), a remodelagem é controlada e ajustada por fatores hormonais, bem como fatores físicos como o estresse mecânico. Sendo assim, a hipoatividade provoca reduções significativas nas propriedades mecânicas do osso, levando ao seu enfraquecimento (4 - 5).

Dentre os recursos, não invasivos, disponíveis para o tratamento de lesões ósseas, a energia ultrassônica, têm se mostrado útil para estimular e preservar as funções fisiológicas da estrutura celular e para melhorar a qualidade do tecido ósseo de neoformado (6). O ultrassom é uma forma de energia mecânica transmitida por ondas de pressão acústica de altas frequências, acima de 16 KHz. Esta energia é transmitida por movimentos das partículas no interior do meio pelo qual a onda propaga, sendo necessário um meio elástico para sua propagação (7). O meio irradiado oscila ritmicamente com a frequência do gerador ultrassônico por efeito piezoelétrico ao comprimir e expandir a matéria. As deformações micromecânicas, ocorridas no tecido

ósseo, por ação do ultrassom, são similares às aquelas ocorridas sob carga mecânica e passam agir como sinalização para a formação de tecido ósseo (8). Muitos estudos já mostraram a eficácia do ultra-som de baixa intensidade (frequência de 1,5MHz, 30mW/cm² - SATA, com intervalos de 200µs, frequência de repetição de 1 KHz e ciclo de trabalhos de 20%) no reparo ósseo de defeito ósseo experimental, (9,10,11,12), no reparo ósseo em ratas ovariectomizadas (13,14,15), no reparo de modelos experimentais de não união de fratura (16). A ação do ultrassom de baixa intensidade também foi alvo de investigação clínica, em fraturas tratadas com manipulação e gesso (17), Também foi demonstrado o efeito do ultrassom em estudos de cultura de células de osteoblasto (18), e em células do estroma medular(19).

Apesar dos estudos demonstrarem que o ultrassom de baixa intensidade tem participação ativa no processo de reparo ósseo, pouco se conhece a respeito da influência do ultrassom de baixa intensidade no reparo ósseo em modelos experimentais de ratos suspensos pela cauda, com o intuito de simular as alterações no metabolismo ósseo em paciente expostos a períodos prolongados no leito ou a ambientes de microgravidade. (20,21,22,5).

Visto que, alguns trabalhos têm relacionado à ausência de resultados significantes em análises densitométricas e ensaio mecânico ao baixo conteúdo mineral ósseo e a uma grande quantidade de tecido neosintetizado, que ainda não está totalmente calcificado não expressando assim resistência óssea considerável (23,24), o objetivo deste estudo foi analisar pela avaliação histológica e histomorfométrica o reparo ósseo de tíbias osteotomizadas de ratos submetidos à suspensão pela cauda tratadas com ultrassom de baixa intensidade.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi submetido à apreciação e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da UNESP/ Campus de Araçatuba - Protocolo nº 2007-002868 (Anexo A).

Os animais utilizados ratos (*Rattus norvegicus albinus*), machos, adultos da raça Wistar, de massa corporal média (348 ± 14 g), provenientes do biotério da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista - UNESP / Campus de Araçatuba - SP. Os animais permaneceram no Laboratório de Biofísica da Universidade, em gaiolas de polipropileno padrão, agrupados em número de três a quatro animais, mantidos em ambiente com temperatura controlada de 23° C, higienizado, com iluminação em ciclo claro/escuro de 12 horas, recebendo água, ração balanceada para rato (Primor[®]) *ad libitum* e em local de acesso restrito.

Foram criados três grupos experimentais de forma randomizada, de acordo com o recebimento dos animais e ao tipo de tratamento. O Grupo 1 (G1): constituídos de 6 ratos, foram submetidos à cirurgia para a realização da lesão óssea e permaneceram livres em gaiolas individuais pelo período de 15 dias. O Grupo 2 (G2): constituído de cinco ratos, foram submetidos à cirurgia para realização da lesão óssea e a suspensão pela cauda por um período 15 dias. O Grupo 3 (G3): constituído de sete ratos, após a suspensão por 21 dias, foram submetidos à cirurgia para a realização da lesão óssea e ressuspensos por mais 15 .

Em todos os três grupos, ambas as tíbias forma submetidas à criação da lesão óssea e o membro contralateral utilizado como controle, sendo apenas o membro direito submetido ao tratamento com ultrassom (US).

