O USO DA HIDROXIAPATITA ASSOCIADA A
ESTIMULAÇÃO ULTRA-SÔNICA PULSADA DE
BAIXA INTENSIDADE NA CORREÇÃO DE
FALHA ÓSSEA. ESTUDO EXPERIMENTAL EM
COELHOS

Rinaldo Roberto de Jesus Guirro

Orientador: Prof. Dr.: Affonso Luiz Ferreira

**BIOENGENHARIA
USP**

Curso de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia

*Escola de Engenharia de São Carlos
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Instituto de Química de São Carlos*

UNIVERSIDADE DE SAO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SAO CARLOS
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRAO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOENGENHARIA

O USO DA HIDROXIAPATITA ASSOCIADA A
ESTIMULAÇÃO ULTRA-SÔNICA PULSADA DE
BAIXA INTENSIDADE NA CORREÇÃO DE
FALHA OSSEA. ESTUDO EXPERIMENTAL EM
COELHOS

RINALDO ROBERTO DE JESUS GUIRRO

DEDALUS - Acervo - EESC

31100036773

SÃO CARLOS

1995

UNIVERSIDADE DE SAO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SAO CARLOS
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRAO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOENGENHARIA

O USO DA HIDROXIAPATITA ASSOCIADA A
ESTIMULAÇÃO ULTRA-SONICA PULSADA DE
BAIXA INTENSIDADE NA CORREÇÃO DE
FALHA OSSEA. ESTUDO EXPERIMENTAL EM
COELHOS

Rinaldo Roberto de Jesus Guirro

Dissertação apresentada à Área
Interunidades - Escola de Engenharia
de São Carlos e Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto, Universidade de
São Paulo, para a obtenção do
grau de Mestre em Bioengenharia.

Orientador: Prof. Dr. Affonso Luiz Ferreira

São Carlos

1995

Class.	TE SE - EESC
Cott.	2600
	e. 1
Tombo	T0176 95

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS

FAVAREDA DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA

1203832

COELHOS
FALSA DSSGA - ESTUDO EXPERIMENTAL EM
BAIXA INTENSIDADE DE EXERCÍCIO
ESTIMULADO ULTRA-RÁPIDO EM SADA DE
O USO DA HIBROXITATITA ASSOCIADA A

Distúrbio apresentado a nível
intermediário - Estado de emergência
de São Carlos e Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto, Universidade de
São Paulo, para a obtenção do
grau de Mestre em Engenharia.

Assinado por: Dr. Antônio José Pereira

São Carlos

1995

AGRADECIMENTOS

Aos funcionários do Departamento de Bioengenharia, pela atenção;

As funcionárias Cilmara e Vanir, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pelo preparo do material histológico;

A CAPES, pelo apoio financeiro;

As alunas Cristina Breitschwerdt, Daniela Elias, Margareth Ferrari e Roberta Rato, do Curso de Fisioterapia da UNIMEP, pelo auxílio nos procedimentos cirúrgicos e cuidado com os animais.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao Prof. Dr. Affonso Luiz Ferreira, pela orientação, pelos valiosos conhecimentos transmitidos e acima de tudo pela amizade.

"Não é da posse do conhecimento ou da verdade irrefutáveis que se constitui o homem da ciência, mas da incessante procura da verdade"

Karl Popper

Aos meus pais Heraldo e Conceição.

A vocês que abriram as portas do meu futuro, iluminando o meu caminho com a luz mais intensa que puderam encontrar: o estudo

A minha esposa Elaine, e minhas filhas Amanda e Bárbara.

