

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**"O USO DO ULTRA-SOM PULSADO DE BAIXA
INTENSIDADE EM FALHAS ÓSSEAS PRODUZIDAS
EXPERIMENTALMENTE EM RÁDIO DE COELHOS,
PREENCHIDAS OU NÃO COM CIMENTO DE FOSFATO DE
CÁLCIO”.**

**Paola Castro Moraes
Médica Veterinária**

**JABOTICABAL – SÃO PAULO- BRASIL
Maio de 2006**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**"O USO DO ULTRA-SOM PULSADO DE BAIXA
INTENSIDADE EM FALHAS ÓSSEAS PRODUZIDAS
EXPERIMENTALMENTE EM RÁDIO DE COELHOS,
PREENCHIDAS OU NÃO COM CIMENTO DE FOSFATO DE
CÁLCIO”.**

Paola Castro Moraes

Orientador: Prof. Dr. João Guilherme Padilha Filho

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Cirurgia Veterinária (Cirurgia Veterinária).

**JABOTICABAL – SÃO PAULO- BRASIL
Maio de 2006**

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

PAOLA CASTRO MORAES - nascida em 22 de novembro de 1975, em São Paulo, é Médica Veterinária formada pela Universidade Estadual Paulista (UNESP-Câmpus de Jaboticabal) em 1998. Participou do Programa de Aprimoramento em Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais de fevereiro de 1999 a janeiro de 2001 na mesma universidade. Em março de 2001, iniciou curso de Pós-Graduação, em nível de Mestrado, área de concentração em Cirurgia Veterinária, junto à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP - Câmpus de Jaboticabal, obtendo o título de Mestre, em agosto de 2002, sob orientação do Prof. Dr. João Guilherme Padilha Filho. Em março de 2003, iniciou curso de Pós-Graduação em nível de Doutorado, junto à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP – Câmpus de Jaboticabal. Desde agosto de 2002 é docente na Faculdade de Medicina Veterinária do Centro Universitário Barão de Mauá, em Ribeirão Preto, onde ministra as disciplinas de Técnica Cirúrgica e Anestesiologia, Patologia e Clínica Cirúrgica e Obstetrícia Animal, além de permanecer na Faculdade diariamente para orientação didática e realização de cirurgias na rotina hospitalar do Câmpus.

Ofereço

*Ao meu marido Mário, meu amor e meu porto
seguro, sempre... E à nossa pequena Luisa, que
ainda nem chegou e já é tão amada... Amo
você!!*

*"Sonho que se sonha só, é só um sonho. Mas
sonho que se sonha junto é realidade!".
(Raul Seixas)*

Dedico
A meus pais Miguel e Dulcinéia,
à minha irmã Vanessa,
ao meu querido sobrinho Matheus.
Por serem meus referenciais de vida.
Obrigada por tudo, sempre. Amo vocês!

*"É na família que nasce o primeiro passo de
uma grande caminhada."*

Agradecimento
Ao Prof. Dr. João Guilherme Padilha Filho,
meu orientador e amigo há vários anos, que
sempre me inspirou na arte da cirurgia, com sua
competência, tranquilidade e sabedoria. Com
certeza tenho muito que agradecer sempre.
Muito obrigada!

Agradecimento Especial
Ao Prof. Dr. Affonso Luiz Ferreira, que além da
grande participação neste trabalho, é um lindo
exemplo de vida a ser seguido. É uma pessoa
que estará comigo sempre no meu coração.
Obrigada!

AGRADECIMENTOS

- A Deus, em primeiro lugar...,
- Aos animais utilizados neste trabalho,
- À minha avó Antônia, que eu tanto amo, e a toda a minha família,
- À minha segunda família, em especial ao Sr. Sérgio, D. Lú, D. Pina e Sr. Mário, por me acolherem há tantos anos,
- Aos meus amigos de todas as horas, Clau e Patto, meus irmãos do coração que eu amo...,
- Aos meus amigos, em especial a Érika,
- À amiga Isabela, pela ajuda indispensável, de todas as maneiras,
- Ao Prof. Canola pela ajuda e amizade sempre,
- Ao Prof. Newton, pelas conversas, apoio e ensinamentos,
- Ao Prof. Daleck, pela participação no exame de qualificação e apoio sempre,
- À Prof^a Márcia, pela amizade e ajuda,
- Ao Prof. Fabrício, pela participação na banca e considerações importantes,
- À Ângela, pela correção deste trabalho,
- A todos os professores da UNESP- Jaboticabal, que sempre me ajudaram de alguma maneira,

- À Ana Rosa Crisci, pela leitura do histopatológico e pela ajuda em todos os momentos,
- Aos meus amigos Denise, Serginho, Geison, Osmar, Marluce, Sandra, Lenise, Valtair, Maira, Júnior e todos os funcionários do Câmpus Veterinário Barão de Mauá, pela ajuda e pelo carinho.
- A todos aqueles que colaboraram de alguma forma, e que não foram citados, meu muito obrigada.

“A glória da amizade não é a mão estendida, nem o sorriso carinhoso, nem mesmo a delícia da companhia. É a inspiração espiritual que vem quando você descobre que alguém acredita e confia em você”.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
RESUMO.....	vii
SUMMARY.....	viii
1- INTRODUÇÃO.....	1
2- REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1- O TECIDO ÓSSEO.....	2
2.1.1- Células Ósseas.....	3
2.1.2- Propriedades Elétricas do Osso.....	4
2.2- CONSOLIDAÇÃO DE FRATURAS E FALHAS ÓSSEAS.....	4
2.3- ENXERTOS ÓSSEOS.....	5
2.4- BIOMATERIAIS.....	7
2.4.1- Cimento à base de fosfato de cálcio (CFC).....	8
2.5- EFEITOS DO ULTRA-SOM PULSADO DE BAIXA INTENSIDADE (USP) NO TECIDO ÓSSEO.....	11
3- MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1- ANIMAIS.....	13
3.2- GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	13
3.2.1- Grupo Tratado (GT).....	13
3.2.2- Grupo Controle (GC).....	13
3.3- PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.....	14
3.4- CIMENTO ÓSSEO.....	17
3.5- ULTRA-SOM PULSADO DE BAIXA INTENSIDADE (USP).....	18
3.6- AVALIAÇÃO PÓS-OPERATÓRIA.....	19
3.6.1- Avaliação Clínico-cirúrgica.....	19
3.6.2- Avaliação Radiográfica.....	19
3.6.3- Avaliação Histopatológica.....	19
4- RESULTADOS.....	20
4.1- AVALIAÇÃO CLÍNICO-CIRÚRGICA.....	20
4.2- AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA.....	20
4.3- AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA.....	27

5- DISCUSSÃO.....	31
6- CONCLUSÃO.....	34
7- REFERÊNCIAS.....	35

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Avaliação radiográfica dos animais pertencentes ao grupo controle (GC 15), relacionando as reações observadas nas interfaces proximais e distais, nas falhas com e sem preenchimento de α - TCP, com os dias do pós-operatório.....	25
TABELA 2: Avaliação radiográfica dos animais pertencentes ao grupo controle (GC 30), relacionando as reações observadas nas interfaces proximais e distais, nas falhas com e sem preenchimento de α - TCP, com os dias do pós-operatório.....	25
TABELA 3: Avaliação radiográfica dos animais pertencentes ao grupo tratado (GT 15), relacionando as reações observadas nas interfaces proximais e distais, nas falhas com e sem preenchimento de α - TCP, com os dias do pós-operatório.....	26
TABELA 4: Avaliação radiográfica dos animais pertencentes ao grupo tratado (GT 30), relacionando as reações observadas nas interfaces proximais e distais, nas falhas com e sem preenchimento de α - TCP, com os dias do pós-operatório.....	26

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1: Imagens fotográficas do procedimento cirúrgico para confecção da falha óssea. Em A, a diáfise do rádio é exposta através de divulsão da musculatura adjacente; em B, uma lâmina metálica é posicionada entre o rádio e a ulna; em C, a ostectomia parcial é iniciada com o auxílio de micro serra; em D, falha óssea já pronta para receber o cimento de fosfato de cálcio (E- seta) e em F, sutura da musculatura afastada.....16
- FIGURA 2: Imagem fotográfica do cimento de fosfato de cálcio adicionado com fibras de náilon para o preenchimento de falha óssea.....17
- FIGURA 3: Imagem fotográfica do aparelho de ultra-som, modelo 1131-G (Imbrassom Ind. e Com.) e gel acoplante hidrossolúvel.....18
- FIGURA 4: Imagem radiográfica de falha óssea em rádio de coelho do grupo controle (sem estimulação pelo USP), sem o preenchimento do α -TCP. Em A, pós-operatório imediato; em B, as setas indicam reação periosteal nas interfaces proximal e distal, aos **30 dias** de pós-operatório.....22
- FIGURA 5: Imagem radiográfica de falha óssea em rádio de coelho do grupo controle (sem estimulação pelo USP), com o preenchimento do α -TCP. Em A, pós-operatório imediato; em B, a seta indica início de reação periosteal na interface proximal, aos **30 dias** de pós-operatório.....23

FIGURA 6: Imagem radiográfica de falha óssea em rádio de coelho do grupo tratado (com estimulação pelo USP), aos **15 dias** de pós-operatório. Em A, falha óssea sem o preenchimento do α - TCP; em B, com α -TCP. As setas indicam reação periosteal, mais evidente na interface proximal.....23

FIGURA 7: Imagem radiográfica de falha óssea em rádio de coelho do grupo tratado (com estimulação pelo USP), aos **30 dias** de pós-operatório. Em A, falha óssea sem o preenchimento do α - TCP; em B, com α -TCP. As setas indicam intensa reação periosteal nas interfaces proximais e distais, e o fechamento da falha óssea.....24

FIGURA 8: Imagem radiográfica de falha óssea em rádio de coelho do grupo tratado (com estimulação pelo USP), aos **30 dias** de pós-operatório. Em A, falha óssea com o preenchimento do α - TCP; em B, sem α -TCP. Observa-se reação periosteal nas interfaces proximais e distais, e o fechamento da falha óssea, mais evidente em A.....24

FIGURA 9: Fotomicrografias de cortes das áreas de falhas ósseas induzidas experimentalmente na diáfise do rádio de coelhos pertencentes ao grupo controle (GC 15 e GC 30) sem preenchimento pelo α - TCP (A e B), e com o preenchimento (C e D). Em A (10X), aos 15 dias, notar organização tecidual menos evoluída que em B (30 dias- 4X). Em C (10X), aos 15 dias, notar arranjo celular ao redor do implante com menor intensidade que em D (30 dias- 10X). A seta negra indica presença de condroblastos hipertrofiados precursores de osteócitos dispostos ao redor do implante. HE.....28

FIGURA 10: Fotomicrografias de cortes das áreas de falhas ósseas induzidas experimentalmente na diáfise do rádio de coelhos pertencentes ao grupo tratado (GT 15), sem o preenchimento pelo α - TCP (A e B) e com o preenchimento (C e D). Em A, a seta mostra área de tecido fibroso e uma celularidade menor do que observado nas figuras C e D (seta indicando cortes transversais das fibras de náilon circundados por células ósseas). HE.....29

FIGURA 11: Fotomicrografias de cortes das áreas de falhas ósseas induzidas experimentalmente na diáfise do rádio de coelhos pertencentes ao grupo tratado (GT 30) sem o preenchimento pelo α - TCP (A e B) e com o preenchimento (C e D). Observa-se em B (4X) e C (10X), presença de tecido ósseo primário neoformado (asterisco), sendo este mais evoluído em C (10X) (com α - TCP). HE.....30

RESUMO:

Foi utilizado na presente pesquisa o ultra-som pulsado de baixa intensidade, com a finalidade de avaliar, experimentalmente, seus efeitos sobre a reparação de falhas ósseas produzidas em rádio de coelhos, preenchidas ou não com o cimento de fosfato de cálcio adicionado com fibras de náilon. Foram utilizados 12 coelhos, raça Nova Zelândia, separados em dois grupos experimentais iguais (n=6) e escolhidos aleatoriamente (Grupo Tratado- GT e Grupo Controle-GC). As falhas ósseas de aproximadamente oito milímetros de extensão foram produzidas na diáfise de ambos os rádios, sendo as do membro direito preenchidas com o cimento de fosfato de cálcio sob a forma granulada e as do esquerdo, não preenchidas. Os animais do grupo tratado receberam estímulo pelo ultra-som pulsado de baixa intensidade durante 15 minutos nos primeiros cinco dias e dez minutos nos cinco dias seguintes, em ambos os membros. Os animais do grupo controle não foram estimulados pelo ultra-som. O controle radiográfico foi realizado no pós-operatório imediato e aos sete, 15 e 30 dias, de acordo com o tempo de observação de cada subgrupo (15 e 30 dias). Após o sacrifício, as áreas que continham as falhas ósseas foram processadas para a avaliação histopatológica. Os resultados das análises radiográfica e histopatológica revelaram uma evolução mais rápida e intensa da proliferação de tecido ósseo nas falhas, preenchidas ou não pelo cimento, porém que receberam estímulo pelo ultra-som. Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que o ultra-som pulsado de baixa intensidade é ser um recurso extremamente eficaz na aceleração do processo de ossificação e que, associado ao cimento de fosfato de cálcio com fibras de náilon, tem este processo intensificado, demonstrando, assim, o poder osteoindutor deste biomaterial.

