

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

Priscila Silvério Meira<sup>1\*</sup>  
Mário Jefferson Quirino Louzada<sup>2</sup>  
Juliana de Carvalho Apolinário<sup>3</sup>  
Tetuo Okamoto<sup>4</sup>  
Silvia Helena Venturoli Perri<sup>5</sup>  
Cristina Maria Ribeiro Monteiro<sup>5</sup>  
Márcia Marinho<sup>5</sup>

### RESUMO

A resposta do metabolismo ósseo está diretamente relacionada a fatores hormonais e ao estímulo mecânico que o osso está exposto. A energia ultrassônica no reparo ósseo têm se mostrado de fundamental importância para o estímulo e melhora na qualidade do tecido neoformado. 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 da análise histológica e histomorfométrica. Dezoito *Rattus norvegicus albinus*, Wistar, adultos foram divididos em três grupos, 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. Em todos os três grupos, ambas as tíbias foram submetidas à lesão óssea mono cortical de 4x2 mm na região medial da diáfise, sendo o membro esquerdo utilizado como controle e o membro direito submetido ao tratamento com ultrassom (US). A tíbia direita foi tratada com ultrassom pulsado na frequência de 1,5 MHz, ciclo 1:4, 30mW/cm<sup>2</sup>, por 12 sessões de 20 minutos cada. 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 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 G2t e G3t foram significativamente maiores quando comparados ao reparo das tíbias do grupo controle (G2c e G3c). 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.

<sup>1</sup> Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal – UNESP/Araçatuba, SP. \* Rua: Clóvis Pestana, 793, Bairro Dona Amélia, CEP 16050-680, Araçatuba/SP. Telefone (18) 3636-1382– Fax (18) 3622-6487 [prismeira@hotmail.com](mailto:prismeira@hotmail.com)

<sup>2</sup> Professor Adj. do Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal – UNESP/Araçatuba, SP. [louzada@fmva.unesp.br](mailto:louzada@fmva.unesp.br)

<sup>3</sup> Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas – UNESP/Araçatuba, SP. [juapolinario@hotmail.com](mailto:juapolinario@hotmail.com)

<sup>4</sup> Professor Titular Voluntário do Departamento de Cirurgia Clínica Integrada – UNESP/Araçatuba, SP.

<sup>5</sup> Professora Ass. Dr<sup>a</sup>. do Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal – UNESP/Araçatuba, SP. [shvperri@fmva.unesp.br](mailto:shvperri@fmva.unesp.br)

## HISTOLOGIC AND HISTOMORPHOMETRIC EVALUATION OF BONE REPAIR TIBIAE OF OSTEOTOMY IN RATS (*Rattus norvegicus albinos*) UNDERGOING TREATMENT WITH ULTRASOUND, COMPARED THE PRESENCE AND ABSENCE OF CARGO.

### ABSTRACT

The response of bone metabolism is directly related to hormonal factors and mechanical stimuli that the bone is exposed. The ultrasonic energy on bone healing have been shown to be crucial for the stimulation and improvement in quality of newly formed tissue. The aim of this study was to analyze the action of low intensity ultrasound on bone healing of tibial osteotomy in rats subjected to tail suspension, through histological analysis and histomorphometry. Eighteen *Rattus norvegicus albinos*, Wistar, adults were divided into three groups, 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. In all three groups, both tibias were subjected to mono-cortical bone injury 4X2 mm in the medial region of the diaphysis, and the left limb was used as control and the right limb undergoing treatment with ultrasound (U.S.). The right tibia was treated with pulsed ultrasound at a frequency of 1.5 MHz, duty cycle 1:4, 30mW/cm<sup>2</sup>, for 12 sessions of 20 minutes each. Samples of tibia were subjected to histological analysis, blindly, with 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 subdivided parcels and multiple comparison test "Student-Newman-Keuls (SNK), with a significance level of 5%. The average values and standard deviations of the percentage of newly formed bone for the groups showed the least amount of bone repair G1t (13.62% ± 4.88%) - G1c (8.68% ± 4.16%) compared G2t groups (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 the tibia treated G2t and G3t were significantly higher when compared to the repair of tibia in the control group (G2c and G3c). Consequently, we conclude 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.