A vocês que revestem a minha existência com amor, carinho e dedicação

CONTEUDO

- LISTA DE FIGURAS	vii
- RESUMO	ix
- ABSTRACT	x
1.0 - REVISAO DA LITERATURA	01
1.1 - Tecido Osseo	01
1.1.1 - A Osteogênese	04
1.1.2 - Propriedades Elétricas do Osso	07
1.1.3 - Propriedades Mecânicas do Osso	11
1.2 - Fontes de Energia Capazes de Promover a Osteogênese ...	15
1.2.1 - Corrente Elétrica	15
1.2.2 - Campo Eletromagnético	17
1.2.3 - Ultra-som	18
1.3 - Hidroxiapatita	21
2.0 - A CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA	25
3.0 - OBJETIVO	28
4.0 - MATERIAL E MÉTODO	29
4.1 - Material	29
4.1.1 - Animal de Experimentação	29
4.1.2 - Hidroxiapatita	29
4.1.3 - Equipamento Gerador de Ultra-som	30
4.2 - Método	30
4.2.1 - Anestesia e Procedimento Cirúrgico	30
4.2.2 - Organização dos Grupos Experimentais	32
4.2.2.1 - Grupo I-V (Osteotomia Vazia)	32
4.2.2.2 - Grupo II-HA (Osteotomia Preenchida com HA)	32

4.2.3 - Métodos de Avaliação	34
4.2.3.1 - Exame Radiológico	34
4.2.3.2 - Exame Macroscópico e Histopatológico	34
5.0 - RESULTADOS	36
5.1 - Avaliação Radiológica	36
5.1.1 - Osteotomia Vazia (Grupo I-V)	37
5.1.2 - Osteotomia Preenchida com HA (Grupo II-HA)	38
5.2 - Avaliação Macroscópica	42
5.2.1 - Osteotomia Vazia (Grupo I-V)	42
5.2.2 - Osteotomia Preenchida com HA (Grupo II-HA)	44
5.3 - Avaliação Histopatológica	46
5.3.1 - Osteotomia Vazia (Grupo I-V)	46
5.3.2 - Osteotomia Preenchida com HA (Grupo II-HA)	50
6.0 - DISCUSSÃO	54
7.0 - CONCLUSÕES	63
8.0 - SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	65
9.0 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

LISTA DAS ILUSTRAÇÕES

Quadro 1: Parâmetros físicos do ultra-som	30
Quadro 2: Distribuição dos animais nos grupos, com os respectivos períodos de seguimento.	33
Quadro 3: Compilação da metodologia utilizada e dos resultados obtidos	54
Figura 1: Acompanhamento radiológico das falhas ósseas que permaneceram vazias. A imagem direita corresponde ao segmento estimulado e a esquerda ao controle. Grupo I-V. Imagens 0-E e 0-D: Falha óssea após 24 horas Imagens 3-C e 3-E: Falha óssea após 3 semanas Imagens 6-C e 6-E: Falha óssea após 6 semanas Imagens 9-C e 9-E: Falha óssea após 9 semanas	40
Figura 2: Acompanhamento radiológico das falhas ósseas que foram preenchidas com hidroxiapatita. A imagem direita corresponde ao segmento estimulado e a esquerda ao controle. Grupo II-HA. Imagens 0-E e 0-D: Falha óssea após 24 horas Imagens 3-C e 3-E: Falha óssea após 3 semanas Imagens 6-C e 6-E: Falha óssea após 6 semanas Imagens 9-C e 9-E: Falha óssea após 9 semanas	41
Figura 3: Fotografias das falhas ósseas que permaneceram vazias após o ato cirúrgico. Grupo I-V. A imagem direita corresponde ao segmento estimulado e a esquerda ao segmento controle. Observar a figura (a) onde a seta indica o sulco ósseo de maior profundidade deixado por um tendão.	43
Figura 4: Fotografias das falhas ósseas que foram preenchidas com hidroxiapatita após o ato cirúrgico. Grupo II-HA. A imagem direita corresponde ao segmento estimulado e a esquerda ao segmento controle.	45
Figura 5: Fotomicrografias da falha óssea vazia (Grupo I-V) de animal sacrificado após 3 semanas de acompanhamento. Imagem superior: falha óssea controle - observar tecido cartilaginoso e imagem inferior: falha óssea estimulada - observar as traves ósseas e a pouca organização do tecido neoformado.	48
Figura 6: Fotomicrografias da falha óssea vazia (Grupo I-V), de animal sacrificado após 6 semanas de acompanhamento. Imagem superior - falha óssea controle e imagem inferior - falha óssea estimulada. Observar as diferenças entre a celularidade e a espessura do periósteo.	49
Figura 7: Fotomicrografia da falha óssea vazia (Grupo I-V) estimulada, de animal sacrificado após 6 semanas de acompanhamento. Observar a orientação do tecido neoformado.	50