Cirurgia

Seguindo o protocolo descrito por Riso (12), os animais foram pesados e anestesiados com a associação de Ketamina e Xilazina nas doses 100 mg/Kg e 10 mg/Kg respectivamente, via intraperitoneal. A lesão óssea monocortical de 4X2mm foi criada na região medial da diáfise da tíbia direita e esquerda. Durante o pós-operatório foi ministrado aos animais Buprenorfina, (0,02 mL/Kg peso vivo de 12/12 horas) pela via subcutânea e Pentabiótico (0,035mLKg peso vivo), via subcutânea, dose única (11).

Técnica de Suspensão

Os procedimentos para suspensão foram baseados na técnica de Silvia e Volpon (5) modificadas por Apolinário (11). Para a preparação da cauda no processo de instalação da suspensão, os animais do grupo G2 e G3 foram anestesiados com a associação de ketamina e xilazina nas doses de 30 mg/kg e 3 mg/kg respectivamente, via intramuscular (12). Em seguida, a cauda foi envolvida por espuma adesiva (Reston[®]) desde sua origem até os dois terços proximais, com o objetivo de proteger o tecido e evitar futuras lesões cutâneas. Sobre a espuma adesiva foi aplicada uma bandagem elástica que foi tencionada homogeneamente envolvendo toda a espuma. Sobre o envoltório da tira elástica foi utilizado um cadarço de sarja, fixado por um esparadrapo, de modo a formar uma alça, que serviu para conectar o animal ao sistema de suspensão por meio de uma presilha metálica. O sistema de suspensão constituído por uma gaiola comum permitiu aos animais livre movimentação com os membros dianteiros, mantendo os membros pélvicos suspensos sem apoio no piso da gaiola ou nas paredes laterais, mantendo o animal, visualmente inclinado aproximadamente 30 graus em relação ao assoalho. Os animais tiveram acesso a água e ração e puderam se

movimentar. Após os procedimentos de preparação da cauda foi aplicado Banamine (analgésico, antiinflamatório e antitérmico) subcutâneo na dose de 2,5 mg/kg. Esta aplicação foi realizada a cada 12 horas por um período de três dias consecutivos (12).

Tratamento com Ultrassom

As aplicações foram executadas de forma padronizada, ocorrendo a primeira 24 horas após a realização do defeito ósseo, com sessões diárias de 20 minutos cada e após 6 sessões consecutivas, houve um intervalo de 24 horas, cumprindo-se um total de 12 sessões de tratamento (11). A estimulação ultrassônica foi realizada na tíbia direita, usando gel hidrossolúvel, como meio condutor.

Eutanásia

Os animais foram anestesiados com Ketamina e Xilazina e a eutanásia foi realizada com Pentobarbital na dose 1,5 mL via intravenosa. Após a dissecação, os ossos foram envolvidos em gases umedecidos em soro fisiológico e estocados em “freezer” à temperatura aproximada de -20° C, para posterior análise histológica (5).

Análise Histológica

As tíbias foram fixadas em paraformaldeído 4% tamponado por 24 horas; descalcificados em EDTA a 10% - aproximadamente até atingir o ponto de corte e posteriormente submetidas ao auto-processador, durante 13 horas, seguindo uma sequência de álcool, xilol e inclusas em parafina por meio do auto inclusor. Foram realizados cortes seriados com espessura de 5µm (micrômetros) na região do terço médio por meio do micrótomo. E os mesmos foram corados pela técnica de coloração de Hematoxilina/Eosina (HE) para a análise morfológica e o tricômico de Mallory (TM) para a análise morfológica e morfométrica respectivamente. Após o processo o processo

histológico de confecção, as lâminas foram examinadas, às cegas, sob microscopia de luz. A região do defeito ósseo foi localizada e foram avaliadas e descritas as características das trabéculas ósseas, e a remodelação do tecido.

Para a análise histomorfométrica as lâminas foram fotografadas no microscópio OlympusBX-50[®] (aumento de 4X) e as imagens capturadas pelo programa DPZ-BSW. E submetidas à padronização do programa específico Image - pro 6.1 que utiliza cores diferentes para as áreas a serem analisadas. Utilizamos vermelho para as áreas com trabécula óssea e de amarelo para áreas em branco e ou tecidos pouco diferenciados. Após a marcação das cores, o software quantifica percentualmente a área correspondente de tecido neoformado em relação à área total de tecido presente na lâmina (25).