## EVALUACIÓN HISTOLÓGICA Y MORFOMÉTRICA DE REPARACIÓN ÓSEA DE TIBIAS DE LA OSTEOTOMÍA EN RATAS (*Rattus norvegicus albinos*) SOMETIDAS A TRATAMIENTO CON ULTRASONIDO, COMPARANDO LA PRESENCIA Y LA AUSENCIA DE CARGA

### RESUMEN

La respuesta del metabolismo óseo está directamente relacionada con factores hormonales y estímulos mecánicos que el hueso está expuesto. La energía ultrasónica en reparación ósea ha demostrado ser crucial para la estimulación y la mejora en la calidad de los tejidos recién formados. El objetivo de este estudio fue analizar la acción de los ultrasonidos de baja intensidad en la cicatrización ósea de la osteotomía tibial en ratas sometidas a la suspensión de la cola, a través del análisis histológico y histomorfometría. Dieciocho *Rattus norvegicus albinos*, cepa Wistar, adultos se dividieron en tres grupos, dispuestos de la siguiente manera:

G1 (n = 6), que permaneceram livres durante um período de 15 dias, G2 (n = 5), suspenso por la cola por un período de 15 días y G3 (n = 7), suspenso por la cola por un período de 36 días. En los tres grupos, tanto tibias fueron sometidas a lesión ósea mono cortical de 4X2 mm en la región medial de la diáfisis, y la extremidad izquierda se utilizó como control y la rama derecha en tratamiento con ultrasonido (EE.UU.). La tibia derecha se trató con pulsos de ultrasonido a una frecuencia de 1,5 MHz, ciclo de trabajo 1:4, 30mW/cm<sup>2</sup>, durante 12 sesiones de 20 minutos cada uno. Las muestras de la tibia se sometieron a análisis histológico, a ciegas, con microscopía de luz y el análisis histomorfométrico un software específico Image-Pro 6,1. El promedio de formación de nuevos huesos fueron sometidos a análisis de varianza en parcelas subdivididas y prueba de comparación múltiple " Student-Newman-Keuls" (SNK), con un nivel de significancia del 5%. Los valores medios y desviación estándar del porcentaje de hueso y las articulaciones de los grupos mostró la menor cantidad de G1t reparación ósea (13,62% ± 4,88%) - G1c (8,68% ± 4,16%) en comparación G2t grupos (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 desviación estándar del porcentaje de la reparación ósea recién formada en la tibia tratada G2t y G3t fueron significativamente mayores en comparación con la reparación de la tibia en el grupo control (G2c y G3c). En consecuencia, se concluye que el ultrasonido ha ayudado a acelerar la reparación de los huesos, tanto en presencia como en ausencia de carga.

**Palabras clave:** Regeneración ósea, simulación de ausencia de peso, ultrasonido de baja intensidad.

## INTRODUÇÃO

São inúmeros os fatores que podem alterar o metabolismo ósseo e conseqüentemente sua resposta diante de alterações fisiológicas ou patológicas, sendo comum o atendimento de pacientes portadores de fraturas não consolidadas ou com atraso na consolidação. É sabido que estímulos mecânicos como a contração muscular e a descarga de peso corporal, participam do processo de reparação óssea (1). Johnson (2) afirma que períodos de sete a quatorze dias de ausência de contato com o solo são suficientes para promover alterações ósseas significativas, principalmente em membros 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 óssea 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 neoformado (6). O ultrassom transmite a sua energia mecânica 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 se propaga, sendo necessário um meio elástico para sua propagação (7). O meio irradiado oscila de acordo com a frequência do gerador ultrassônico, por efeito piezométrico, ao comprimir e expandir a matéria. As deformações micromecânicas ocorridas no tecido ósseo, por ação do ultrassom, são similares àquelas ocorridas sob carga mecânica e passam a agir como sinalizadores para a formação de tecido ósseo (8). Muitos estudos já mostraram a eficácia do ultra-som de baixa intensidade (frequência de 1,5MHz, 30mW/cm<sup>2</sup> - SATA, com intervalos de 200µs, frequência de repetição de 1 KHz e ciclo de trabalhos de 20% ) no reparo ósseo de defeito ósseo experimental (9-12), no reparo ósseo em ratas ovariectomizadas (13-15)