- Figura 8: Fotomicrografia da falha óssea preenchida com hidroxiapatita (Grupo II-HA) controle, de animal sacrificado após 3 semanas de acompanhamento. Observar a desorganização do tecido neoformado e a presença de grandes vacúolos. 51
- Figura 9: Fotomicrografia da falha óssea preenchida com hidroxiapatita (Grupo II-HA) estimulada, de animal sacrificado após 6 semanas de acompanhamento. Observar a desorganização do tecido neoformado e a presença de grandes vacúolos. 52
- Figura 10: Fotomicrografia da falha óssea preenchida com hidroxiapatita (Grupo II-HA) de animal sacrificado após 9 semanas de acompanhamento. Imagem superior - falha óssea controle e imagem inferior - falha óssea estimulada. Observar a presença de vacúolos na amostra controle e a desorganização do tecido neoformado. 53

RESUMO

A presente pesquisa tem como finalidade o estudo comparativo da indução de ossificação em falhas ósseas obtidas experimentalmente, preenchidas ou não com hidroxiapatita (HA-40) e estimuladas com o ultra-som pulsado de baixa intensidade. Para tal fim foram utilizados 12 coelhos adultos, da linhagem Nova Zelândia, separados em dois grupos experimentais iguais e escolhidos aleatoriamente. Todos os animais foram submetidos a uma osteotomia bilateral do terço distal do rádio, com preservação do periósteo, a fim de se produzir uma falha óssea de aproximadamente 8 mm. Os animais de um dos grupos experimentais tiveram as falhas ósseas preenchidas com hidroxiapatita. Em ambos os grupos a falha óssea direita recebeu estímulo ultra-sônico pulsado (intensidade de 18 mW com frequência de 1,5 MHz) por 20 minutos, durante 15 dias consecutivos, de forma estacionária. A falha óssea esquerda permaneceu como controle. O controle radiológico foi realizado 24 horas, 3, 6 e 9 semanas após a cirurgia, sendo que ao final de cada um desses períodos dois animais eram sacrificados. A análise radiológica nos revelou um aumento do calo ósseo e uma maior espessura da cortical em todas as diafises estimuladas. A análise macroscópica demonstrou que as falhas preenchidas com hidroxiapatita e estimuladas com ultra-som, apresentaram-se em fase de ossificação mais avançadas do que o controle porém, quando comparadas com as osteotomias vazias, estas apresentavam processo de reparação mais evidente, independente da estimulação. Nossos resultados sugerem que a energia ultra-sônica pulsada de baixa intensidade mostrou-se ser um recurso eficaz na aceleração do processo de ossificação e que a hidroxiapatita, utilizada no experimento, apresenta uma baixa taxa de osteoindução.

ABSTRACT

This research's purpose is the comparative study of ossification's induction in bone defect experimentally obtained, filled in or not with Hydroxyapatite (HA - 40) and stimulated by low-intensity pulsed ultrasound. The experiment included the utilization of 12 adults rabbits, from New Zeland lineage, sorted out in two equal experimental groups, and aleatory selected. An animals were submitted to bilateral osteotomy of the ratio's distal third, preserving the periosteum, for the production of a 8mm bone defect. The animals of one experimental group had the bone defect filled in with Hydroxiapatite. In both group the right bone defect received pulsed ultrasonic stimulus (18 mW intensity with 1,5 MHz frequency) for 20 minutes, during 15 consecutive days, in a stationary way. The left bone defect remained as a control. Radiologic control was made 24 hours, 3, 6 and 9 weeks after the surgery, and at the end of each period two animals were sacrificed. The radiologic analysis showed us an increase of the bone callus and a bigger cortical thickness in all stimulated diaphyses. The macroscopical analysis demonstrated that the defects wich were filled in with Hidroxyapatite and stimulated with ultrasound, appeared to be in a more advance ossification phase than the empty osteotomy; these appeared to be in a more evident healing process, independent on stimulation. Our results suggest that the low-intensity pulsed ultrasound appeared an effective resort in the ossification process's acceleration, and showed that the Hydroxiapatite, which was used in the experiment, presents a low percentage of osteoinduction.