Palavras-chave: ultra-som pulsado de baixa intensidade; coelho; cimento ósseo; falhas ósseas.

SUMMARY

The present experimental research evaluated the effects of low intensity pulsed ultrasound for repair bone defects produced in rabbit's radius, filled in or not with calcium phosphate cement incorporated with nylon fibers. Twelve rabbits, from the New Zealand lineage, were randomly allocated in two equal experimental groups. An eight millimeters bone gap was surgically produced in the radius bone diaphysis and filled with the cement (right radius). The left limb bone gap remained empty. Animals were submitted to sessions of pulsed ultrasonic stimulus for 15 minutes during five days and ten minutes during more five days, in both radius. Radiological examinations were performed in the immediate postoperative and seven, 15 and 30 days after surgery (according with the postoperative follow-up - 15 and 30 days). The bone defects were collected and submitted to optical microscopy. The results showed an increase and faster evolution of ossification's process in the bone defects, filled or not with the bone cement, but that received stimulus by ultrasound when compared to the control group. These results suggest that low-intensity pulsed ultrasound is an effective resource for acceleration of the ossification process and, when combined with calcium phosphate cement, this effect was increased.

Key-words: low-intensity pulsed ultrasound; rabbit; bone cement; bone gaps.

1. INTRODUÇÃO

Estudos sobre a consolidação óssea, cada vez mais ganham ênfase na ortopedia, principalmente no que concerne à diminuição no tempo de consolidação, fato que ainda é um desafio (CROCI et al., 2003). Relativamente à Ortopedia Veterinária, esta necessidade se torna ainda maior, pela dificuldade de se promover repouso adequado aos pacientes e, dessa forma, impedir sobrecarga precoce ao osso fraturado, mesmo após a osteossíntese.

Há muito tempo, o homem tem se preocupado em restaurar ou substituir partes danificadas do tecido ósseo humano. Em meados do século XVII, Fallopius implantou uma placa de ouro para restaurar um defeito craniano e, a partir daí, os implantes são utilizados para substituir as partes danificadas do sistema ósseo (SANAN; HAINES, 1997). Em 1668, o cirurgião Job van Meek obteve o primeiro sucesso em tratamento de defeito ósseo utilizando a técnica da enxertia óssea (BLOKHUIS et al., 2000).

Nesse contexto, a área de pesquisa relacionada à engenharia de biomateriais vem crescendo significativamente, na busca de materiais que facilitem a regeneração óssea em fraturas ou em casos de falhas ósseas decorrentes de não-uniões e neoplasias. Apesar do grande número de estudos relacionados a esses materiais, ainda não foi descrito um produto que seja ideal, quando utilizado isoladamente. O cimento de fosfato de cálcio tem sido amplamente empregado em diversos estudos para esta finalidade, sendo comprovada sua biocompatibilidade em diferentes modelos experimentais (SANTOS et al., 2000; MORAES, 2002; ARINZEH et al., 2003; MORAES et al., 2004; ORIÁ, 2005).

Assim, a implementação de terapias alternativas que possam auxiliar na recuperação de fraturas ou acelerar o crescimento ósseo no caso de falhas segmentares são muito importantes, por minimizar o tempo e custo do tratamento, garantindo retorno precoce da função do membro acometido. O ultra-som pulsado de baixa intensidade tem sido empregado em diversos estudos com este objetivo, e seus efeitos biológicos comprovados na reparação de fraturas (CARRO, 1998;

SOUSA, 2003; LIRANI, 2004), em nervos periféricos (CRISCI; FERREIRA, 2002), lesões musculares e tendíneas (MELO et al., 2005).

Desta forma, com este trabalho objetivou-se avaliar radiográfica e histopatologicamente:

- a eficácia do ultra-som pulsado de baixa intensidade em falhas ósseas produzidas experimentalmente no rádio de coelhos, preenchidas ou não com cimento à base de fosfato de cálcio associado a fibras de náilon;
- a influência do cimento de fosfato de cálcio associado a fibras de náilon no processo de reparação óssea, com e sem a utilização do ultra-som pulsado de baixa intensidade.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O TECIDO ÓSSEO

O tecido ósseo pode ser considerado uma forma altamente especializada de tecido conjuntivo, no qual a matriz extracelular é mineralizada conferindo-lhe rigidez e mantendo algum grau de elasticidade. Além de sua função de suporte, o osso é a maior reserva primária de cálcio do organismo, íon que participa intensamente da manutenção do pH interno do corpo, assim como da transmissão e condução do impulso elétrico em nervos e músculos, incluindo o músculo cardíaco (DEMPSTER, 1999).

A matriz óssea consiste de substâncias orgânicas, principalmente colágeno tipo I, sendo a menor parte composta por proteoglicanas e proteínas não colágenas. A porção inorgânica é basicamente constituída por sais de cálcio e fosfato na forma de cristais de hidroxiapatita (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1990; LIRANI, 2004).

Macroscopicamente o osso compõe-se de porção cortical e porção esponjosa. O osso cortical é denso, presente no eixo de ossos longos, em que a matriz de colágeno está organizada em forma de lamelas concêntricas, geralmente ao redor de um canal vascular central constituindo o sistema de

Havers. Os canais centrais contendo nervos e vasos sanguíneos comunicam-se entre si e com a cavidade medular óssea através dos canais de Volkmann. A superfície óssea externa é revestida por uma membrana denominada perióstio e a superfície interna, pelo endóstio. Ambas têm a função de nutrir o osso, além de servir como fonte de osteoblastos para a osteogênese (KAPLAN et al., 1994; LIRANI, 2004).

O osso esponjoso ou trabecular apresenta uma matriz mais porosa, organizada em trabéculas preenchidas por medula óssea vermelha, na qual há produção ativa de células sanguíneas a partir de células mesenquimais, possuindo, assim, metabolismo mais intenso que o osso cortical (BETTI, 2004).

2.1.1. Células Ósseas

Os tipos principais de células ósseas são osteoblastos, osteoclastos e osteócitos, todas derivadas da mesma linha de células osteoprogenitoras (LIRANI, 2004).

Os osteoblastos são responsáveis pela osteogênese, ou seja, pela síntese e secreção da matriz orgânica, além de armazenarem minerais e revestirem a maioria das superfícies ósseas. Quando em atividade, os osteoblastos se hipertrofiam e o núcleo (com nucléolo evidente) se desloca para a extremidade mais distante da superfície óssea (BANKS, 1992).

Os osteoclastos são células gigantes multinucleadas derivadas dos macrófagos e responsáveis pela remoção do osso, processo denominado osteoclastia. Possuem os mecanismos celulares necessários para dissolução dos materiais ósseos e para a digestão da matriz orgânica. Estas células têm numerosos núcleos no interior do citoplasma acidófilo e vacuolizado. São polarizadas, e os núcleos deslocados para a periferia celular oposta ao osso. A borda adjacente ao osso é composta por numerosos processos celulares – “borda em escova” (BANKS, 1992). Acredita-se que o osteoclasto bombeie íons hidrogênio (H^+) e cloro (Cl^-) através da borda em escova, originando ácido clorídrico (HCl) que dissolve a hidroxiapatita e secrete collagenase e outras proteases que degradam a matriz orgânica óssea (BETTI, 2004).

Os osteócitos são osteoblastos maduros incorporados à matriz óssea mineralizada, e provavelmente participam da sua manutenção, isto é, sua síntese e absorção em extensão limitada (LIRANI, 2004).

2.1.2. Propriedades elétricas do osso

O tecido ósseo vivo, da mesma forma que outros sistemas tissulares biológicos, apresenta potenciais estáveis de repouso, registrados na faixa de micro volts (CARRO, 1998). Em estudo com ossos humanos, Fukada e Yasuda (1957) constataram a piezoeletricidade do osso quando uma força de cisalhamento foi aplicada às fibras de colágeno. A piezoeletricidade do material foi observada quando este produziu, sob ação de carga mecânica, uma polarização elétrica, convertendo então energia mecânica em elétrica (XAVIER; DUARTE, 1983; CARRO, 1998; LIRANI, 2004). Os potenciais elétricos funcionam como um sistema sinalizador para as células adjacentes (osteoblastos e osteoclastos), instruindo-as a aumentar ou diminuir a formação ou absorção de tecido ósseo (KODAMA, 2003).

2.2. CONSOLIDAÇÃO DE FRATURAS E FALHAS ÓSSEAS

A consolidação óssea é um processo extremamente complexo que pode ser dividido em três estágios principais: fase inflamatória, reparo e remodelação (SOUSA, 2003).

A fase inflamatória começa imediatamente após a fratura e ocorre aproximadamente nas primeiras duas a três semanas. No período de 48 horas o exsudato do hematoma contém vários mediadores inflamatórios, fatores angiogênicos e do crescimento liberados pelas plaquetas, células locais, mastócitos, macrófagos, neutrófilos e linfócitos (SOUSA, 2003).

Os estágios de reparo após fratura ou osteotomia e sua relação com o suprimento sangüíneo são fundamentais. Os leitos circulatórios tanto medulares quanto periosteais proliferam muito, mas o sistema arterial medular representa um papel fundamental no suprimento sangüíneo para a formação do calo ósseo. O

predomínio desse suprimento medular aumenta à medida que progride a fase de reparação (GUIRRO, 1995; CROCI et al., 2003; SOUSA, 2003).

A característica mais evidente nos estágios iniciais do processo de reparo é a proliferação de células do periósteo próximo à fratura. Tais células são precursoras de osteoblastos, que posteriormente sedimentarão a substância intercelular (CROCI et al., 2003).

O tecido celular formado após a fratura amadurece e as células originam os osteoblastos ou condroblastos. Os osteoblastos depositam uma matriz intercelular de colágeno e polissacarídeos que se torna impregnada de sais de cálcio, formando o osso primário, que se transforma gradualmente, pela ação dos osteoblastos, em osso amadurecido, com estrutura lamelar típica, denominado calo ósseo (CROCI et al., 2003; BETTI, 2004). Este calo é posteriormente reabsorvido e remodelado, pelas forças que atuam no osso em função (BETTI, 2004). Neste processo, atuam os osteoclastos e osteoblastos, removendo e depositando osso respectivamente (SOUSA, 2003). Essas células são conhecidas como Unidade Óssea Multicelular (BMU- Bone Multicelular Unit), e a interação de suas atividades é responsável pela remodelação óssea. “In vitro”, os osteoclastos reabsorvem osso em resposta a fatores liberados por osteoblastos estimulados. Por outro lado, a reabsorção óssea libera fatores que recrutam e ativam os osteoblastos (BETTI, 2004).

A falha destes processos biológicos, bem como violação dos princípios da cirurgia ortopédica podem causar distúrbios na reparação de fraturas, tendo como consequência a ocorrência de união retardada ou não-união (PERKA et al., 2000; SCHMAEDECKE, et al., 2003). Além disso, traumas, anormalidades do desenvolvimento, neoplasias e diversas patologias podem provocar defeitos ósseos (PERKA et al., 2000; CLOKIE et al., 2002; ARINZEH et al., 2003).

2.3. ENXERTOS ÓSSEOS

O tecido ósseo é considerado ideal para enxertos, uma vez que pode ser transplantado com sucesso de um local para outro ou de um indivíduo para outro (PENHA, 2000). Pode atuar apenas como suporte mecânico (EIMANTAS, 1997), fornecendo vários graus de sustentação (FOSSUM, 1997).

O enxerto ósseo pode cooperar com três funções para o processo de consolidação: osteogênese, osteoindução e osteocondução (STEVENSON, 1993; COSTA, 1996; PARKER, 1996; MOORE et al., 2001).