e, 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), 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 deste tipo de ultrassom no reparo ósseo em modelos experimentais de ratos suspensos pela cauda, com o intuito de simular as alterações no metabolismo ósseo em paciente exposto a períodos prolongados no leito ou a ambientes de microgravidade, como por exemplo, as viagens espaciais (20-22, 5).

A avaliação experimental do reparo ósseo utilizando análises densitométricas e biomecânicas são comumente encontradas na literatura. Entretanto, alguns autores têm relacionado esta metodologia à ausência de resultados significativos em estágios iniciais de reparo, pelo baixo conteúdo mineral ósseo e a uma grande quantidade de tecido ósseo neosintetizado que ainda não está totalmente calcificado, não expressando assim resistência óssea considerável (23,24). Desse modo, o objetivo deste estudo foi analisar pela avaliação histológica e histomorfométrica o reparo ósseo de tíbias osteotomizadas de ratos submetidos à suspensão pela cauda tratados 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 n° 2007-002868.

Os animais utilizados foram ratos (*Rattus norvegicus albinus*), machos, adultos, da raça Wistar, de massa corporal média  $348 \pm 14$ 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 e ração balanceada para rato (Primor<sup>®</sup>) *ad libidum* 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: Grupo 1 (G1), constituídos de 6 ratos submetidos à cirurgia para a realização da lesão óssea, permanecendo livres em gaiolas individuais pelo período de 15 dias; Grupo 2 (G2), constituído de cinco ratos submetidos à cirurgia para realização da lesão óssea e a suspensão pela cauda por período de 15 dias e o Grupo 3 (G3), constituído de sete ratos que após a suspensão por 21 dias, foram submetidos à cirurgia para a realização da lesão óssea e novamente suspensos por mais 15 dias.

Em todos os grupos, ambas as tíbias foram submetidas à lesão óssea sendo a direita submetida ao tratamento com ultrassom (US) e a esquerda utilizada como controle.

### Cirurgia

Seguindo o protocolo descrito por Riso (12), os animais foram pesados e anestesiados com a associação de ketamina e xilazina nas doses de 100 mg/Kg e 10 mg/Kg, respectivamente por via intraperitoneal. A lesão óssea monocortical de 4x2 mm foi criada no terço médio da diáfise das tíbias 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 dose única de pentabiótico (0,035mL/Kg peso vivo) pela via subcutânea (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 (30 mg/kg) e xilazina (3 mg/kg) pela via intramuscular (12). Em seguida, a cauda foi envolvida por espuma adesiva (Reston<sup>®</sup>) 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, que foi tencionada homoganeamente envolvendo toda a espuma. Sobre o envoltório da tira elástica foi utilizado cadaço de sarja, fixado por 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 permitiu aos animais livre movimentação com os membros torácicos, mantendo o animal visualmente inclinado aproximadamente 30 graus em relação ao assoalho, (Figura A) (25). Durante todo o período de suspensão os animais tiveram acesso a água e ração. Após os procedimentos de preparação da cauda foi aplicado banamine subcutâneo na dose de 2,5 mg/kg. Esta aplicação foi realizada a cada 12 horas por um período de três dias consecutivos (12).