1.0 - REVISAO DA LITERATURA

1.1 - O Tecido Osseo

O osso é um tipo de tecido conjuntivo altamente especializado com uma estrutura colágena mineralizada tendo como uma de suas principais funções o apoio esquelético do corpo.

O tecido ósseo, do ponto de vista de sua estrutura macroscópica, pode se apresentar como compacto ou trabecular. Do ponto de vista microscópico o osso é classificado da seguinte maneira: 1) osso imaturo ou fibroso e 2) osso maduro ou lamelar (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 1990). O osso imaturo recebe também a denominação de osso fibroso, em virtude da grande proporção de fibras colágenas irregularmente distribuídas; é muito mais celular e contém mais proteoglicanas, porém tem menos substância cementante assim como menos minerais que o osso maduro. Ao longo da vida, sob condições nas quais o osso é formado rapidamente (tais como durante a consolidação de fraturas), o primeiro osso formado é do tipo imaturo. Aqui também o osso imaturo formado com rapidez é substituído mais tarde por osso maduro. O osso maduro é caracterizado pela disposição concêntrica das lamelas de tecido colágeno que formam complexos sistemas haversianos, os quais estão bem alinhados para permitir a circulação do sangue no interior da grossa camada de osso cortical. O osso maduro é menos celular e contém mais substância cementante bem como mais mineral que o osso imaturo.

O osso apresenta na sua composição bioquímica 35% de substâncias orgânicas, 45% de substâncias inorgânicas e 20% de água. O componente orgânico do osso inclui as células ósseas assim como a substância

intercelular orgânica, ou matriz. As fibras colágenas constituem 94% da matriz orgânica, compreendendo cerca de 19% do peso de todo o osso compacto (MILLER & MARTIN, 1968). A maior parte da fração orgânica secundária é composta de polissacarídeos proteicos (sulfato de condroitina e sulfato de queratan).

A síntese e a mineralização do colágeno no osso são intimamente coordenadas. Observam-se velocidades diferentes de síntese do colágeno em ossos diferentes e em áreas diferentes do mesmo osso (FIRSCHEIN, 1967). O colágeno ósseo difere de outros colágenos pelo fato de que é rápida e mais amplamente ligado de forma cruzada logo após a síntese, resiste à solubilização e, portanto, sua estabilidade conseqüente é particularmente adequada para a mineralização (GLIMCHER e col, 1966).

As substâncias inorgânicas mais importantes do osso são o cálcio e o fósforo, além de outros íons presentes como: magnésio, sódio, carbonato e fluoreto. Embora se saiba que a composição química do cristal ósseo pode variar durante a vida, considera-se geralmente o cristal de hidroxiapatita com a possível fórmula de $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$; o primeiro depósito do material seria provavelmente $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ amorfo.

São três os sistemas vasculares distintos existentes nos ossos longos: 1) um sistema vascular aferente compreendendo as artérias nutritivas e metafisárias que simultaneamente suprem os dois terços internos da cortical, enquanto que as artérias periostais suprem o terço externo; 2) um sistema vascular eferente que transporta o sangue venoso e 3) um sistema vascular intermediário de capilares (sistema de Havers e Volkman) no interior da cortical. A direção do fluxo sanguíneo através do osso longo é normalmente centrífuga, ou seja, da cavidade medular para a superfície do perióstio.

A superfície óssea externa é revestida por uma membrana denominada perióstio e a superfície interna por outra membrana, o endóstio. As funções principais tanto do perióstio quanto de endóstio são nutrir o tecido ósseo, pois dos seus vasos partem ramos que penetram nos ossos pelos canais de Volkmann, bem como servir de fonte de osteoblastos para a osteogênese. Por estas razões, nas cirurgias dá-se uma grande atenção tanto ao perióstio como ao endóstio.