A osteogênese envolve formação de tecido ósseo no local da implantação, sendo necessário que células ósseas vivas sejam transplantadas com o enxerto. Esta característica é única dos enxertos autógenos esponjosos colhidos a fresco, que permitem a nutrição das células através da difusão e micro anastomoses entre os vasos da região e o enxerto (STEVENSON, 1993; COSTA, 1996; PARKER, 1996).

A osteoindução é a capacidade do enxerto ósseo de recrutar e estimular células multipotenciais do tecido mesenquimal a se diferenciarem em células osteogênicas. Este processo não é inteiramente conhecido; entretanto, sabe-se que a matriz e as células ósseas, através da proteína morfogênica óssea (BMP) e de outras proteínas, estimulam esta função (STEVENSON, 1993; COSTA, 1996; PARKER, 1996; PARIKH, 2002).

A osteocondução é o processo no qual o enxerto serve como arcabouço para migração de vasos sangüíneos e deposição de osso novo, conhecido como “tellis formation”. O enxerto é lentamente reabsorvido e substituído por osso neoformado através do processo de “creeping substitution”. Os osteoclastos reabsorvem gradualmente o enxerto e há a substituição por osso novo. Radiograficamente ocorre aumento inicial na radiopacidade do enxerto transplantado seguido por redução na densidade e mistura com o osso adjacente. O processo de substituição óssea é lento, podendo levar meses, anos ou nunca ocorrer em sua plenitude (STEVENSON, 1993; COSTA, 1996; PARKER, 1996; SILVA et al., 2003).

Numerosos materiais têm sido utilizados, porém poucos apresentam resultados satisfatórios já que a maioria provoca, em maior ou menor grau, uma resposta imunológica do organismo receptor. Dentre os materiais biológicos encontram-se os enxertos autógenos, que utilizam tecido ósseo do próprio indivíduo, e os enxertos alógenos, que consistem na utilização de tecido ósseo de outro indivíduo, da mesma espécie, para a reconstituição da parte danificada.

Destes materiais, os enxertos autógenos são mais utilizados devido à resposta imunológica, sendo sempre compatíveis, favorecendo os processos de revascularização e reparação (STEVENSON, 1993; PARKER, 1995; FITCH et al., 1997; KEATING; Mc QUEEN, 2001). Entretanto, a aplicação destes materiais é limitada pelo estado clínico do paciente, localização e tamanho do defeito ósseo. Além disso, apresenta algumas desvantagens como complicações pós-operatórias, aumento do tempo cirúrgico, dificuldade de conformação exata ao defeito e indisponibilidade da quantidade de osso necessária para a restauração em alguns casos (CONSTANTINO et al., 1991; MUNTING et al., 1993; KURASHINA et al., 1998; PERKA et al., 2000; ALBAROVA et al., 2005).

2.4. BIOMATERIAIS

O termo enxerto implica transferência de tecido vivo, enquanto implante refere-se ao material não vivo (conservado) aplicado ao leito receptor. Os implantes também podem ser constituídos de materiais não biológicos, como metais e cerâmicas, ou ainda polímeros, denominados implantes aloplásticos (ALEXANDER, 1987; STEVENSON, 1993).

A procura por um material moldável para promover a reparação óssea tem sido a busca de vários pesquisadores e cirurgiões interessados em acelerar a regeneração de fraturas ou reconstruir defeitos ósseos (SCHIMITZ et al., 1999; KIRSCHNER et al., 2002).

Vários estudos têm sido realizados na busca de um método eficaz para preenchimento de falhas ósseas segmentares, ou seja, quando existe perda muito grande de tecido ósseo. Barros et al. (2001) utilizaram auto-enxerto percutâneo de medula óssea em falhas segmentares produzidas no rádio de coelhos e concluíram que há formação de tecido ósseo mais precocemente. Diversos trabalhos foram realizados utilizando-se o mesmo modelo experimental, alterando somente o material de preenchimento. Para tanto, foram relatados sucessos na utilização de biovidros e biocerâmicas (GUIRRO, 1995; ALBAROVA et al., 2005), matriz óssea desmineralizada (CARRO, 1998; SILVA et al., 2003) e polímero de mamona adicionado à células de medula óssea (DEL CARLO et al., 2003).

Os biomateriais podem ser definidos como substâncias de origens naturais ou sintéticas que são toleradas de forma transitória ou permanente pelos diversos tecidos que constituem os órgãos dos seres vivos (WILLIAMS, 1987; SANTOS et al., 1999).

A principal vantagem dos biomateriais à base de cerâmica (biocerâmicas) é sua baixa reatividade química, sendo geralmente inertes e biocompatíveis (VALLET-REGÍ, 1997).

As biocerâmicas podem ser classificadas como inertes, quando o material é química e mecanicamente estável e não libera moléculas, íons ou partículas como resultado da ação combinada dos fluidos do organismo, da atividade celular e dos esforços mecânicos a que seja submetido o implante. Nestes materiais, a formação de uma cápsula de tecido fibroso ao redor do implante ocorre como resposta biológica, sendo esta tanto mais espessa quanto menos inerte for o material implantado (VALLET-REGÍ, 1997).

Além de inertes, as biocerâmicas podem ser classificadas como bioativas, quando o tecido vivo é capaz de interagir intimamente com o material, depositando-se diretamente sobre a superfície do mesmo sem a intervenção de uma camada de tecido fibroso. A natureza dessa ligação entre o osso e o implante, no caso destes materiais, parece ser do tipo química, sendo que, nessa ligação, o papel fundamental parece ser feito pelos componentes orgânicos e minerais presentes nos fluidos do corpo humano. Os materiais bioativos, por excelência, são os mais empregados, como os biovidros (ALBAROVA et al., 2005), as vitrocerâmicas bioativas e as cerâmicas de fosfato de cálcio, entre as quais, a mais difundida é a Hidroxiapatita (HA) (VALLET-REGÍ, 1997).

2.4.1. Cimento à base de fosfato de cálcio (CFC)

Os CFC são a segunda geração da HA. Eles têm sido desenvolvidos com o objetivo de se empregar um material que seja moldável e se ligue quimicamente ao osso hospedeiro, restaurando contornos e aumentando as propriedades biomecânicas da região acometida (SCHMITZ et al., 1999). A popularidade destes

materiais vem crescendo devido à promessa de um substituto osteocondutivo para enxertos ósseos (KEATING; Mc QUEEN, 2001; FINI et al., 2002; OOMS et al., 2002).

Os CFC são materiais constituídos por um pó e um líquido, os quais, ao serem misturados, formam uma pasta que endurece espontaneamente à temperatura ambiente ou corporal como resultado da precipitação de um ou vários fosfatos de cálcio (DRIESSENS et al., 1998; CARRODÉGUAS et al., 1999; YUAN et al., 2000).

O comportamento biológico "in vivo" dos CFC tem sido exaustivamente estudado em diversos modelos animais. Observa-se que os estudos envolvendo grandes falhas ósseas se restringem a um grupo menor de espécies, diferente do que ocorre em testes de biocompatibilidade dos mais diversificados materiais (MUNTING et al., 1993; YOSHIMINE et al., 1993; FUJIKAWA et al., 1995; OHURA et al., 1996; FINI et al., 2002; LU et al., 2002; OOMS et al., 2002; MORAES et al., 2004; ORIÁ, 2005).

Genericamente, os CFC comportam-se "in vivo" de maneira semelhante às biocerâmicas de fosfato tricálcico, ou seja, são reabsorvidos devido à atividade osteoclástica, formando ao mesmo tempo novo tecido ósseo na interface osso-implante, devido à atividade osteoblástica (CARRODÉGUAS et al., 1999). Desta forma, os CFC não atuam como substitutos permanentes do osso, sendo apenas temporários e lentamente substituídos por tecido ósseo neoformado, comportamento esse denominado osteotransdutividade. A velocidade em que esse fenômeno ocorre, depende fortemente do tipo de CFC, do sítio de implantação e da idade do paciente receptor (CARRODÉGUAS et al., 1999). Segundo Lu (2002), a biodegradação do cimento à base de fosfato de cálcio pode ser explicada pela combinação de vários processos físicos, químicos e biológicos. Os fatores físicos incluem a forma, tamanho, porosidade e cristalinidade do implante. Dentre os fatores químicos estão a composição e ionização do material. Já os fatores biológicos são principalmente a área de contato com o osso, tipo de osso, espécie animal, idade e predisposição genética.

Santos (2002) desenvolveu um novo tipo de cimento de fosfato de cálcio, contendo um sistema de polimerização composto por acrilamida, obtendo um α -fosfato tricálcico (α -TCP) de dupla pega. Segundo Carrodéguas et al. (1999), trata-se de um sistema de polimerização que permite maior controle dos tempos de pega inicial e final, devido a presença da acrilamida. A composição do cimento foi denominada de “dupla pega”, em virtude da resistência mecânica inicial dar-se por polimerização do sistema de polímeros hidrossolúveis e a final, por precipitação de compostos de fosfato de cálcio (CARRODÉGUAS et al., 1999).

Diversos autores estudaram a biocompatibilidade de diferentes fibras, em diversos modelos experimentais objetivando a substituição de tecidos. As fibras de náilon são conhecidas devido a sua eficácia conforme estudos realizados por Peterson et al. (1986) e John et al. (2001).

Devido à presença de ligações do tipo ponte de hidrogênio dos grupos amida, o náilon 66 absorve cerca de 9% de água à temperatura ambiente e 100% de umidade relativa. Outra propriedade desses materiais decorrente das ligações do tipo hidrogênio, é a sua degradabilidade quando em condições “in vivo”, sendo muito utilizado como material de sutura (PARK, 1984).

Moraes (2002) avaliou a biocompatibilidade do α -TCP adicionado com fibras de carbono, náilon e polipropileno, em rádio de coelhos. O implante compacto de forma cilíndrica não foi reabsorvido durante o período máximo de observação pós-operatória (26 semanas), apenas uma discreta desmineralização ocorreu naqueles onde havia adição de fibras, principalmente as de náilon e polipropileno. As fibras de náilon foram liberadas em consequência da desmineralização do cimento, e envolvidas por uma fina camada de tecido conjuntivo, demonstrando sua biocompatibilidade. Este tipo de cimento desenvolvido por Santos et al. (2000) se mostrou mais resistente do que o α -TCP sem adição de fibras, no entanto, a porosidade do cimento não foi adequada para que houvesse infiltração de células para reabsorção do material.

O mesmo foi relatado por Oriá (2005), em um estudo em que utilizou o α -TCP como implante intra-ocular, concluindo que a macroestrutura desse

biomaterial não permitiu a infiltração de tecido fibrovascular, apesar da sua biocompatibilidade, mesmo após 180 dias de implantação.

2.5. EFEITOS DO ULTRA-SOM PULSADO DE BAIXA INTENSIDADE (USP) NO TECIDO ÓSSEO

O ultra-som consiste em uma forma de energia mecânica, transmitida aos tecidos biológicos por ondas de pressão acústica, amplamente empregado na medicina humana como método terapêutico, diagnóstico e em procedimentos cirúrgicos, variando tão somente a intensidade utilizada. Para fins terapêuticos, a intensidade varia de 1 a 3 W/cm², e é empregado para diminuir rigidez articular, reduzir dor, espasmos musculares e promover movimentação muscular. Em maiores intensidades (5 a 300 W/cm²), podem ser realizados procedimentos cirúrgicos, como tratamento para catarata e litotripsia. Por sua vez, a intensidade do ultra-som utilizado em diagnósticos é de 1 a 50 mW/cm² (RUBIN et al., 2001; SOUSA, 2003).

Duarte (1983) propôs a utilização do ultra-som pulsado de baixa intensidade (1,5MHz, 30 mW/cm², pulsos de 200 μ s) para promover a aceleração do reparo ósseo, após estudo em que obteve redução de 50% no tempo de consolidação de fraturas em osteotomias experimentais.

A habilidade de o ultra-som interagir com tecidos e produzir mudanças biológicas é conhecida há muito tempo. O primeiro efeito produzido nos tecidos em consequência das ondas ultra-sônicas é de natureza mecânica. As vibrações requerem um meio deformável elástico para sua propagação, o que causa compressão e expansão no tecido, além de produzir micro massagem. Têm sido demonstradas mudanças na permeabilidade das membranas das células para o cálcio e outros íons, aumento na permeabilidade vascular, na angiogênese e desgranulação de mastócitos (LEITE, 2005).