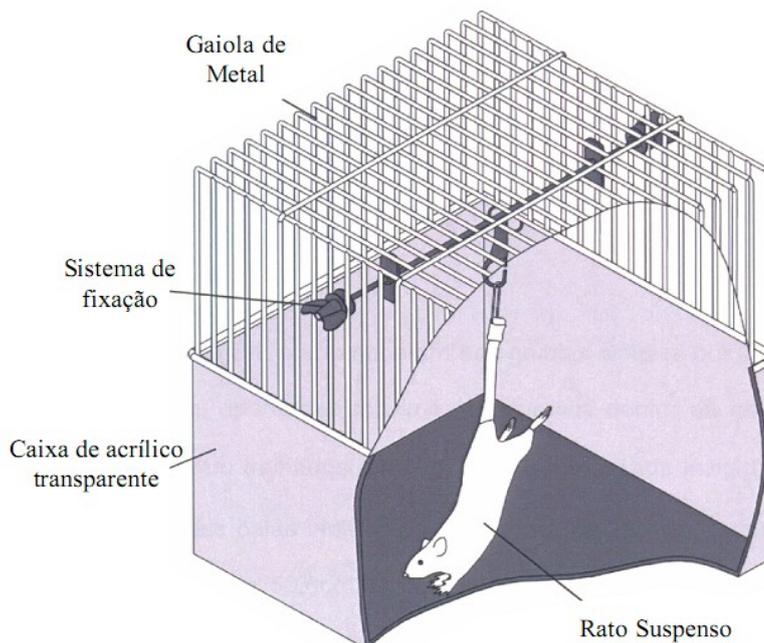


Figura A. Desenho Esquemático do rato suspenso pela cauda. Fonte: Shimano (25).

### Tratamento com Ultrassom

As aplicações do ultrassom foram executadas de forma padronizada ocorrendo a primeira sessão 24 horas após a realização do defeito ósseo, sendo realizadas sessões diárias

de 20 minutos cada, com intervalo de 24 horas após 6 sessões consecutivas, cumprindo-se um total de 12 sessões de tratamento (11). O tratamento com ultrassom foi realizado 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, pela via intravenosa. Após a dissecação, os ossos foram envolvidos em gases umedecidos em soro fisiológico e estocados em “freezer” a temperatura aproximada de -20° C, para posterior análise histológica (5).

### **Análise Histológica**

As tíbias foram fixadas em paraformaldeído 4% tamponado, por 24 horas; descalcificadas em EDTA a 10% - até atingir o ponto de corte e posteriormente submetidas ao auto-processador, durante 13 horas, seguindo a sequência de álcool e xilol; e incluídas em parafina por meio do auto inclusor. Foram realizados cortes seriados com espessura de 5µm, corados pela técnica de Hematoxilina/Eosina (HE) para análise morfológica e tricômico de Mallory (TM) para análise morfométrica. Após o procedimento 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 Olympus BX-50<sup>®</sup> (aumento de 40X) e digitalizadas pelo programa DP2-BSW<sup>6</sup>. As imagens foram submetidas à padronização específica do programa Image - pro 6.1<sup>7</sup> que utiliza cores diferentes para as áreas a serem analisadas. Utilizou-se vermelho para as áreas com trabécula óssea e 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 (26).

### **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” “Statistical Analysis System” (SAS)<sup>8</sup>.

## **RESULTADOS**

### **Análise Histológica**

Na análise histológica da maioria dos espécimes pertencente ao lado tratado do Grupo 1 (G1) observou-se a presença de trabéculas ósseas neoformadas ocupando todo o espaço entre a parede óssea pré-existente (Figura B). Entretanto, em algumas amostras foi observada a

<sup>6</sup> PROGRAMA DP2-BSW. Version 2.2, USA: Programa DP2-BSW, 2008

<sup>7</sup> SOFTWARE IMAGE PRO. Version 6.1, Bethesda, MD, USA : Media Cybernetics, 2008

<sup>8</sup> SAS INSTITUTE. Version 9.1.3, Cary, NC: SAS Institute, 2005

presença de delgadas trabéculas ósseas neoformadas, muitas vezes isoladas, ocupando o espaço entre as bordas do defeito ósseo. Nos espaços entre as trabéculas neoformadas, notou-se ausência de tecido conjuntivo sem diferenciação óssea.