Nas crianças a cobertura perióstica é grossa e fragilmente aderida à cortical e produz prontamente osso novo; nos adultos, ao contrário, o perióstio torna-se progressivamente fino, mais aderido à cortical, e produz osso novo menos rapidamente. Estas diferenças explicam, em parte, por que as fraturas se consolidam mais depressa nas crianças do que nos adultos.

A maior parte da superfície óssea nos adultos é recoberta por células alongadas e chatas, chamadas células de revestimento ósseo, que podem ter algumas funções como induzir células osteogênicas, e estas células podem se dividir e se diferenciar em osteoblastos. Podem servir como uma barreira de íons, separando fluidos que passam pelos osteócitos e sistemas canalíco-lacunar para os fluidos intersticiais. Esta membrana, que serve de obstáculo ao redor do osso, pode contribuir para a homeostase mineral, regulando os fluxos de cálcio e fosfato dentro e fora do fluido do osso, e pode também controlar a formação de cristais ósseos mantendo, assim, estável o microambiente (OWEN, 1978).

No sistema vivo, estudos realizados demonstraram que as células mesenquimais são afetadas por cargas elétricas com crescimento no cátodo, podendo ocorrer destruição no ânodo (BASSET, 1971; FRIEDENBERG

& BRIGHTON, 1971; BRIGHTON 1972). Essa conduta é caracterizada por enzimas de dois tipos: a fosfatase alcalina e a fosfatase ácida, respectivamente. Na reconstituição óssea também ocorrem alterações devido às cargas elétricas. Nos osteoblastos, onde há fosfatase alcalina, existe um crescimento no cátodo e nos osteoclastos, onde há a fosfatase ácida ocorre a destruição no ânodo.

A polaridade e o pH não influem apenas na formação ou destruição da célula, mas também na matriz. Por exemplo o colágeno e sais de cálcio são menos solúveis em pH alcalino. Já no ânodo, onde o osso é removido, a acidez deve promover a solubilização do colágeno e da hidroxiapatita. O pH baixo favorece a reabsorção mineral (TUREK, 1991).

1.1.1 - A Osteogênese

Durante a vida fetal e pós-natal todas as células do tecido conjuntivo, cada uma das quais se torna altamente diferenciada e destinada a realizar uma função específica, são provenientes de uma célula indiferenciada, a célula mesenquimatosa. Atualmente está bem estabelecido que durante toda a vida existe uma presença disseminada no sangue circulante, tecidos hemopoéticos e, presumivelmente, nos canais vasculares de todos os sistemas de tecido conjuntivo, de células mesenquimatosas indiferenciadas que podem ser induzidas a formar osso, cartilagem, tecido fibroso ou sangue (OWEN, 1970). Sua distribuição universal significa que elas constituem-se em um reservatório de verdadeiras células multipotenciais. O osso proveniente dessas células indiferenciadas é temporário e são

necessários repetidos atos de atividade indutora para a osteogênese ser mantida; uma vez removido o agente indutor, o osso desaparece.

O osso, por si mesmo, seja imaturo (HELLSTADIUS, 1955) ou maduro (BURING, 1967) tem a propriedade de induzir a osteogênese. Experimentalmente foi observada a formação óssea sempre reproduzível em implantes de osso desvitalizado em diversos mamíferos e espécies de laboratório (URIST, 1965).

As propriedades elétricas do tecido ósseo são responsáveis pela diferenciação das células mesenquimais em osteoblastos, capazes de sintetizar matriz óssea e osteoclastos capazes de promover a reabsorção óssea. A osteogênese, a osteoclasia e os mecanismos homeostáticos do tecido ósseo possuem uma natureza nitidamente bioelétrica. Assim, a diferenciação celular no osso estaria diretamente relacionada à polarização elétrica local do tecido, ocorrendo formação de tecido ósseo nas regiões eletronegativas e reabsorção nas regiões eletropositivas (BASSET, 1971).