Análise Estatística

Os dados obtidos foram tabulados e submetidos à análise estatística. As médias percentuais de neoformação óssea foram submetidas à análise de variância em parcela subdividida e ao teste de comparação múltipla “Student-Newman-Keuls” (SNK), com nível de significância de 5%. Para o processamento e análise destes dados foi utilizado o “software” estatístico “Statistical Analysis System” (SAS³).

RESULTADOS

Análise Histológica

A análise histológica da maioria dos espécimes pertencentes ao grupo G1 observou-se a presença de trabéculas ósseas neoformadas ocupando todo o espaço entre a parede óssea pré existente (Figura A). Entretanto, em alguns amostras foi observado a presença de delgadas trabéculas ósseas neoformadas, muitas vezes isoladas, ocupando o

³ SAS INSTITUTE. Version 9.1.3, Cary, NC: SAS Institute, 2005

espaço entre as bordas do defeito ósseo. Nos espaços entre as trabéculas neoformadas, notou-se a ausência de tecido conjuntivo sem diferenciação óssea.

No grupo controle do Grupo 1 (G1c) foi observado uma delgada camada de tecido ósseo neoformado, ocupando toda a extensão da borda da parede óssea pré-existente. Entretanto, em outros espécimes, observou-se a presença de tecido ósseo neoformado ocupando um espaço maior entre a parede óssea pré-existente. Verificou-se, no entanto, inúmeras espículas ósseas isoladas (Figura B). Ressalta-se a ausência de tecidos ósseos indiferenciados entre as trabéculas neoformadas.

Nos espécimes do G2, foi observada a presença de trabéculas neoformadas, preenchendo totalmente o espaço entre as paredes pré-existentes. Entretanto, em dois espécimes, observou-se na parte lateral das trabéculas, discretas áreas ocupadas por estruturas pouco definidas, com características de coágulo em reabsorção (Figura C). Com relação ao grupo controle, G2c observou-se em alguns espécimes a presença de trabéculas ósseas neoformadas preenchendo totalmente o espaço entre o tecido ósseo pré-existent e em inúmeros pontos observou-se ainda trabéculas ósseas isoladas, notadamente nas áreas situadas mais distantes da borda externa. Em outros espécimes, evidenciaram-se ao lado das trabéculas ósseas neoformadas, extensas áreas ocupadas por coágulo sanguíneo (Figura D). Similarmente ao Grupo 1, observou-se no Grupo 2 a ausência de osteoblastos e tecido conjuntivo sem diferenciação entre o trabeculado ósseo neoformado.

Em alguns animais do G3 evidenciou-se a presença de trabéculas ósseas neoformadas ocupando parcialmente o espaço entre a parede óssea pré-existente. Adjacentes ao trabeculado ósseo neoformado, observou-se nestes espécimes, extensas

áreas ocupadas por estruturas pouco definidas, como também a presença de coágulo em degeneração. Já em outros animais do grupo, o espaço entre as paredes ósseas pré existentes, encontrou-se ocupado quase totalmente por trabéculas ósseas pouco definidas (Figura E). Foi observado em dois animais do Grupo 3 controle a presença de delgadas trabéculas ocupando o espaço entre as paredes ósseas pré-existentes. Nos demais casos notam-se a presença de trabécula óssea neoformadas ocupando parcialmente o espaço entre as paredes ósseas pré existentes. As áreas com ausência de neoformação óssea encontram-se ocupadas por estrutura com características de coágulo sanguíneo em degeneração (Figura F). Outro fato relevante foi à ausência de tecido conjuntivo sem diferenciação óssea e osteoblastos, entre as trabéculas ósseas neoformadas que foi observado em todos os grupos tanto dos controles quanto dos tratados.

Análise Histomorfométrica

A análise dos resultados da histomorfometria dos animais pertencentes aos Grupos 1, 2 e 3 encontram-se discriminados de acordo com o grau de significância estatística. Na Tabela 1 encontram-se apresentados e comparados os resultados das médias e erro padrão da porcentagem de osso neoformado dos membros, controle e tratado de cada grupo.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

As análises histológicas e histomorfométricas expressam a influência do ultrassom pulsado de baixa intensidade no reparo de tíbias submetidas à suspensão pela cauda ou não.