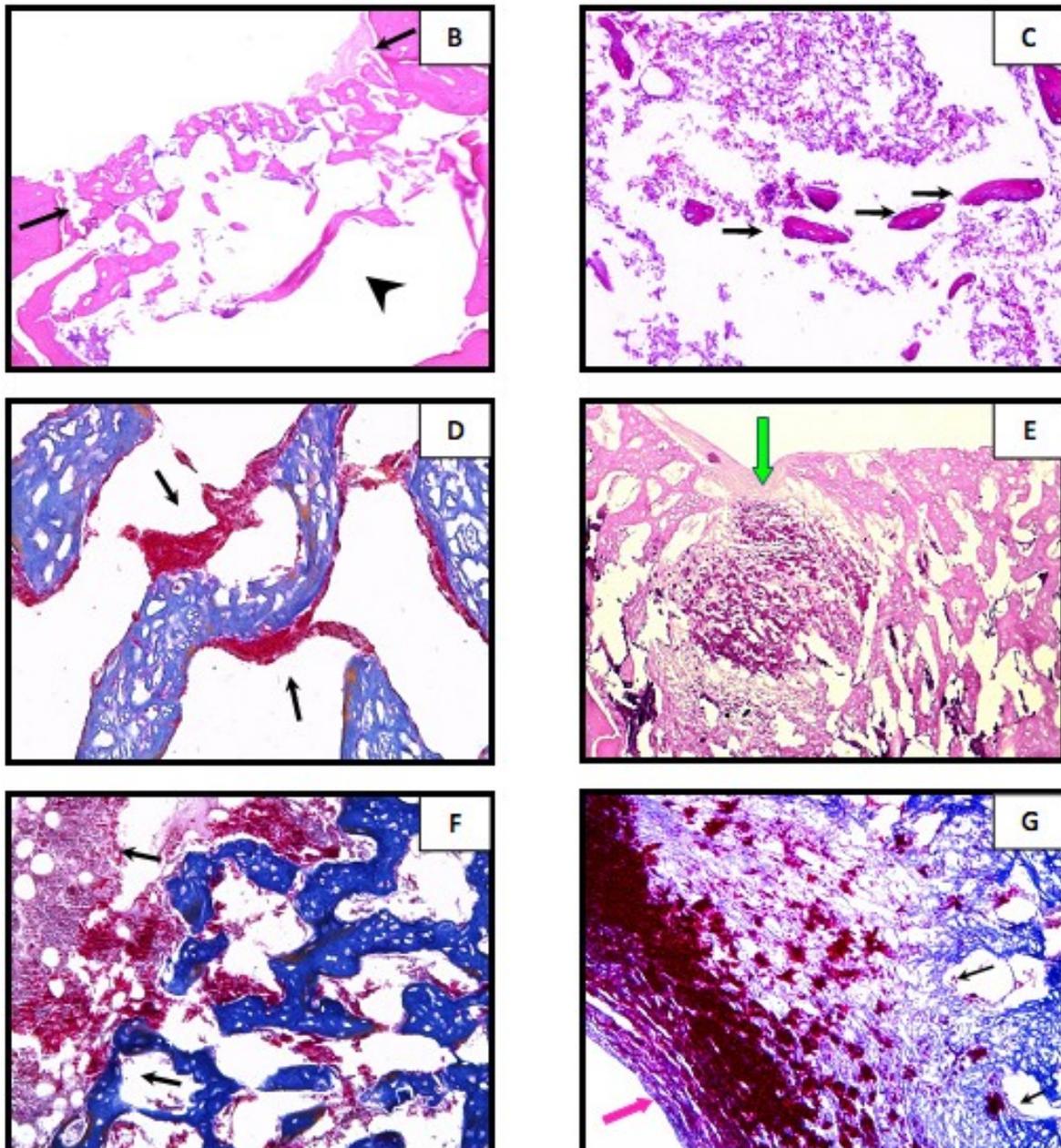
No lado controle do Grupo 1 (G1<sub>c</sub>) observou-se delgada camada de tecido ósseo neoformado, ocupando toda a extensão da borda da parede óssea pré-existente. Entretanto, em outros espécimes deste grupo, observou-se a presença de tecido ósseo neoformado ocupando maior espaço entre a parede óssea pré-existente. Verificou-se, no entanto, inúmeras espículas ósseas isoladas (Figura C). Ressalta-se a ausência de tecidos ósseos indiferenciados entre as trabéculas neoformadas.