No enxerto com osso desmineralizado ocorre um crescimento de células mesenquimatosas de capilares, acompanhado por macrófagos e histiócitos migratórios para dentro dos canais vasculares antigos. A matriz antiga é reabsorvida, produzindo "câmaras de escavação" aumentadas e as células mesenquimatosas migratórias se diferenciam principalmente em osteoblastos que então prosseguem para depositar osso novo na matriz antiga. O princípio da indução óssea age melhor em osso desmineralizado. A presença de minerais impede o processo de reabsorção da matriz, retarda a formação das câmaras de escavação e atrasa o início da indução óssea (URIST e col, 1967). O autor relata ainda que a matriz orgânica do osso e a dentina, mesmo na ausência de

células vivas, contém uma proteína óssea morfogenética (BMP) denominada princípio de indução óssea. Dentro do osso existe uma proteinase neutra endógena (BMPase) que degrada a BMP sem definição do colágeno ósseo. Sob condições de extrema acidez e baixa temperatura de uma solução desmineralizadora, a atividade de BMPase é inibida e a BMP é protegida contra a degradação.

O osso não desmineralizado mostra uma auto-indução deficiente, talvez porque a difusão de BMP para a câmara de escavação é lenta e o princípio de indução pode ser suficientemente degradado antes que alcance o local de indução; a inibição química da enzima da matriz reforçará por sua vez a osteoindução (URIST, 1972).

A osteoindução depende da interação substrato-célula. Os histiócitos (macrófagos) reabsorvem primeiramente a antiga matriz morta, em seguida as células primitivas do tecido conjuntivo (células primordiais) são induzidas a se transformarem em células osteoprogenitoras e, finalmente em osteoblastos. A célula que responde é uma célula mesenquimatosa perivascular hipertrofiada. Ela se diferencia em um osteoblasto, um condroblasto ou um hematocitoblasto e se transforma em uma célula induzida que depois se torna uma célula indutora. A indução ocorre em duas direções: centrifugamente, para produzir osso laminado; centripetamente, para produzir novas células ósseas medulares (URIST e col, 1975).

Uma separação simples, não complicada da diáfise de um osso longo, seja resultado de fratura ou de osteotomia, sofre três tipos de reparo, envolvendo a formação do calo ósseo que, por sua vez, é dependente de um suprimento sanguíneo adequado (RHINELANDER, 1972). Segundo o autor, uma fratura ou uma osteotomia, quando as extremidades

opostas do córtex não se encontram em contato absoluto, cicatriza por meio de um calo anastomótico medular, um calo anastomótico periostal e um calo intercortical de união. O calo anastomótico medular é o primeiro a realizar a união óssea. A quantidade de calo perióstal não depende do tamanho do hematoma circundante mas do grau de estabilização dos fragmentos ósseos. Quanto menos segura a fixação, maior é a massa do calo externo de reforço. O calo de união intercortical se desenvolve para preencher o hiato entre as extremidades ósseas. Ele cresce tanto nas superfícies medular como na periostal e a quantidade depende do tamanho do hiato.

Os estágios de reparo após fratura ou osteotomia e sua relação com o suprimento sanguíneo são fundamentais. Os leitos circulatórios tanto medulares como periostais proliferam muito, mas o sistema arterial medular representa um papel fundamental no suprimento sanguíneo para o calo de união e no córtex necrótico revascularizado no local da fratura (COFIELD e col, 1975). O predomínio do suprimento sanguíneo medular aumenta à medida que progride a reparação.

1.1.2 - Propriedades Elétricas do Osso

Os fenômenos elétricos constituem aspectos integrais, embora não exclusivos, de processos biológicos em todos os tecidos, incluindo o osso. As interações eletromecânicas são consideradas como reguladoras da proliferação, diferenciação e função celular (BASSET, 1968; BASSET, 1971).

As fontes de energia elétrica residem intrinsecamente dentro do osso (potenciais de repouso); podem resultar do esforço aplicado ao

osso, desse modo os componentes extracelulares do osso, principalmente o colágeno, agem como transdutores para converter energia mecânica em elétrica (potenciais gerados pelo esforço); ou são provenientes de eletricidade aplicada externamente ou campos eletromagnéticos variando com o tempo. Amplas e continuadas pesquisas contínuas visam definir as propriedades elétricas do osso e os mecanismos pelos quais os estímulos elétricos influenciam os processos biológicos no osso. Embora existam muitas informações em ambos os campos, resta muito a ser feito antes que se consiga um conhecimento detalhado, passo a passo, do controle elétrico de células ósseas (SPADADO, 1977).