O Food and Drug Administration (FDA) aprovou o uso do ultra-som de baixa intensidade para acelerar a consolidação de fraturas recentes em outubro de 1994 e para o tratamento de não-uniões em fevereiro de 2000. Esta aprovação foi

baseada em diversos estudos que comprovaram a forte influência do ultra-som nos três estágios do processo de consolidação, acentuando a atividade angiogênica, condrogênica e osteogênica (RUBIN et al., 2001).

Ryaby et al. (1989) observaram aumento na incorporação de íons de cálcio em culturas de células ósseas e condrócitos expostos à estimulação ultra-sônica de baixa intensidade (20 mW/cm^2). Assim como este, outros estudos “in vitro” comprovam a eficácia do ultra-som para a mesma finalidade (SUN et al., 2001)

Diversos estudos “in vivo” têm sido realizados para comprovar os efeitos do ultra-som na reparação óssea. Dyson e Brookes (1983) avaliaram o tratamento de fraturas de ratas com ultra-som, durante as fases de calo ósseo primário até a remodelação. Os resultados indicaram que o tratamento com o ultra-som é mais efetivo durante as duas primeiras semanas após a osteotomia, ou seja, durante as fases inflamatória e proliferativa do processo de reparação.

Carro (1998) utilizou o ultra-som pulsado de baixa intensidade em falhas ósseas produzidas experimentalmente em rádio de coelhos, preenchidas com matriz óssea desmineralizada, e concluiu que após 45 dias já havia preenchimento da falha com tecido ósseo neoformado.

Sousa (2003) utilizou o ultra-som de baixa intensidade em um estudo envolvendo cães com fraturas em ossos longos, submetidos a diversos tipos de osteossínteses, e relatou que houve diminuição no tempo de consolidação óssea, quando comparado aos animais que não receberam o tratamento com ultra-som.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

Os protocolos da pesquisa foram aprovados pela Comissão de Ética e Bem-Estar Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias- UNESP- Câmpus de Jaboticabal.

Empregaram-se 12 animais da espécie leporina (*Oryctolagus cuniculus*; Lilljeborg, 1874), raça Nova Zelândia, adultos jovens, seis machos e seis fêmeas, com peso corpóreo variando entre 2,5 e 3,4kg, mantidos em gaiolas individuais e alimentados com água potável e ração apropriada¹ *ad libitum*.

3.2. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram distribuídos em dois grupos de seis cada, denominados grupo tratado (GT) e grupo controle (GC). Cada grupo foi subdividido em dois, de acordo com o tempo de observação pós-operatória de 15 e 30 dias.

3.2.1. Grupo Tratado (GT)

Decorridas 24 horas do procedimento cirúrgico, os animais do GT receberam estímulo através do ultra-som pulsado de baixa intensidade (USP) nos dois membros, sendo o direito preenchido com o cimento de fosfato de cálcio (α -TCP) adicionado de fibras de náilon e o esquerdo constituído pela falha óssea vazia. A estimulação foi realizada durante 15 minutos nos primeiros cinco dias e dez minutos nos cinco dias seguintes, totalizando dez dias de estimulação.

Três animais deste grupo foram sacrificados aos 15 e três aos 30 dias após o procedimento cirúrgico (GT 15 e GT 30).

3.2.2. Grupo Controle (GC)

Os animais deste grupo não receberam estímulo através do ultra-som pulsado de baixa intensidade (USP) nos dois membros. Foram submetidos à técnica “Mock-insonation”, internacionalmente utilizada no estudo da energia ultra-sônica em tecidos biológicos, que propõe simular a irradiação do ultra-som no

¹ Ração para coelhos- Nestlé Purina- Paulínia-SP

segmento controle, utilizando o mesmo equipamento e procedimentos adotados para o grupo tratado, porém sem a emissão do ultra-som. Esta técnica garante que os animais dos grupos tratado e controle sejam rigorosamente submetidos às mesmas condições experimentais e de manipulação, com exceção do estímulo ultra-sônico.

Três animais deste grupo foram sacrificados aos 15 e três aos 30 dias após os procedimentos cirúrgicos (GC 15 e GC 30).

3.3. PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Foi realizado jejum alimentar de doze horas, previamente às condutas operatórias, não sendo os animais privados da ingestão de água. Quarenta minutos antes do início da cirurgia, os animais receberam antibioticoterapia à base de ampicilina benzatina e sódica², na dose de 20mg/kg, por via subcutânea.

Os animais foram pré-medicados com 0,5 mg de sulfato de atropina³, via intramuscular. Após dez minutos, foram submetidos à anestesia dissociativa à base de cloridrato de cetamina⁴, na dose de 25mg/kg, associado à xilazina⁵ na dose de 5mg/kg, diluídos em uma mesma seringa, administrado por via intramuscular.

Com os membros torácicos tricotomizados e preparados para a cirurgia, foi realizada incisão longitudinal na face dorsal do membro torácico direito, sobre o rádio, de aproximadamente três centímetros incluindo pele e tecido subcutâneo, seguido de divulsão da musculatura, até a localização do periósteo, o qual foi incisado longitudinalmente, afastado e mantido aderente à musculatura adjacente, expondo, desta forma, a diáfise do rádio. Foi colocada uma lâmina metálica entre o rádio e a ulna, através da membrana interóssea para proteger a ulna e a musculatura adjacente.

² Optacilin 500- Byk química e farmacêutica Ltda. São Paulo-SP

³ Ariston distribuidora de medicamentos Ltda. São Paulo-SP

⁴ Ketamina 50- Holliday-Ccott S/A - Buenos Aires- Argentina.

⁵ Rompum Lab. Bayer do Brasil S/A. São Paulo-SP

A ostectomia parcial foi realizada perpendicularmente ao eixo longitudinal da diáfise do rádio a três centímetros da articulação rádio-cárpica, com o uso de uma micro-serra oscilante⁶ acoplada a um motor de baixa rotação, sendo o local constantemente umedecido com solução fisiológica a 0,9% para se evitar o aquecimento e, conseqüente, necrose da superfície óssea. Foi obtida uma falha óssea de oito milímetros de extensão, a qual depois de inspecionada, foi lavada com solução fisiológica e preenchida com o cimento de fosfato de cálcio adicionado de fibras de náilon. O periósteo foi, na medida do possível, recolocado sobre a falha óssea e, a seguir, musculatura, subcutâneo e pele suturados conforme descrito por Fossum (1997) (Figura 1).

O mesmo procedimento foi realizado no membro torácico contralateral (esquerdo), porém sem o preenchimento da falha óssea com o cimento.

Imediatamente ao ato cirúrgico, foi administrado cetoprofeno⁷ na dose de 1mg/kg, por via subcutânea, a cada 24 horas, durante os três primeiros dias.

⁶ Micro Serra Sagital- Dentscler- Ribeirão Preto-SP

⁷ Ketofen 1%- Merial Saúde Animal Ltda. Paulínia-SP

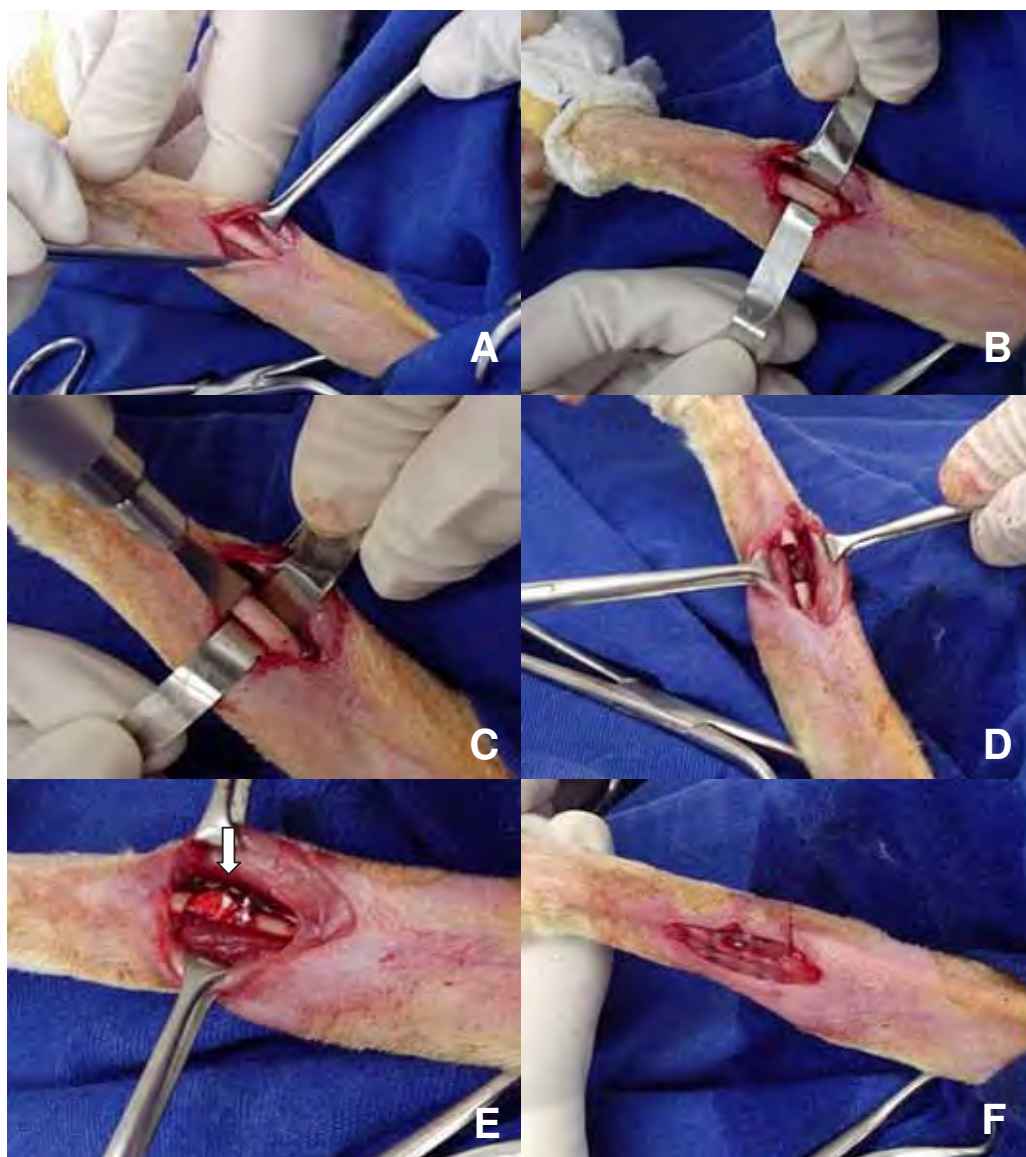


Figura 1: Imagens fotográficas do procedimento cirúrgico para confecção de falha óssea.

Em A, a diáfise do rádio é exposta através de divulsão da musculatura adjacente; em B, uma lâmina metálica é posicionada entre o rádio e a ulna; em C, a osteotomia parcial é iniciada com o auxílio de micro serra; em D, falha óssea já pronta para receber o cimento de fosfato de cálcio (E - seta) e em F, sutura da musculatura afastada.

3.4. CIMENTO ÓSSEO

Os implantes de cimentos ósseos foram fornecidos pelo Departamento de Engenharia de Materiais da Faculdade de Engenharia Mecânica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Em sua composição, cimento de fosfato de cálcio contendo 20% de acrilamida, 1% de poliacrilato de amônia e 3% de fibras de náilon 66. As amostras foram partidas em pequenos tamanhos, de modo a se obter um granulado composto de cimento e fibras de náilon (Figura 2).



Figura 2: Imagem fotográfica do cimento de fosfato de cálcio adicionado com fibras de náilon para o preenchimento de falha óssea.

3.5. ULTRA-SOM PULSADO DE BAIXA INTENSIDADE (USP)

Foi utilizado nesse estudo equipamento de ultra-som de baixa intensidade, projetado e montado no laboratório de bioengenharia da Faculdade de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo (USP) – SP (Figura 3). Os parâmetros físicos do aparelho foram os descritos a seguir.

- forma de onda pulsada
- largura do pulso de $200\mu s$
- frequência de repetição de 1,0 kHz (1000 pulsos/segundo)
- frequência do PTZ-4 de 1,5 MHz
- potência/ intensidade acústica de $30\text{mW}/\text{cm}^2$

Como parte da metodologia, o equipamento foi calibrado em um dosímetro de ultra-som de precisão (modelo UPM-DT 10- OHNIC), no laboratório de bioengenharia da mesma universidade, antes do início do experimento, com a finalidade de manter a constância dos parâmetros.