Nos resultados histológicos as tíbias tratadas do Grupo 1 não demonstraram diferenças consideráveis, quando comparado ao controle, observa-se em ambos a presença de delgadas trabéculas neoformadas ocupando todo o espaço entre as bordas defeito ósseo pré existente, o que pode indicar a formação de um calo de fixação externo (26). Nos Grupos 2 e 3, diferentemente do G1 observou-se a presença de trabéculas neoformadas, preenchendo totalmente o espaço entre as paredes pré existentes. Diferentemente do grupo 1 em ambos os grupos de ratos suspensos, as tíbias controle apresentaram áreas ocupadas por coágulo sanguíneo e estruturas em diferenciação que indicam um estágio inicial de reparo. De acordo com Einhorn (27), o processo de reparo ósseo e diferenciação celular passam por dois estágios: o primeiro, envolvendo o processo inflamatório, a diferenciação e o início da ossificação; e por último, a ossificação e remodelação gradual ocorrendo o restabelecimento da arquitetura com a formação original óssea.

Em todos os espécimes, de todos os grupos houve a ausência de células osteogênicas e em vários grupos observou-se a ausência de tecido conjuntivo em diferenciação, entre as trabéculas ósseas neoformadas. Hoyer e Lippert (28) determinaram as propriedades mecânicas do fêmur, da tíbia e do úmero de animais testados em flexão, e concluíram que não houve diferença nas propriedades mecânicas entre os ossos frescos e os congelados a -20°C. Silva e Volpon (5) para a conservação das peças utilizaram à mesma técnica de congelamento dos fragmentos ósseos a temperatura de - 20°C, para posterior análise. A mesma técnica abordada por Silvia e Volpon (5) foi utilizada para conservação das tíbias no presente trabalho, entretanto, as amostras de tecido ósseo foram submetidas a outros procedimentos, sendo provável que

devido ao manuseio excessivo, associado às alterações bruscas de temperatura, danos teciduais possam ter ocorrido. A ausência de células osteogênicas, provavelmente deve-se a descalcificação, a qual foi submetido o material biológico antes da análise histológica.

Os resultados da análise histomorfométrica do Grupo 1 revelaram uma diferença significativa quando comparados com os resultados do Grupo 2 e 3 tratados e controle, sendo o volume de tecido neoformado dos animais do G1 inferior aos demais. Silva e Volpon (5) diferentemente observaram que a simulação de microgravidade por suspensão de 7 a 21 dias, promoveu uma redução significativa na maioria das propriedades mecânicas da tíbia e fíbula, quando comparado aos grupos controles não suspensos. Segundo Schimitz e Hollinger (29) uma lesão óssea de 4x2mm é um tamanho crítico, pela sua extensão. Tal defeito, pode elucidar os achados do Grupo 1, onde foi observado na maioria dos espécimes a formação de calo ósseo, característico de cicatrização secundária, que segundo Dobleré (26) e Pinheiro (30), ocorre quando não há estabilidade necessária para o reparo do defeito. Os animais dos Grupos 2 e 3 sofrendo o mesmo defeito ósseo que o Grupo 1, não foram submetidos a descarga de peso no local da lesão, uma vez que, por permanecerem suspensos, não sofreram movimentação da região lesionada, proporcionando assim, estabilidade ao defeito ósseo.

Consolidação da fratura é um importante tópico de pesquisa na fisioterapia ortopédica devido à dificuldade de se promover um pós-operatório adequado e evitar a descarga de peso precoce ou excessivo do local fraturado. Embora a evolução da consolidação óssea dependa de muitos fatores, tais como estímulo mecânico e a

descarga peso é importante que no âmbito clínico, exista uma orientação quanto ao excesso de estímulos e suas consequências.

Na comparação entre os resultados histomorfométricos do reparo ósseo as tíbias tratadas revelaram um aumento no volume tecidual em relação às tíbias controle. No entanto apenas o G2 e G3 demonstraram diferença estatisticamente significativa em relação ao G2c e G3c, demonstrando que o tratamento com ultrassom influenciou no reparo ósseo, apesar desses animais terem sido submetidos a ambientes de microgravidade. Corroborando com os achados de Lirani, (24) que após avaliar, o defeito experimental de ratos tratados com ultrassom e laser, pela histomorfometria e pelo ensaio mecânico de flexão, concluiu que o ultrassom acelerou o reparo ósseo. Colucci (25) utilizando o tratamento de ultrassom de baixa intensidade, a análise histomorfométrica, verificou junto das espiras do pós implante a presença de tecido calcificado mais intenso.