Nos espécimes do lado tratado do Grupo 2 (G2<sub>t</sub>), foi observada a presença de trabéculas neoformadas, preenchendo totalmente o espaço entre as paredes pré-existentes. Entretanto, em dois espécimes foram observados na parte lateral das trabéculas, discretas áreas ocupadas por estruturas pouco definidas, com características de coágulo em reabsorção (Figura D). Com relação ao lado controle do Grupo 2 (G2<sub>c</sub>), observou-se em alguns espécimes a presença de trabéculas ósseas neoformadas preenchendo totalmente o espaço entre os tecidos ósseos pré-existentes e, em inúmeros pontos, observaram-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 E). 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 Grupo 3, no lado tratado (G3<sub>t</sub>) evidenciaram-se a presença de trabéculas ósseas neoformadas ocupando parcialmente o espaço entre as paredes ósseas pré-existentes. Adjacentes ao trabeculado ósseo neoformado, observaram-se nestes espécimes extensas áreas ocupadas por estruturas pouco definidas, como também a presença de coágulo em degeneração. Já em outros animais deste grupo, o espaço entre as paredes ósseas pré-existentes encontrava-se ocupado quase que totalmente por trabéculas ósseas pouco definidas (Figura F). Foi observado no lado controle de dois animais do Grupo 3 (G3<sub>c</sub>) a presença de delgadas trabéculas ocupando o espaço entre as paredes ósseas pré-existentes. Nos demais casos notaram-se a presença de trabéculas ósseas neoformadas ocupando parcialmente o espaço entre as paredes ósseas pré-existentes. As áreas com ausência de neoformação óssea encontravam-se ocupadas por estrutura com características de coágulo sanguíneo em degeneração (Figura G). Outro fato relevante foi a ausência de tecido conjuntivo sem diferenciação óssea e osteoblastos entre as trabéculas ósseas neoformadas observado também no grupo 3, tanto no lado controle como no lado tratado.

### **Análise Histomorfométrica**

Na Tabela 1 são apresentados e comparados os resultados das médias e desvios padrão da porcentagem de osso neoformado dos membros controle e tratado de cada grupo, obtidos pela análise histomorfométrica.



FIGURAS: **(B)** 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 de células e tecido em diferenciação. Hematoxilina/Eosina. 40x (zoom digital). **(C)** Fotomicrografias do **G1 controle**: As setas pretas indicam as espículas ósseas. Hematoxilina/Eosina. 200x. **(D)** Fotomicrografias do **G2 tratado**: As setas indicam as áreas ocupadas por estruturas com características de coágulo em degeneração. Tricômico de Mallory. 400x. **(E)** Fotomicrografias grupo **G2 controle**: observa se as extensas áreas ocupadas por coágulos sanguíneos indicado pela seta verde. Hematoxilina/Eosina. 400x(zoom digital). **(F)** Fotomicrografias do **G3 tratado**: As setas indicam as áreas ocupadas por coágulo em degeneração e tecidos em diferenciação. 200x. Tricômico de Mallory. **(G)** 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. 200x.

Tabela 1. Resultados expressos das Médias ( $\bar{x}$ ) e desvio padrão (S) da porcentagem de osso neoformado, segundo os grupos.

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

\*(p > 0,05)

\*\* 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.

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

## DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Segundo Silva (27), 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. No entanto a capacidade do tecido ósseo de responder aos estímulos biomecânicos, não está relacionada somente com a quantidade de osso presente, mas também com a sua microestrutura (28). Entretanto destaca-se a grande importância de pesquisas relacionadas aos assuntos abordados neste estudo.