Figura 3: Imagem fotográfica do aparelho de ultra-som, modelo 1131-G (Imbrassom Ind. e Com.) e gel acoplante hidrossolúvel.

3.6. AVALIAÇÃO PÓS-OPERATÓRIA

3.6.1. Avaliação Clínico-cirúrgica

Os animais foram observados diariamente até o momento do sacrifício, a fim de verificar qualquer reação tecidual na cicatriz cirúrgica e eventual claudicação no decorrer do tempo de avaliação.

3.6.2. Avaliação Radiográfica

Todos os animais tiveram seus membros torácicos radiografados no período pós-operatório imediato, aos sete e quinze dias no GC e GT 15. Os animais dos grupos GT e GC 30, foram radiografados também aos 30 dias pós-operatórios. Foram realizadas projeções craniocaudais e mediolaterais dos membros operados.

Utilizou-se aparelho de Raios-X marca CRX, modelo 500mA/125 kVp, equipado com grade antidifusora Potter-Bucky, empregando-se filme TGM/RA montado em chassi metálico com écrans intensificadores Lanex Regular.

A revelação e fixação dos filmes, previamente identificados por impressão luminosa, foram realizadas em processadora automática modelo Macrotec MX-2.

3.6.3. Avaliação Histopatológica

Ao final de cada período (15 e 30 dias), os animais foram sacrificados conforme recomendações do *Institute of Laboratory Resources*, 1996. Os fragmentos do osso correspondente à falha óssea foram colhidos e fixados em formalina a 10% por, no mínimo, quatro dias, após os quais foram lavados e descalcificados em ácido tricloroacético a 20%.

Posteriormente à descalcificação, os fragmentos foram desidratados em etanol, diafanizados em xilol, incluídos em parafina e seccionados em cortes de 5um em micrótomo. As lâminas foram coradas pela técnica da hematoxilina-eosina (H.E.) e o material examinado à microscopia de luz, a fim de observar as

interações das interfaces osso/implante e as diferenças entre os grupos tratado e controle.

4. RESULTADOS

4.1. AVALIAÇÃO CLÍNICO-CIRÚRGICA

Não foram observadas complicações durante a realização das cirurgias. Todos os animais apresentaram bom estado geral, ausência de sinais de infecção ou alterações que pudessem ser atribuídas ao biomaterial utilizado. Não apresentaram claudicação em nenhum momento, com a função dos membros preservada logo no dia seguinte a cirurgia. Durante o tratamento com o ultra-som, não foi observado nenhum efeito indesejável. Os animais permaneciam tranquilos e sem alteração comportamental.

4.2. AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA

Logo após o término do procedimento cirúrgico, foram realizadas as radiografias, em posição mediolateral dos membros operados, para avaliar o estado das ostectomias. As imagens mostraram que as ostectomias estavam na localização desejada e apresentavam as dimensões previstas.

As projeções craniocaudais revelaram imagens de sobreposição entre o rádio e ulna, não sendo portanto, utilizadas nos resultados da avaliação radiográfica.

Quando a falha óssea foi deixada vazia, o aspecto radiográfico imediato foi a transparência total aos raios-x. Já nos casos onde foi utilizada o cimento de fosfato de cálcio, este aparecia nas radiografias como uma imagem mais radiopaca e de aspecto granulado.

De maneira geral, do ponto de vista radiográfico, todas as ostectomias mostraram-se bem definidas e com padronização do comprimento. Nenhum caso evoluiu, ao decorrer da avaliação pós-operatória, para fratura de ulna ou reabsorção óssea. Com o passar do tempo, a radiopacidade aumentava na região

das falhas ósseas, com ou sem o preenchimento com o α - TCP. No grupo em que não houve estimulação pelo ultra-som, o aumento ocorreu com menor intensidade e velocidade do que nos animais que receberam o estímulo ultra-sônico.

A seguir são descritas as observações radiográficas encontradas nos grupos experimentais (Grupo Controle e Grupo Tratado).

Grupo Controle (GC)

- Aos 15 dias de pós-operatório, iniciou-se o processo de reação periosteal na interface proximal, mais evidente nas falhas ósseas sem o α - TCP. Em um animal esta reação também foi observada na interface distal.
- Aos 30 dias de pós-operatório, a reação periosteal se intensificou nas interfaces proximal e distal, havendo fechamento parcial da falha óssea em um animal, no membro onde não havia preenchimento pelo α - TCP (Figura 4).
- Nas falhas ósseas preenchidas com o α - TCP, o início do processo de reação periosteal aconteceu somente aos 30 dias de pós-operatório, na interface proximal (Figura 5).

Grupo Tratado (GT)

- Em um animal observou-se reação periosteal na interface proximal aos sete dias de pós-operatório, no membro sem o preenchimento pelo α - TCP.
- Aos 15 dias de pós-operatório, pode-se observar reação periosteal proximal e distal, em ambos os membros (com e sem α - TCP), sendo esta reação sempre mais evidente na interface proximal (Figura 6).
- Aos 30 dias de pós-operatório, em todos os animais, observou-se reação periosteal nas interfaces proximais e

distais, nas falhas vazias e preenchidas com α - TCP, porém nestas com menor intensidade (Figura 7).

- Em um animal, aos 30 dias de pós-operatório, observou-se fechamento total da falha óssea com o α - TCP, e parcial no membro sem preenchimento (Figura 8).

Os resultados das análises radiográficas são condizentes com uma progressiva evolução da imagem radiopaca e uma organização do osso na região da falha óssea, mais evidente no grupo tratado, quando preenchidas ou não com o α - TCP. Esta evolução está sumarizada nas tabelas 1, 2, 3 e 4.



Figura 4: Imagem radiográfica de falha óssea em rádio de coelho do grupo controle (sem estimulação pelo USP), sem o preenchimento do α - TCP. Em A, pós-operatório imediato; em B, as setas indicam reação periosteal nas interfaces proximal e distal, aos **30 dias** de pós-operatório.



Figura 5: Imagem radiográfica de falha óssea em rádio de coelho do grupo controle (sem estimulação pelo USP), com o preenchimento do α -TCP. Em A, pós-operatório imediato; em B, a seta indica início de reação periosteal na interface proximal, aos **30 dias** de pós-operatório.



Figura 6: Imagem radiográfica de falha óssea em rádio de coelho do grupo tratado (com estimulação pelo USP), aos **15 dias** de pós-operatório. Em A, falha óssea sem o preenchimento do α -TCP; em B, com α -TCP. As setas indicam reação periosteal, mais evidente na interface proximal.



Figura 7: Imagem radiográfica de falha óssea em rádio de coelho do grupo tratado (com estimulação pelo USP), aos **30 dias** de pós-operatório. Em A, falha óssea sem o preenchimento do α - TCP; em B, com α -TCP. As setas indicam intensa reação periosteal nas interfaces proximais e distais, e o fechamento da falha óssea.

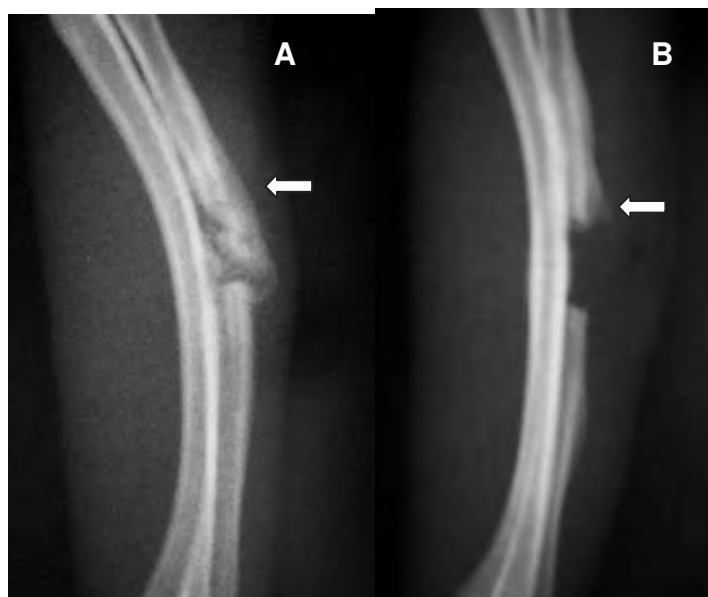


Figura 8: Imagem radiográfica de falha óssea em rádio de coelho do grupo tratado (com estimulação pelo USP), aos **30 dias** de pós-operatório. Em A, falha óssea com o preenchimento do α - TCP; em B, sem α -TCP. Observa-se reação periosteal nas interfaces proximais e distais, e o fechamento da falha óssea, mais evidente em A.

Tabela 1: Avaliação radiográfica dos animais pertencentes ao grupo controle (GC 15), relacionando as reações observadas nas interfaces proximais e distais, nas falhas com e sem preenchimento de α - TCP, com os dias do pós-operatório.

Achados Radiográficos	Preenchimento da Falha óssea	7 dias PO	15 dias PO
Reação Periosteal Proximal	com α - TCP	-	-
	sem α - TCP	-	+
Reação Periosteal Distal	com α - TCP	-	-
	sem α - TCP	-	-
Ponte Proximal	com α - TCP	-	-
	sem α - TCP	-	-
Ponte Distal	com α - TCP	-	-
	sem α - TCP	-	-
Fechamento Falha Parcial	com α - TCP	-	-
	sem α - TCP	-	-
Fechamento Falha Total	com α - TCP	-	-
	sem α - TCP	-	-

(-): não observado; (+): observado com moderação; (++) : observado com maior intensidade.

Tabela 2: Avaliação radiográfica dos animais pertencentes ao grupo controle (GC 30), relacionando as reações observadas nas interfaces proximais e distais, nas falhas com e sem preenchimento de α - TCP, com os dias do pós-operatório.

Achados Radiográficos	Preenchimento da Falha óssea	7 dias PO	15 dias PO	30 dias PO
Reação Periosteal Proximal	com α - TCP	-	-	+
	sem α - TCP	-	+	+
Reação Periosteal Distal	com α - TCP	-	-	-
	sem α - TCP	-	+	++
Ponte Proximal	com α - TCP	-	-	-
	sem α - TCP	-	-	+
Ponte Distal	com α - TCP	-	-	-
	sem α - TCP	-	-	+
Fechamento Falha Parcial	com α - TCP	-	-	-
	sem α - TCP	-	-	+
Fechamento Falha Total	com α - TCP	-	-	-
	sem α - TCP	-	-	-

(-): não observado; (+): observado com moderação; (++) : observado com maior intensidade.

Tabela 3: Avaliação radiográfica dos animais pertencentes ao grupo tratado (GT 15), relacionando as reações observadas nas interfaces proximais e distais, nas falhas com e sem preenchimento de α - TCP, com os dias do pós-operatório.

Achados Radiográficos	Preenchimento da Falha óssea	7 dias PO	15 dias PO
Reação Periosteal Proximal	com α - TCP	-	+
	sem α - TCP	-	+
Reação Periosteal Distal	com α - TCP	-	-
	sem α - TCP	-	-
Ponte Proximal	com α - TCP	-	+
	sem α - TCP	-	+
Ponte Distal	com α - TCP	-	-
	sem α - TCP	-	-
Fechamento Falha Parcial	com α - TCP	-	-
	sem α - TCP	-	-
Fechamento Falha Total	com α - TCP	-	-
	sem α - TCP	-	-

(-): não observado; (+): observado com moderação; (++) : observado com maior intensidade.

Tabela 4: Avaliação radiográfica dos animais pertencentes ao grupo tratado (GT 30), relacionando as reações observadas nas interfaces proximais e distais, nas falhas com e sem preenchimento de α - TCP, com os dias do pós-operatório.

Achados Radiográficos	Preenchimento da Falha óssea	7 dias PO	15 dias PO	30 dias PO
Reação Periosteal Proximal	com α - TCP	-	+	+
	sem α - TCP	+	+	++
Reação Periosteal Distal	com α - TCP	-	+	+
	sem α - TCP	-	+	++
Ponte Proximal	com α - TCP	-	+	+
	sem α - TCP	-	+	++
Ponte Distal	com α - TCP	-	+	+
	sem α - TCP	-	+	++
Fechamento Falha Parcial	com α - TCP	-	-	++
	sem α - TCP	-	-	++
Fechamento Falha Total	com α - TCP	-	-	++
	sem α - TCP	-	-	++

(-): não observado; (+): observado com moderação; (++) : observado com maior intensidade.