Conclui-se que o tratamento com ultrassom contribuiu pra acelerar o reparo ósseo independente da presença ou ausência da descarga de peso e que outros fatores relacionados com a metodologia possam ter corroborado para os nossos resultados.

Agradecimento

A Patrícia de Athayde Barnabé, assistente de suporte acadêmico II do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal - UNESP/Araçatuba, SP.

A Marta Paccanaro Peres, técnica da disciplina de Histologia do Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal - UNESP/Araçatuba, SP.

REFERÊNCIAS

1. Diniz JS, Dionisio VC, Nicolau RA; Pacheco MTT. Propriedades mecânicas do osso: uma revisão bibliográfica. In: Anais do IX Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e V Encontro Latino Americano de Pós-Graduação; 2005, São José dos Campos. São José dos Campos: Universidade do Vale do Paraíba;2005. p.1363 -1366.
2. Johnson RB. The bearable lightness of being: bones, muscles, and spaceflight. *Anat Rec.* 1998; 253: 24-27.
3. Douglas C, Douglas NA. Fisiologia do osso. In: Douglas CR. Tratado de fisiologia aplicada as ciências médicas. São Paulo: Guanabara Koogan, 2006. p.1243-1257.
4. Shimano MM, Volpon JB. Comportamento Mecânico do terço proximal de fêmures de ratos após período de suspensão pela causa e exercitação. *Acta Ortop. Bras.* 2007;15(5):22-31.
5. Silva AV, Volpon J.B. Modelo de simulação de microgravidade e seu efeito em algumas propriedades mecânicas do osso do rato. *Acta Ortop. Bras.*2004; 12: 22-31.
6. Yamada BFA. Úlceras venosas. In: Jorge SS, Dantas SRPE. Abordagem multiprofissional no tratamento de feridas. São Paulo: Atheneu, 2003. p.247-259.
7. Ter Harr G. Basic physics of therapeutic ultrasound. *Physiotherapy* 1987;73:110-123.
8. Guirro RRJ. O uso da hidroxiapatita associada a estimulação ultra-sônica pulsada de baixa intensidade na correção de falha óssea. Estudo experimental em coelhos [dissertação]. São Carlos: Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto Universidade de São Paulo; 1995.
9. Duarte LR. The stimulation of bone growth by ultrasound. *Arch Orthop Trauma Surg* 1983;101(3):153-159.

10. Gonglaves RC, Gonçalves AL, Balducci-Roslindo E. Efeitos do ultra-som de baixa intensidade em defeito ósseo do ramo da mandíbula. Estudo histológico em ratos. Rev Odontol UNESP 2007; 36(3):193-199.
11. Apolinário JC. Aplicação de ultrassom de baixa intensidade na reparação óssea em ratos sob ausência de carga. Análise densitométrica e biomecânica [dissertação]. Araçatuba: Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista; 2008.
12. Riso NDM. Influência do laser terapêutico no reparo de defeito ósseo de ratos submetidos à ausência de carga: análise densitométrica. [dissertação]. Araçatuba: Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista; 2008.
13. Carvalho DCL, Carvalho MM, Clique A. Osteoporose por Desuso: Aplicação na Reabilitação do Lesado Medular. Acta Ortop Bras. 2001; 9(3):34-43.
14. Warden S J, Bennell KL, Forwood MR, McMeeken JM, Wark JD. Skeletal effects of low-intensity pulsed ultrasound on the ovariectomized rodent. [Ultrasound Med Biol.](#) 2001; [27\(7\)](#):989-998.
15. Jorge FA J. Influencia da estimulação ultrassônica de baixa intensidade no reparo de osteotomias de tíbias fixadas com fixação felxivel. [dissertação] São Carlos: Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto Universidade de São Paulo; 2004.
16. Takikawa S, Matsui N, Kokubu T, Tsunoda M, Fujioka H, Mizuno K, Azuma Y. Low-intensity pulsed ultrasound initiates bone healing in rat nonunion fracture model. J. Ultrasound Med. 2001; 20(3):197-205.