O tecido ósseo vivo apresenta potenciais estáveis de repouso, registrados na faixa de microvolts. Estes potenciais de repouso parecem provir em parte de potenciais de fluxo originados nos vasos sanguíneos, visto que a interrupção do fluxo arterial para o osso produz uma queda significativa nos potenciais de repouso enquanto que a oclusão venosa produz um aumento (BASSET, 1971; ERIKSON, 1974).

Quando a diáfise é fraturada, toda a diáfise se torna eletronegativa, em particular sobre o local da fratura, e a eletronegatividade da metáfise torna-se maior. A medida que a fratura cicatriza, as diferenças de potencial voltam ao normal (metáfise - eletronegatividade e a diáfise - a isopolaridade ou tendência para a eletropositividade).

O osso mecanicamente comprimido gera um potencial elétrico. As áreas de compressão tornam-se eletronegativas e apresentam uma osteogênese aumentada, já as áreas de carga de tração apresentam uma eletropositividade e osteogênese reduzida (BASSET, 1968; BASSET, 1971). Supôs-se que esses potenciais elétricos se originam de um

efeito piezoelétrico, presumivelmente originado de tensões mecânicas aplicadas ao colágeno (FUKADA & YASUDA, 1957) e/ou potenciais de fluxo (ERIKSON, 1974).

O osso quando submetido a esforços mecânicos, produzindo uma deformação, desenvolve campos elétricos locais, que imediatamente agem sobre as células mesenquimais, aumentando sua atividade mitótica, acelerando a diferenciação celular (BECKER, 1972). Com o aumento da diferenciação celular, crescerá a população local de células produtoras de matriz orgânica do osso, promovendo o crescimento ou remodelamento ósseo, de acordo com a necessidade enfocada, isto é, regulando suas funções orgânicas.

A piezoeletricidade óssea pode ser explicada segundo os efeitos de transdução de energia elástica em energia elétrica, já que o osso sofre uma deformação (energia elástica), colocando cargas na superfície celular (energia elétrica) (BASSET, 1971). A magnitude da polarização elétrica, depende do campo elétrico existente ou induzido no material piezoelétrico quando este é deformado (CADY, 1949).

Devido as propriedades bioelétricas do osso, a carga mecânica que nele atua por ação de forças hemodinâmicas, age como estímulo externo, fazendo com que a matriz extra-celular óssea se deforme induzindo campos elétricos intramoleculares. De acordo com este sinal elétrico, o osso operará mudanças materiais de maneira adequada quanto a quantidade, tempo e direções necessárias à regeneração, remodelamento ou crescimento ósseo, segundo o processo de retroalimentação negativo. Isto é, à medida que mais material vai se formando aumentará a resistência ao estímulo, como um exemplo típico da lei de Wolff (DUARTE, 1977).

O osso possui, em condições normais, um vetor permanente de polarização na direção do crescimento (BASSET, 1971). Esta polarização é devido ao alinhamento dos dipolos existentes na molécula de tropocolágeno, que coincide com a orientação das fibrilas colágenas. Este alinhamento coincide com a orientação das fibrilas, orientação esta em virtude da postura do esqueleto quando em pé de maneira que haja uma resposta adequada à força da gravidade, que por sua vez possui a mesma orientação que o vetor permanente de polarização (FUKADA & YASUDA, 1964).