4.3. AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

Nos animais onde não houve o estímulo com o ultra-som pulsado de baixa intensidade pode-se observar que, aos 15 dias, nas falhas ósseas não preenchidas pelo α - TCP, havia uma menor organização tecidual, sendo esta composta principalmente por tecido fibroso (Figura 9A). Nas falhas preenchidas pelo α - TCP, observou-se uma maior organização celular, que pode ser notada ao redor do implante (Figura 9C).

Aos 30 dias, nas falhas ósseas preenchidas pelo α - TCP observa-se maior indução causada pelo implante na sequência da formação de osso primário. Na figura 9D nota-se condroblastos hipertrofiados, precursores de osteócitos, ao redor do cimento. Este achado ocorreu com menor intensidade nas falhas ósseas não preenchidas com o α - TCP, aos 30 dias pós-operatório.

As falhas ósseas que receberam estímulo pelo ultra-som, nos dois períodos observados, em ambos os membros, apresentaram um processo de reparação óssea com maior rapidez daquele encontrado nas falhas não estimuladas.

Aos 15 dias de pós-operatório, observou-se maior mobilização de células precursoras de tecido ósseo, tanto nas falhas ósseas sem o preenchimento (Figuras 10 A e B), como nas preenchidas pelo α - TCP, onde este resultado ocorreu com maior intensidade (Figuras 10 C e D)

Aos 30 dias foi possível notar formação de tecido ósseo primário mais evoluído e uniforme (Figura 11C) nas falhas ósseas preenchidas pelo α - TCP, quando comparado com as falhas ósseas vazias (Figura 11B). As células precursoras do tecido ósseo se dispuseram ao redor do implante, caracterizando a formação de tecido ósseo neoformado. Notou-se também a presença de osteócitos e áreas em processo de ossificação.

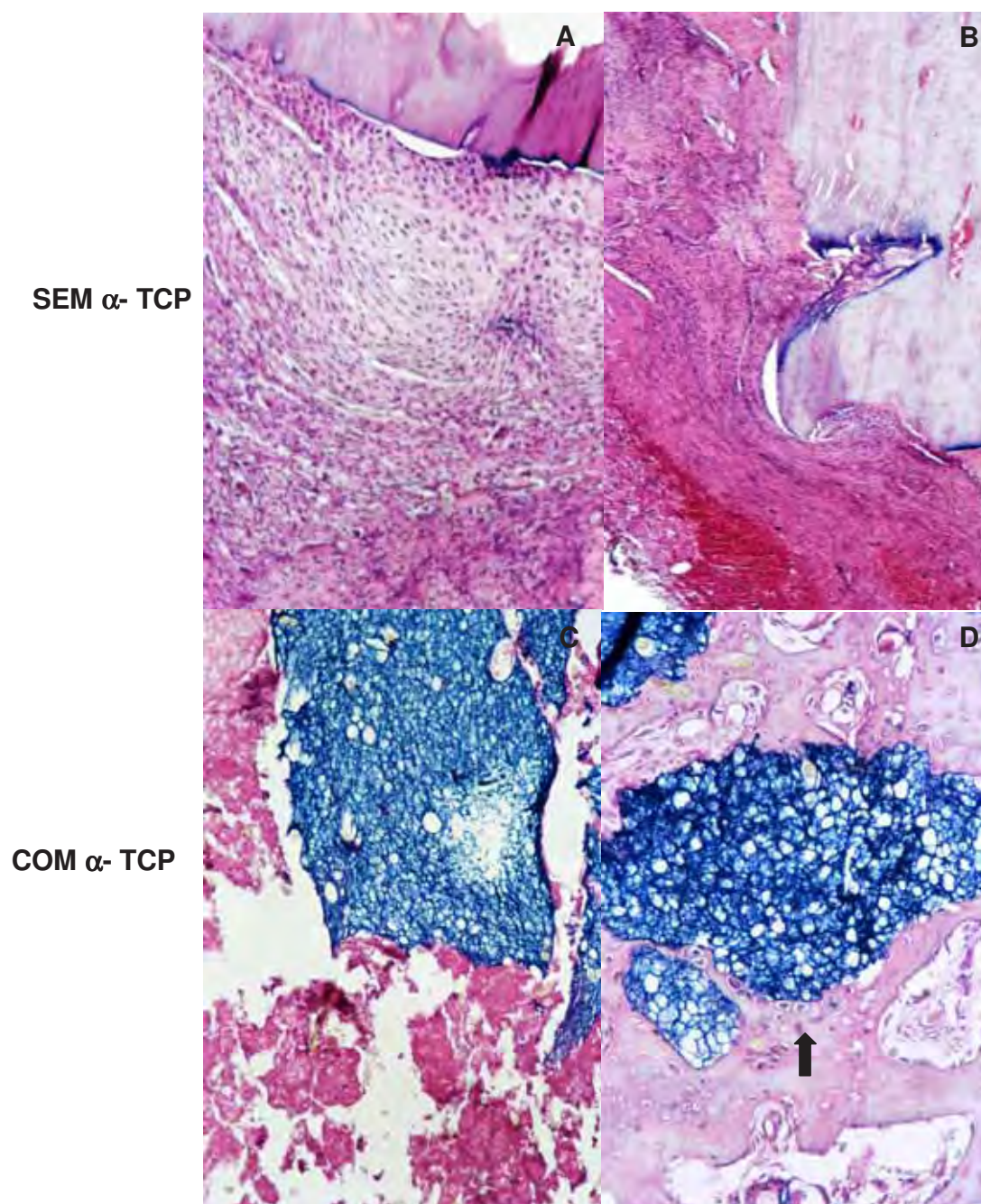


Figura 9: Fotomicrografias de cortes das áreas de falhas ósseas induzidas experimentalmente na diáfise do rádio de coelhos pertencentes ao grupo controle (GC 15 e GC 30) sem preenchimento pelo α - TCP (A e B), e com o preenchimento (C e D). Em A (10X), aos 15 dias, notar organização tecidual menos evoluída que em B (30 dias- 4X). Em C (10X), aos 15 dias, notar arranjo celular ao redor do implante com menor intensidade que em D (30 dias- 10X). A seta negra indica presença de condroblastos hipertrofiados precursores de osteócitos dispostos ao redor do implante. HE

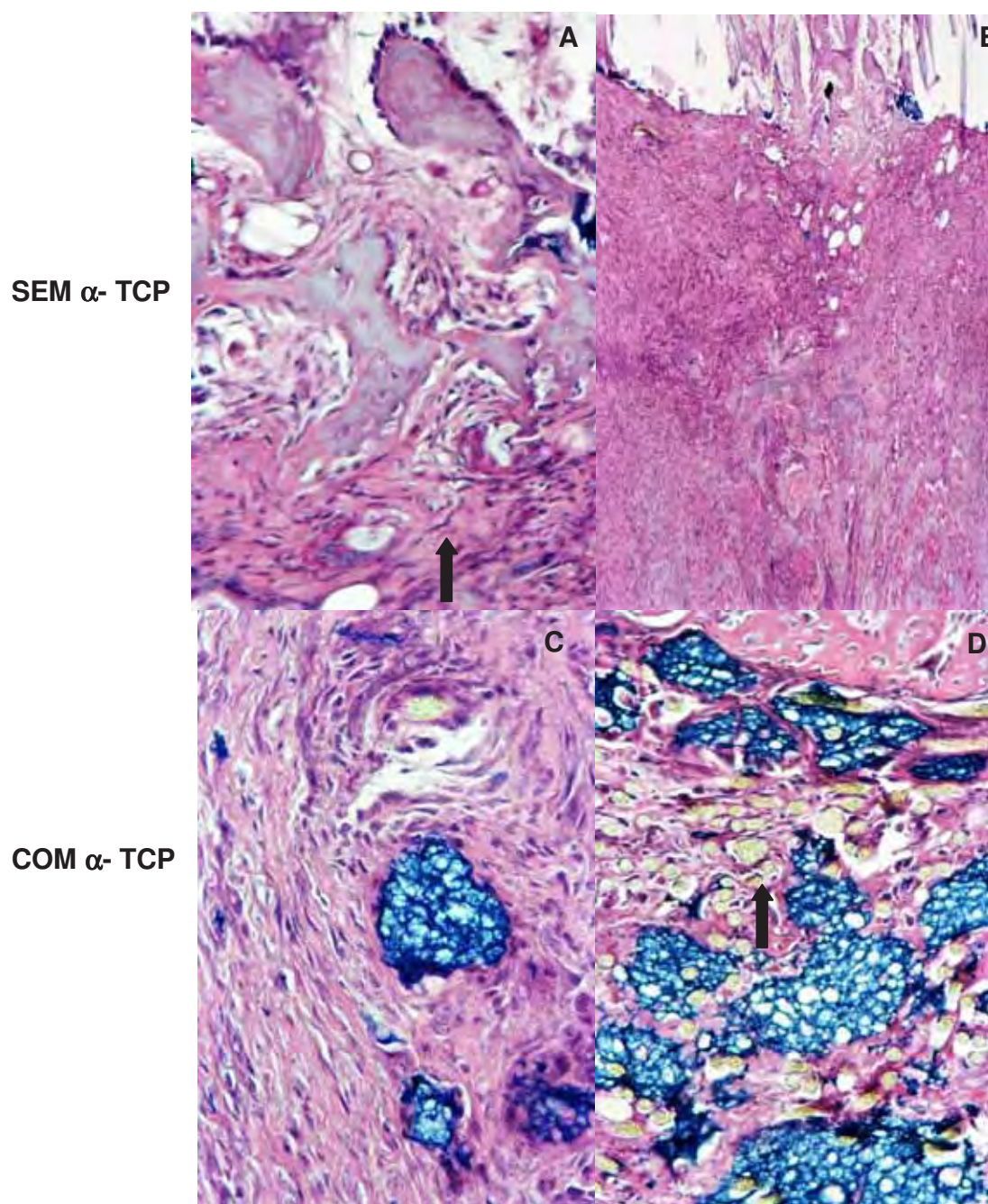


Figura 10: Fotomicrografias de cortes das áreas de falhas ósseas induzidas experimentalmente na diáfise do rádio de coelhos pertencentes ao grupo tratado (GT 15), sem o preenchimento pelo α - TCP (A e B) e com o preenchimento (C e D). Em A, a seta mostra área de tecido fibroso e uma celularidade menor do que observado nas figuras C e D (seta indicando cortes transversais das fibras de náilon circundados por células ósseas). HE