17. Kristiansen TK, Ryaby JP, McCabe J, Frey JJ, Roe LR. Accelerated healing of distal radial fractures with the use of specific, low-intensity ultrasound. *J Bone Joint Surg Am.* 1997; 79:961–973.
18. Kokubu T, Matsui N, Fujioka H, Tsunoda M, Mizuno K. Low Intensity Pulsed Ultrasound Exposure Increases Prostaglandin E₂ Production via the Induction of Cyclooxygenase-2 mRNA in Mouse Osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 256(2): 284-287.
19. Naruse K, Miyauchi A, Itoman M, Mikuni-Takagaki Y. Anabolic response of mouse –morrow- derived stromal clone ST2 cells to low-intensity pulsed ultrasound. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 268:216-220.
20. Kasper CE, McNulty AL, Otto AJ, Thomas DP. Alterations in skeletal muscle related to impaired physical mobility: an empirical model. *Res Nurs Health* 1993;16:265-273.
21. Martin TP, Edgerton VR, Grindeland RE. Influence of spaceflight on rat skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 1988;65:2318-2325.
22. Musacchia XJ, Steffen JM, Deavers DR. Rat hindlimb muscle responses to suspension hypokinesia/hipodynamia. *Aviation space and environmental. Medicine.* 1983;54:1015-1020.
23. Cowin SC. On Mechanosensation in bone under microgravity. *Bone.* 1998; 22(5): 119-125.
24. Lirani APR. Estudo comparativo dos efeitos do Ultra-som e do Laser de Baixa Potência no reparo ósseo de tibia de rato [dissertação]. São Carlos: Escola de

Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto Universidade de São Paulo; 2004.

25. Colucci ARS. Efeitos do ultrassom de baixa intensidade na osteointegração de implantes de titânio em tíbias de coelhos: Avaliação histomorfométrica e mecânica. [dissertação]. São Carlos: Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto Universidade de São Paulo; 2002.

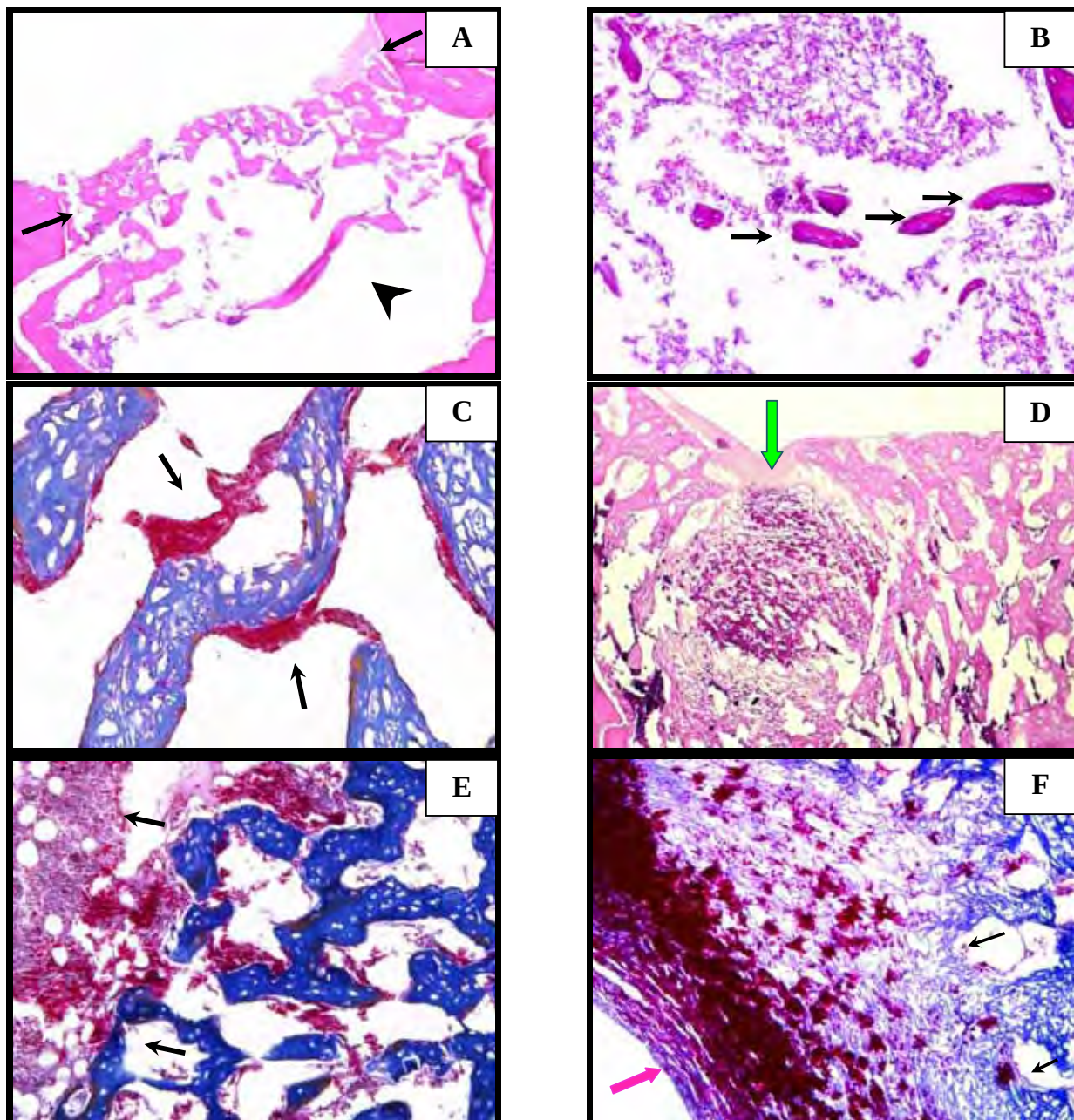
26. Doblaré M, García JM, Gómez MJ. Modeling bone tissue fracture and healing: a review. Eng Fract Mech. 2004; 17(13/14):1809-1840.

27. Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. Clin Orthop Rel Res 1998; (355):7–21.

28. Hoyer HE, Lipper TH. Biomechanical change in long bones of han – wistar rats during postnatal development. Anat Embryol. 1982; 64(1):101-111.

29. Shimitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for cranio mandibulofacial nonunions. Clin. Orthop. 1986; 205: 299-308.

30. Pinheiro ALB, Gerbi ME. Photoengineering of bone repair processes. Photomed Laser Surg. 2006; 21:169-178.



FIGURAS:(A) Fotomicrografias do **G1 tratado**: Fechamento do defeito em toda sua extensão com presença de tecido ósseo neoformado indicados pelas setas, e a cabeça de seta indica a região com ausência células e tecido em diferenciação. Hematoxilina/Eosina. Objetiva 4(zoom digital). **(B)** Fotomicrografias do **G1 controle**: As setas pretas indicam as espículas ósseas. Hematoxilina/Eosina. Objetiva 20. **(C)** Fotomicrografias do **G2 tratado**: As setas indicam as áreas ocupadas por estruturas com características de coágulo em degeneração. Objetiva 40. Tricômico de Mallory. **(D)** Fotomicrografias grupo **G2 controle**: observa se as extensas áreas ocupadas por coágulos sanguíneos indicados pelas seta verde. Coloração em Hematoxilina/Eosina.

Objetiva 4(zoom digital). **(E) Fotomicrografias do G3 tratado:** As setas indicam as áreas ocupadas por coágulo em degeneração e tecidos em diferenciação. Tricômico de Mallory. Objetiva 20. **(F) Fotomicrografias G3 controle:** As setas pretas indicam as delgadas trabéculas sendo preenchida por extensas áreas com coágulos sanguíneos, representadas pela seta rosa. Tricômico de Mallory. Objetiva de 20.

Avaliação histológica e histomorfométrica do reparo ósseo em tíbias osteotomizadas de ratos (*Rattus norvegicus albinus*) frente à ausência de carga e tratamento com ultrassom

Tabela 1 - Resultados expressos das Médias ($\bar{x}$) e desvio padrão (S) da porcentagem de osso neoformado, segundo os grupos: G1 defeito ósseo + ultrassom + não suspensos; G2 defeito ósseo + suspensão pela cauda por 15 dias + ultrassom; G3 Suspensão inicial de 21 dias + defeito ósseo + ressuspensão por 15 dias + ultrassom

Porcentagem de osso neoformado ($\bar{x} \pm S$)		
Grupo/n	Grupos Tratado - tíbia direita (G _t)	Grupo Controle - tíbia esquerda (G _c)
G1 (n=6)	13,62 $\pm$ 4,88 bA	8,68 $\pm$ 4,16 aA
G2 (n=5)	27,17 $\pm$ 11,36 aA	10,10 $\pm$ 7,90 aB
G3 (n=7)	23,19 $\pm$ 5,61 aA	15,74 $\pm$ 7,08 aB

*(p> 0,05)

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de "Student-Newman-Keuls" (SNK).

Avaliação histológica e histomorfométrica do reparo ósseo em tíbias osteotomizadas de ratos (*Rattus norvegicus albinus*) frente à ausência de carga e tratamento com ultrassom