No presente estudo, a avaliação histológica das amostras de tíbias tratadas do Grupo 1 não demonstraram diferenças consideráveis, quando comparado ao grupo controle. Observou-se neste grupo tanto no lado tratado como no controle 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 (29). Já nas tíbias dos Grupos 2 e 3, observou-se presença de trabéculas neoformadas, preenchendo totalmente o espaço entre as paredes preexistentes.

Na comparação do lado tratado e controle dos Grupos 2 e 3, foi possível observar que o controle apresentou áreas ocupadas por coágulo sanguíneo e estruturas em diferenciação, indicando um estágio inicial de reparo pois, de acordo com as afirmações de Einhorn (30) 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 1, 2 e 3 não há evidência 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 (31) determinaram as propriedades mecânicas do fêmur, da tibia 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  $-20^{\circ}\text{C}$ . Silva e Volpon (5) 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.

Morey-Holton e Globus (32) afirmam que ambientes de microgravidade causam tanto a redução na formação quanto na reabsorção do osso, devido à solicitação mecânica interferir diretamente na quantidade e distribuição espacial do colágeno, e formação das lamelas ósseas.

Os resultados da análise histomorfométrica do G1 revelaram uma diferença significativa quando comparados com os resultados do G2 e G3 tratados e controle. Apesar do G1 ser o grupo não suspenso, ou seja, grupo que recebeu a ação da descarga de peso corporal como também o estímulo mecânico do ultrassom, o volume de tecido ósseo neoformado encontrado foi inferior aos demais. Diferentemente dos nossos achados, Silva e Volpon (5) observaram que a simulação de microgravidade por suspensão nos períodos de 7,14 e 21 dias foram suficientes para promover redução significativa na maioria das propriedades mecânicas, como a carga máxima e a rigidez, provocando uma diminuição da resistência aos esforços aplicados na tíbia e fíbula, quando comparado aos grupos controles não suspenso. Sendo essas reduções mais bem caracterizadas aos 21 dias.

Para Schimitz e Hollinger (33) uma lesão óssea de 4x2mm é um tamanho crítico, pela sua extensão, ou seja, não cicatriza espontaneamente, sendo necessária a colocação de algum tipo de enxerto ou biomaterial para o preenchimento. Tal situação, pode elucidar os achados da histomorfometria e histologia do Grupo 1, onde foi observado, o baixo volume de tecido ósseo neoformado e a formação de calo ósseo, característico de cicatrização secundária. Segundo Dobleré et al. (29) e Pinheiro (34), este tipo de cicatrização ocorre quando não há estabilidade necessária para o reparo do defeito. Belangero (35) afirma que a formação do calo osso é amplamente influenciada pela movimentação interfragmentária, sendo observadas pequenas formações de calo ósseo em fixações estáveis, e grande formação em fixações instáveis. Entretanto, se a movimentação interfragmentária for elevada e gerar instabilidade excessiva, pode ocorrer retardo de consolidação, pseudoartroses e até mesmo a não formação do calo ósseo (36,37). No entanto, pode se ponderar que os animais dos Grupos 2 e 3 com o mesmo defeito ósseo que o Grupo 1, não sofreram instabilidade na fratura, por não terem sido 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 da histomorfometria 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 semelhantes foram encontrados por Lirani (23) 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 completa de Lirani o laser foi melhor. Colucci (26) utilizando o tratamento de ultrassom de baixa intensidade, na análise histomorfométrica verificou junto das espiras do pós-implante, a presença de tecido calcificado mais intenso.

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.