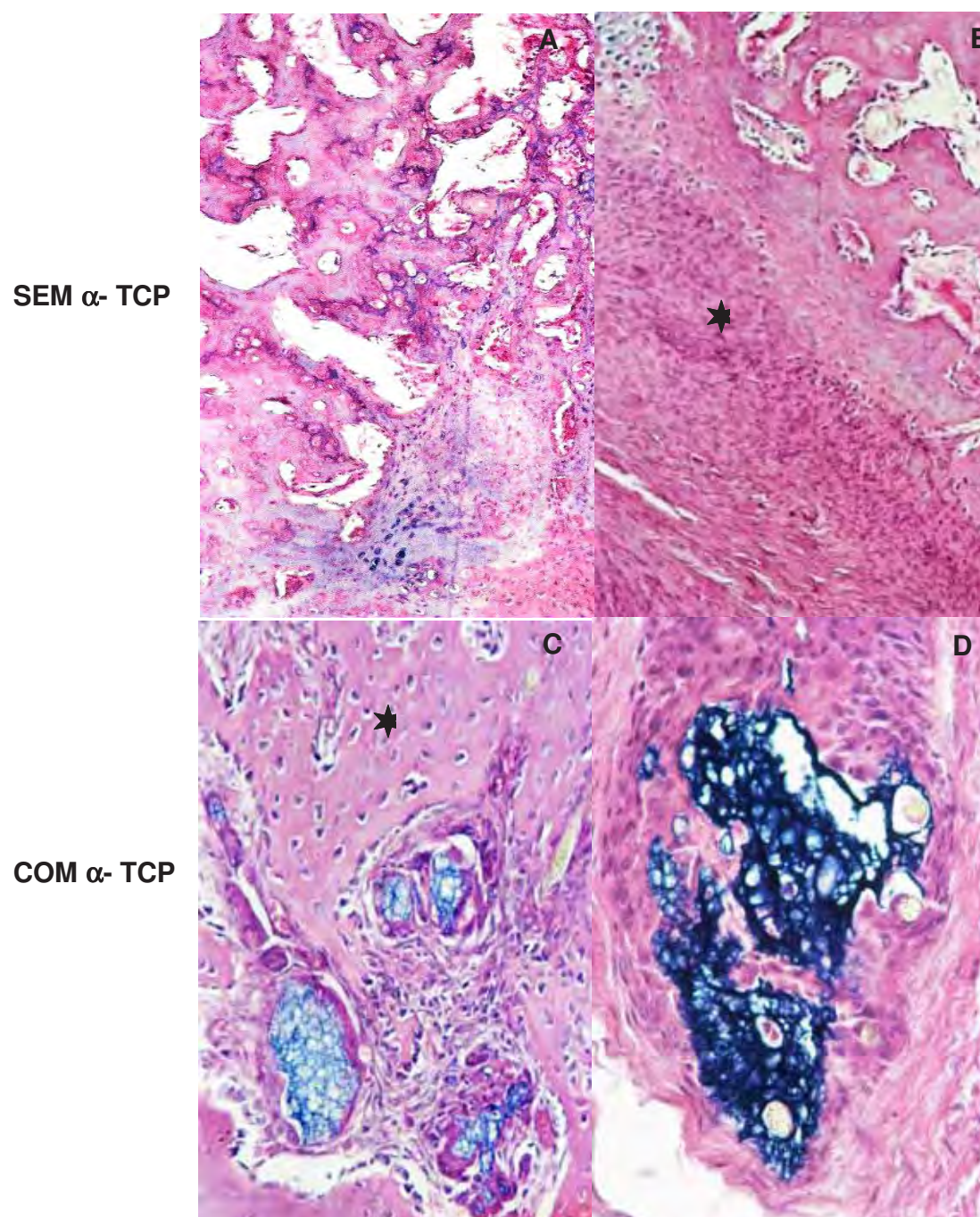


Figura 11: Fotomicrografias de cortes das áreas de falhas ósseas induzidas experimentalmente na diáfise do rádio de coelhos pertencentes ao grupo tratado (GT 30) sem o preenchimento pelo α - TCP (A e B) e com o preenchimento (C e D). Observa-se em B (4X) e C (10X), presença de tecido ósseo primário neoformado (asterisco), sendo este mais evoluído em C (10X) (com α - TCP). HE.

5. DISCUSSÃO

Foi utilizado na presente pesquisa o ultra-som pulsado de baixa intensidade, com a finalidade de avaliar, experimentalmente, seus efeitos sobre a reparação de falhas ósseas produzidas em rádio de coelhos, preenchidas ou não com o cimento de fosfato de cálcio adicionado com fibras de náilon. A diminuição do tempo e utilização de sínteses biológicas no tratamento de união-retardada ou pseudoartroses são desafios para todos os profissionais envolvidos, justificando pesquisas como esta.

Diversos modelos experimentais têm sido utilizados para se testar diferentes tipos de biomateriais como coelhos (GUIRRO, 1995; CARRO, 1998; MORAES, 2002; DEL CARLO, 2003; MORAES et al., 2004; SILVA et al., 2003; BETTI, 2004; ORIÁ, 2005), camundongos (CROCI et al., 2003), cães (ARINZEH et al., 2003; SOUSA, 2003) e ratos (LEITE, 2005; MELO et al., 2005).

Nesta pesquisa foi escolhido o coelho como modelo experimental, por ser um animal de fácil manejo e, quando comparado aos roedores também utilizados em pesquisas tais como ratos, camundongos e cobaias, o coelho possui um porte maior, permitindo desta forma, a realização de defeitos ósseos maiores.

A anatomia do antebraço do coelho apresenta algumas características importantes que facilitam este tipo de cirurgia. A diáfise é cilíndrica e apresenta-se superficialmente na sua face anterior, o que facilita o procedimento cirúrgico. A disposição anatômica permite acesso sem necessidade de lesão na musculatura adjacente, vasos e nervos mais importantes. Além de todos esses fatores, a presença de uma forte membrana interóssea unindo o rádio e a ulna faz com que esta funcione fixando o rádio, não permitindo que haja movimentação, dispensando, portanto, o uso de fixadores ósseos (CARRO, 1998).

A escolha do cimento ósseo sob a forma granulada deve-se à existência de vários trabalhos publicados sobre o assunto, mostrando ser o biomaterial granulado melhor indutor do que na forma compacta, pois apresenta maior área de superfície de contato, o que estimula a osteoindução. Diversas pesquisas relatam que o cimento ósseo sob a forma moldada atrasou a reabsorção do implante, devido sua baixa porosidade (GUIRRO, 1995; CARRO, 1998; MORAES,

2002; MORAES et al., 2004; ORIÁ, 2005). Neste estudo, o cimento sob a forma granulada fez com que a reabsorção ocorresse de maneira mais intensa, mesmo sem a estimulação pelo ultra-som, concordando, portanto, com os autores acima citados.

Nenhum efeito adverso foi observado no período de avaliação pós-operatória, corroborando os achados de Guirro (1995), Carro (1998), Del Carlo et al. (2003) e Silva et al. (2003), quando realizaram estudos envolvendo falhas ósseas segmentares em coelhos, utilizando como preenchimento diversos tipos de biomateriais.

Fukada e Yasuda (1957) constataram a piezoeletricidade do osso, e após muitas pesquisas, preconizou-se o uso do ultra-som pulsado de baixa intensidade para acelerar o reparo ósseo com base na sua semelhança com o processo natural de cura de fraturas (LIRANI; CASTRO, 2005).

Acreditando-se no potencial osteoindutor do cimento de fosfato de cálcio e conhecendo o fenômeno da piezoeletricidade do osso, sendo este encontrado nas moléculas de tropocolágeno (parte orgânica do osso) como citado por Carro (1995), torna-se bastante pertinente pesquisar a ação do ultra-som sobre o cimento de fosfato de cálcio, devido aos seus componentes semelhantes aos da matriz óssea.

Os parâmetros físicos do ultra-som utilizados neste trabalho foram otimizados através de pesquisas realizadas onde diferentes larguras e frequências de pulso foram comparadas. Desta forma, o aparelho foi calibrado de acordo com estes resultados (DUARTE, 1983; ORTEGA, 1986; DOUAT, 2004).

Neste estudo, a estimulação com o ultra-som foi iniciada 24 horas após o procedimento cirúrgico e teve duração de 15 e 10 minutos, durante 10 dias. Duarte (1983) demonstrou em seu estudo pioneiro que o ultra-som induz alterações no osso osteotomizado rapidamente, nos primeiros dez a 12 dias de estimulação, estabilizando após este período. Em diversos estudos pode-se observar a utilização do ultra-som durante o período sugerido pelo autor (GUIRRO, 1995; CARRO, 1998; SOUSA, 2003). Entretanto, em alguns trabalhos, o uso do ultra-som é mais prolongado, variando entre dez (KRISTIANSEN et al., 1997) e 20 semanas (HECKMAN et al., 1994).

No grupo onde não foi feita estimulação com o ultra-som, o crescimento ósseo no local da falha ocorreu com menor intensidade. Havia presença de células cartilaginosas em quantidade superior às ósseas, tanto nas falhas vazias quanto nas preenchidas pelo cimento. Este achado reflete a imaturidade do tecido de reparo, conforme relatado por Douat (2004).

Apesar da maior lentidão no processo de reparação no grupo controle, foi possível observar maior celularidade ao redor do implante, nas falhas preenchidas, como consequência do seu potencial osteoindutor. Devido ao poder de absorção das fibras de náilon 66, provavelmente o cimento teve maior capacidade em recrutar e estimular células do tecido mesenquimal, e assim promover o crescimento tecidual ao seu redor. Guirro (1995) em um estudo semelhante onde utilizou hidroxiapatita sintética pura como material de preenchimento não obteve o mesmo resultado satisfatório, pois o biomaterial não se mostrou eficiente para tal. O autor relatou que a barreira física imposta pela hidroxiapatita poderia limitar a proliferação de vasos sanguíneos essenciais para o processo de reparação, fato este que não observamos neste estudo.

Radiograficamente, nos dois grupos, as falhas ósseas vazias tinham, aos 30 dias de pós-operatório, imagem sugerindo crescimento ósseo superior aos das falhas preenchidas pelo cimento. No entanto, a avaliação histológica demonstrou que nos dois grupos, o cimento ósseo atuou efetivamente, acelerando o processo de reparo. Sugere-se, portanto, que a radiopacidade do cimento visibilizada desde o pós-operatório imediato possa ter sido confundida com a radiopacidade encontrada na proliferação de tecido ósseo, facilmente observada nas falhas ósseas vazias. De acordo com Croci et al. (2003), o calo ósseo primário é também visível nas radiografias e dá a primeira indicação de que a fratura está se consolidando.

No grupo tratado com o ultra-som, o crescimento ósseo nas falhas vazias e preenchidas foi claramente superior ao encontrado no grupo controle. Aos 15 dias de pós-operatório já era possível notar proliferação de células osteogênicas no local da falha, confirmando, desta forma, os efeitos benéficos do ultra-som no processo de reparação de fraturas.

Diversos autores corroboram estes achados, quando utilizaram o ultra-som pulsado de baixa intensidade para acelerar a reparação óssea em diferentes estudos (GUIRRO, 1995; CARRO, 1998; RUBIN et al, 2001; SOUSA, 2003; DOUAT, 2004; LIRANI, 2004).

Ainda demonstrando a eficácia do ultra-som para regeneração tecidual, podemos citar o trabalho de HOGAN et al. (1982), onde estimularam tecidos isquêmicos com o ultra-som e observaram formação de novos capilares e restabelecimento circulatório de forma mais rápida do que na ausência do recurso terapêutico.

6. CONCLUSÃO

Assim, com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- O ultra-som pulsado de baixa intensidade acelera a reparação de falhas ósseas induzidas experimentalmente no rádio de coelhos.
- O cimento de fosfato de cálcio adicionado com fibras de náilon como material de preenchimento nas falhas ósseas induz mais precocemente a formação de tecido ósseo, principalmente quando estimulado pelo ultra-som pulsado de baixa intensidade.

7. REFERÊNCIAS⁸

ALBAROVA, J. G. et al. The in vivo behavior of a sol-gel glass and a glass-ceramic during critical diaphyseal bone defects healing. **Biomaterials**, Kidlington, v.26, p.4374-4382, 2005.

ALEXANDER, J. W. Bone grafting. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, Philadelphia, v.17, n.4, p.811-819, 1987.

ARINZEH, T. L.; PETER, S. J.; ARCHAMBAULT, M. P.; VAN DE BOS, C.; GORDON, S.; KRAUS, K.; SMITH, A.; KADIYALA, S. Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical size canine segmental defect. **Journal of Bone and Joint Surgery American**, v. 85-A, n.10, p.1927-1935, 2003.

BANKS, W. J. Tecidos de sustentação-osso. In:_____ **Histologia veterinária aplicada**. 2.ed. São Paulo: Ed. Manole, 1992. p.137-166.

BARROS, S. V. S. et al. Auto-enxerto percutâneo de medula óssea II. Reparação de falhas segmentares produzidas no rádio de coelhos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.31, n.4, p.627-632, 2001.

BETTI, L. V. **Análises microscópica e radiográfica do reparo de defeitos confeccionados em fêmures de coelhos preenchidos com matriz óssea bovina medular em bloco ou cortical em microgrânulos**. 2004. 152f. Tese (Doutorado)- Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Baurú, 2004.

BLOKHUIS, T. J. et al. Properties of calcium phosphate ceramics in relation to their in vivo behaviour. **Journal of Trauma**, Baltimore, v.48, n.1, p.179-186, 2000.

⁸ ABNT, (NBR 6023/02)- 2003

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

CARRODÉGUAS R. G. et al. Cimentos de fosfato de cálcio. **Biotecnologia**, Brasília, v.2, n.10, p.30-32, 1999.

CLOKIE, C. M. L. et al. Closure of critical sized defects with allogenic and alloplastic bone substitutes. **Journal of Craniofacial Surgery**, Philadelphia, v. 13, n.1, p. 111-121, 2002.

CONSTANTINO, P. et al. Hydroxyapatite cement, basic chemistry and histologic properties. **Archives of Otolaryngology Head and Neck Surgery**, Chicago, v. 117, April 1991.

COSTA, J. L. O. **Reconstrução de grande falha óssea com enxerto cortical alógeno conservado em glicerina, fixado com placa e parafusos de aço inoxidável da série 304, estudo experimental em cães (*Canis familiaris*).** 1996. 100f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária)- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1996.