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 9º Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e 5º Encontro Latino Americano de Pós-Graduação; 2005, São José dos Campos. São José dos Campos: Universidade do Vale do Paraíba; 2005. p.1363-6.
2. Johnson RB. The bearable lightness of being: bones, muscles, and spaceflight. *Anat Rec.* 1998; 253: 24-7.
3. Douglas C, Douglas NA. Fisiologia do osso. In: Douglas CR. Tratado de fisiologia aplicada às ciências médicas. São Paulo: Guanabara Koogan; 2006. p. 1243-57.
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: 22-31.
5. Silva AV, Volpon JB. 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. 247-59.
7. Ter Harr G. Basic physics of therapeutic ultrasound. *Physiotherapy.* 1987; 73: 110-23.
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, Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1995.
9. Duarte LR. The stimulation of bone growth by ultrasound. *Arch Orthop Trauma Surg.* 1983; 101:153-9.
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: 193-9.
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: 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: 989-98.
15. Jorge FAJ. Influencia da estimulação ultrassônica de baixa intensidade no reparo de osteotomias de tíbias fixadas com fixação flexível [dissertação]. São Carlos: Escola de Engenharia, Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2004.
16. Takikawa S, Matsui N, Kokubu T, Tsunoda M, Fujioka H, Mizuno K, et al. Low-intensity pulsed ultrasound initiates bone healing in rat nonunion fracture model. *J Ultrasound Med.* 2001; 20:197-205.
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: 961-73.
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: 284-7.
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: 216-20.
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: 265-73.
21. Martin TP, Edgerton VR, Grindeland RE. Influence of spaceflight on rat skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 1988; 65: 2318-25.
22. Musacchia XJ, Steffen JM, Deavers DR. Rat hindlimb muscle responses to suspension hypokinesia/hipodynamia. *Aviation space and environmental. Medicine.* 1983; 54: 1015-20.
23. Cowin SC. On mechanosensation in bone under microgravity. *Bone.* 1998; 22: 119-25.
24. Lirani APR. Estudo comparativo dos efeitos do Ultra-som e do laser de baixa potência no reparo ósseo de tíbia de rato [dissertação]. São Carlos: Escola de Engenharia, Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2004.
25. Shimano MM. Microestruturas e propriedades mecânicas de ossos cortical e trabecular de ratos, após período de suspensão pela cauda e exercitação [tese]. Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006.
26. 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, Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2002.

27. Silva AV. Modelo de suspensão pela cauda e seu efeito em algumas propriedades mecânicas do osso do rato [dissertação]. São Carlos: Escola de Engenharia, Instituto de Química, Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2002.
28. Kleerekoper M, Villanueva AR, Stanciu J, Rao DS, Parfitt AM. The role of three-dimensional trabecular microstructure in the pathogenesis of vertebral compression fractures. *Calcif Tissue Int.* 1985; 37: 594-7.
29. Doblaré M, García JM, Gómez MJ. Modeling bone tissue fracture and healing: a review. *Eng Fract Mech.* 2004; 17:1809-40.
30. Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Rel Res.* 1998; (355): 7-21.
31. Hoyer HE, Lipper TH. Biomechanical change in long bones of han – wistar rats during postnatal development. *Anat Embryol.* 1982; 64: 101-11.
32. Morey-Holton ER, Globus RK. Hindlimb unloading of growing rats: a model for predicting skeletal changes during space flight. *Bone* 1998; 22: 83-88.
33. Shimitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for cranio mandibulofacial nonunions. *Clin. Orthop.* 1986; 205: 299-308.
34. Pinheiro ALB, Gerbi ME. Photoengineering of bone repair processes. *Photomed Laser Surg.* 2006; 21: 169-78.
35. Belangero WD. Princípios gerais de osteossíntese e fixação das fraturas. In: Reis FB. *Fraturas.* São Paulo: Atheneu; 2005. cap. 7, p. 59-66.
36. Duda GN, Eckert-Hübner K, Sokiranski R, Kreutner A, Miller R, Claes L. Analysis of inter-fragmentary movement as a function of musculoskeletal loading conditions in sheep. *J Biomech.* 1998; 31: 201-10.
37. Kenwright J, Goodship AE. Controlled mechanical stimulation in the treatment of tibial fractures. *Clin Orthop.* 1989; 241:36-47.

**Recebido em: 19/01/2010**

**Aceito em: 12/08/2010**