CRISCI, A. R.; FERREIRA, A. L. Low-intensity pulsed ultrasound accelerates the regeneration of the sciatic nerve after neurotomy in rats. **Ultrasound in Medicine and Biology**, Tarrytown, v.28, n.10, p.1335-1341, 2002.

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 Ortopédica Brasileira**, São Paulo, v.11, n.4, p. 230-239, 2003.

DEL CARLO, R. J. et al. Polímero de mamona acrescido de cálcio, associado ou não à medula óssea autógena na reparação de falhas ósseas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.33, n.6, p.1081-1088, 2003.

DEMPSTER D. W. New concepts in bone remodeling. In: SEIBEL, M. J.; ROBINS, S. P.; BILEZIKIAN, J. P. **Dynamics of bone and cartilage metabolism**. San Diego: Academic Press, 1999. cap.18, p.261-273.

DOUAT, E.S.V. **Estudo comparativo do efeito do ultra-som terapêutico de 1MHz com frequência de repetição de pulso de 100 Hz e 16 Hz no reparo de osteotomia por escareação em tibia de rato**. 2004. 74f. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.

DRIESSENS, F. C. M. et al. Osteotransductive bone cements. **Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers**, v. 212, n.6, p.427-435, 1998.

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

DYSON, M.; BROKES, M. Stimulation of bone repair by ultrasound. **Ultrasound in Medicine and Biology**, Tarrytown, v.2, p.61-66, 1983.

EIMANTAS, G. C. **Reparação e estabilização de fraturas femorais distais em cães e gatos jovens com a utilização de fíbula conservada em glicerina- estudo experimental**. 1997. 110f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária)- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1997.

FINI, M. et al. A bone substitute composed of polymethylmetracrylate and α -tricalcium phosphate: results in terms of osteoblast function and bone tissue formation. **Biomaterials**, Kidlington, v. 23, p. 4523-4531, 2002.

FITCH, R. et al. Bone autografts and allografts in dogs. **Cont. Educ. Art.**, v.19, n.5, p.558-575, 1997.

FOSSUM, T. W. **Small animal surgery**. Missouri: Mosby, 1997. p.760-765.

FUJIKAWA, K. et al. Histopatological reaction of calcium phosphate cement in periodontal defect. **Dental Materials**, Washington, v.14, n.1, p.45-57, 1995.

FUKADA, E.; YASUDA, I. On the piezoeletric effect of bone. **Journal of the Physical Society of Japan**, v. 12, n.10, p.1158-1162, 1957.

GUIRRO, R. R. J. **O uso da hidroxiapatita associada a estimulação ultra-sônica 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.

HECKMAN, J.D.; RYABY, J.P.; McCABE, J.; FREY, J.F.; KILCOYNE, R.F. Acceleration of tibial fracture healing by non invasive, low intensity pulsed ultrasound. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 76, p. 26-34, 1994.

HOGAN, R.D. et al. The effect of ultrasound on hemodinamics in skeletal muscle: effects during ischemia. **Microvascular Research**, v. 23, p. 370-379, 1982.

JOHN, J.; GANGADHAR, S. A.; SHAH, I. Flexural strength of heat-polymerized polymetyl methacrylate denture resin reinforced with glass, aramid, or nylon fibers. **Journal of Prosthetic Dentistry**, St. Louis, v.86, n.4, p.424-427, 2001.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1990.

KAPLAN, F. S. et al. (1994). Form and function of bone. In: SIMON, S.R. **Orthopaedic basic science**. Chicago: American Academy of Orthopaedic Surgeons, 1994.

KEATING, J. F; Mc QUEEN, M. M. Substitutes for autologous bone graft in orthopaedic trauma. **Journal of Bone and Joint Surgery British**, London, v. 83, n.1, p.3-8, 2001.

KIRSCHNER, R. E. et al. Repair of the immature craniofacial skeleton with a calcium phosphate cement: quantitative assessment of a craniofacial growth. **Annals of Plastic Surgery**, Boston, v. 49, n.1, p.33-38, 2002

KODAMA, A. C. **Efeitos do ultra-som pulsado de baixa intensidade em um modelo ósseo de ratas ovariectomizadas analisadas por meio do ensaio de flexo-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 Paulo, 2003.

KRISTIANSEN, T.K.; RYABY, J.P.; McCABE, J.; FREY, J.J.; ROE, L.R. Acceleration healing of distal radial fractures with the use specific, low intensity ultrasound: a multicenter, prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled study. **Journal of Bone and Joint Surgery American** v. 79, n. 7, p. 961-973, 1997.

KURASHINA, K. et al. Experimental cranioplasty and skeletal augmentation using an α -tricalcium phosphate/dicalcium phosphate dibasic/tetracalcium phosphate monoxide cement: a preliminary short-term experiment in rabbits. **Biomaterials**, Kidlington, Guildford, v. 19, p.701-706, 1998.

LEITE, V. L. **Estudo comparativo do efeito do ultra-som de 1 MHz com frequência de repetição de pulso a 100 Hz e 16 Hz no tratamento de fratura de fíbula de rato.** 2005. 75f. 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 Paulo, 2005.

LIRANI, A. P. R. **Estudo comparativo dos efeitos do ultra-som e do laser de baixa intensidade no reparo ósseo de tíbia de rato.** 2004. 109f. 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 Paulo, 2004.

LIRANI, A.P.R.; CASTRO, M.L. Evidências da ação de agentes físicos sobre o metabolismo do tecido ósseo e seus potenciais usos clínicos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 49, n.6, p. 891-896, 2005.

LU, J. et al. The biodegradation mechanism of calcium phosphate biomaterials in bone. **Journal of Biomedical Material Research**, Nova York, v. 63, n. 4, p. 408-412, 2002.

MELO, M. M.; GOUVÊA, C. M. C. P.; SILVA, A. L. Efeito do ultra-som na prevenção da hérnia incisional mediana no rato. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.20, n.1, p.100-109, 2005.

MORAES, P. C. **Biocompatibilidade e comportamento do cimento de fosfato de cálcio, reforçado com diferentes tipos de fibras, implantado no rádio de coelhos.** 2002, 73f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2002.

MORAES, P. C. et al. Biocompatibilidade do cimento de fosfato de cálcio implantado no rádio de coelhos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v.19, n.4, p.351-359, 2004.

MOORE, W. R.; GRAVES, S. E.; BAIN, G. I. Synthetic bone graft substitutes. **ANZ Journal of Surgery**, Australia, v. 71, n. 6, p. 354-61, 2001.

MUNTING, E.; MIRTCHI, A.; LEMAITRE, J. Bone repair of defects filled with a phosphocalcic hydraulic cement: an In Vivo Study. **Journal of Material Science: Materials in Medicine**, Norwell, n.4, p. 337-344, 1993.

OHURA, K. et al. Resorption of, and bone formation from, new beta-tricalcium phosphate monocalcium phosphate cements: an in vivo study. **Journal of Biomedical Material Research**, Nova York, v.30, n.2, p.193-200, 1996.

OOMS, E. M et al. Trabecular bone response to injectable calcium phosphate cement. **Journal of Biomedical Material Research**, Nova York, v. 61, n. 1, p. 9-18, 2002.

ORIÁ, A. P. **Cimento de α -fosfato tricálcico de dupla pega e polimetilmetacrilato como implantes intra-oculares em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*, Lilljeborg, 1874).** 2005. 44f. Tese (Doutorado em Cirurgia Veterinária)- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2005.

ORTEGA, J.M. **Efeito do ultra-som no reparo de falha óssea experimental. Avaliação quantitativa e morfológica do parâmetro largura de pulso.** 1986. 58f. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1986.

PARIKH, S. N. Bone graft substitutes: past, present, future. **Journal of Postgraduate Medicine**, Mumbai, v.48, n.2, p.142-148, 2002.

PARK, J. B. **Biomaterials Science and Engineering**. New York: Plenum Press, 1984.

PARKER, R.B. Injertos ósseos en cirugía de pequeños animales. **Waltam Focus**, v.5, n.2, p.90-99, 1995.

PARKER, R. B. Estabelecimento de banco de ossos In: BOJRAB, J. M. **Mecanismo da moléstia na cirurgia de pequenos animais**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1996. p.799-803.

PENHA, L. H. C. **Uso de enxerto ósseo cortical bovino conservado em glicerina a 98%, em osteotomias femorais de gatos**. 2000. 110f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária)- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2000.

PERKA, C. et al. Segmental bone repair by tissue-engineered periosteal cell transplants with bioresorbable fleece and fibrin scaffolds in rabbits. **Biomaterials**, Kidlington, v.21, n.11, p.1145-1153, 2000.

PETERSON, W. W. et al. Development of a synthetic replacement for the flexor tendon pulleys- na experimental study. **Journal of Hand Surgery**, St. Louis, v.11, n.3, p.403-409, 1986.

RAWOOL, N. M.; GOLDBERG, B. B.; FORSBERG, F.; WINDER, A. A.; HUME, E. Power doppler assesment of vascular changes during fracture treatment with low intensity ultrasound. **Journal of Ultrasound in Medicine**, Boston, v.22, p.145-153, 2003.

RUBIN, C.; BOLANDER, M.; RYABY, J. P.; HADJIARGYROU, M. The use of low-intensity ultrasound to accelerate the healing of fractures. **Journal of Bone and Joint Surgery American**, v.83, n.2, p.259-270, 2001.

RYABY, J. T.; BACHNER, E. J.; BENDO, J. A.; DALTON, P. E.; TANNEBAUM, S.; PILLA, A. A. Low intensity pulsed ultrasound increases calcium incorporation in both differentiating cartilage and bone cells culture. **Trans. Orthop. Res. Soc.**, v.14, p.15, 1989.

SANAN, A.; HAINES, S. J. Repairing holes in the head: a history of cranioplasty. **Neurosurgery**, Baltimore, v.3, n.40, p.588-603, 1997.

SANTOS, L. A. et al. Influence of polymeric assitives on the mechanical properties of α -tricalcium phosphate cement. **Bone.**, Nova York, v.25, n.2, p.99-102, 1999.

SANTOS, L. A. et al. Fiber reinforced calcium phosphate cement. **Artificial Organs**, Painesville, v.24, n.3, p.212-216, 2000.

SANTOS, L. A. dos. **Desenvolvimento de cimento de fosfato de cálcio reforçado por fibras para o uso na área médico-odontológica**. 2002, 275f. Tese (Doutorado em engenharia de biomateriais)- Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

SCHMITZ, J. P.; HOLLINGER, J. O.; MILAN, S. B. Reconstruction of Bone Using Calcium Phosphate Bone Cement: A Critical Review. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, Philadelphia, v. 57, p. 1122-1126, 1999.

SCHMAEDECKE, A. et al. Tratamento cirúrgico de união retardada e não união de fratura em cães: revisão de literatura. **Educação Continuada CRMV-SP**, São Paulo, v.6, n.1/3, p.74-82, 2003.

SILVA, A. M. et al. Matriz óssea desmineralizada na preparação de falhas ósseas segmentares produzidas no rádio de coelhos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.33, n.3, p.539-545, Santa Maria, 2003.

SOUSA, V. L. **Efeitos do ultra som de baixa intensidade sobre a consolidação óssea em fratura de ossos longos (rádio e ulna, tíbia e fíbula) em cães (*Canis familiaris*)**. 2003. 127f. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

STEVENSON, S. Bone Grafting. In: SLATTER, D. **Textbook of small animal surgery**. 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1993. v.2, p.1694-1703.

SUN, J. S. et al. In vitro effects of low-intensity ultrasound stimulation on the bone cells. **Journal of Biomedical and Material Research**, Nova York, v.57, n.5, p. 449-456, 2001.

VALET-REGÍ, M. Introduction to the world of biomaterials. **Biomaterials**, Oxford, v.93, n.1, p.S6-14, 1997.

WILLIAMS, D. F. Definitions in biomaterials. In: CONSENSUS CONFERENCE OF THE EUROPEAN SOCIETY FOR BIOMATERIAL, **1987, Proceedings...**

XAVIER, C. A. M.; DUARTE, L. R. Estimulação ultra sônica do calo ósseo. Aplicação Clínica. **Revista Brasileira de Ortopedia**. Belo Horizonte, v.18, p.73, 1983.

YOSHIMINE, Y. et al. Biocompatibility of tetracalcium phosphate cement when used as a bone substitute. **Biomaterials**, Oxford, v. 14, n.6, p.403-406, 1993.

YUAN, H. et al. Tissue Responses of Calcium Phosphate Cement: a Study in Dogs. **Biomaterials**, Oxford, v.21, p.1283-1290, 2000.