O vetor permanente de polarização possui como componentes o vetor radial de polarização e o vetor longitudinal de polarização que estimulam o crescimento ósseo na direção radial e longitudinal, respectivamente. Com o crescimento do indivíduo, diminui em intensidade o vetor radial de polarização, predominando o vetor longitudinal de polarização que permanece, coincidindo com a orientação das fibrilas. Com o final do crescimento, o vetor longitudinal de polarização, que predominava até então, torna-se balanceado eletricamente pela polarização oposta da antiga frente de ossificação, a metáfise. Baseado na informação de quem, com o crescimento, diminui o vetor radial de polarização, se incrementarmos com algum estímulo adequado o referido vetor, aceleraremos o crescimento ósseo na direção radial. Isto é confirmado pela teoria de orientação das fibrilas na tíbia, onde possuem alinhamento paralelo ao eixo do osso e, portanto, o vetor longitudinal de polarização paralela ao eixo do osso e o vetor radial de polarização pouco desenvolvido, o que dificulta, entre outros fatores, a consolidação da tíbia quando fraturada (DUARTE, 1977).

Fukada & Yasuda (1957) demonstraram que o efeito piezoelétrico não deve ser função dos cristais de hidroxiapatita, uma vez que permaneceu inalterado no osso desmineralizado e sim devido ao colágeno.

A propriedade do colágeno de gerar sinais elétricos mediante a aplicação de uma tensão mecânica e contribuir para a reparação óssea, foi descrita por Basset & Becker (1962). De acordo com os autores, o controle da atividade celular e a orientação das macromoléculas dadas pelos sinais elétricos, estariam ocorrendo de acordo com o mecanismo de retroalimentação negativa e é caracterizado pelo aumento do tecido ósseo, com conseqüente aumento da resistência aos estímulos externos.

1.1.3 – Propriedades Mecânicas do Osso

O osso não é flexível nem quebradiço, antes é uma combinação de ambos (FRANKEL & NORDIN, 1980), com a parte mineral sendo mais rígida e a parte orgânica mais flexível. Visto que o osso demonstra características subordinadas ao tempo (mudanças nas propriedades mecânicas com índices alterados e duração das aplicações de carga), é considerado como um material viscoelástico (EVANS, 1973; CARTER & SPENGLER, 1978; HAYES & CARTER, 1979).

O osso apresenta um limite de deformação elástica e um ponto crítico que delimita o alcance de deformação de uma variação não elástica (BURSTEIN ET ALII, 1976). O osso não é linear nem inteiramente elástico na porção inicial da sua curva tensão-deformação, mas curva-se levemente. Portanto o osso é sujeito a uma deformação não recuperável (escoamento plástico), mas pode ceder sob

tensão e se recuperar da deformação dentro do seu limite (porção elástica da curva tensão-deformação). Não obstante, o osso não exibe uma alta recuperação de deformação quando ocorre uma significativa perda de energia uma histerese ocorre durante uma carga e descarga (ANDREW, 1980).

O osso é um órgão vivo e embora o tecido ósseo seja metabolicamente dispendioso de produzir pode ser modelado e remodelado. A forma aproximada do osso é geneticamente determinada e evidenciada pelas formas das protuberâncias articulares das epífises, embora subdesenvolvidas e as diafises arqueadas, em ossos de recém-nascidos.

De qualquer maneira, muitas das detalhadas formas do osso são produzidas pelas tensões mecânicas de deformação causados pelas descargas de peso e cargas tendinosas, musculares e ligamentares (FROST, 1973). As descargas de peso nos ossos longos assemelham-se a vigas levemente curvadas para que as tensões de arqueamento possam ser minimizados (CURREY, 1968). A geometria ogival das metáfises permite a transferência de grandes cargas aplicadas nas superfícies articulares aos ossos compactos das diáfises (HAYES & CARTER, 1979). Os sítios de inserções dos tendões e ligamentos no osso provêem um meio de transferir cargas da articulação para a diáfise cortical (SINGH, 1978).

O propósito do modelamento ósseo é modificar a forma e ajustar a massa de um osso para que possa resistir às tensões nas atividades diárias. A resistência pode ser alterada pelas modificações no material e propriedades geométricas do osso. Propriedades materiais incluem a porcentagem da porção orgânica e inorgânica do osso, o

número de ligações cruzadas ao longo das fibrilas colágenas e a orientação destas em relação à orientação das cargas aplicadas (EVANS & VINCENTELLI, 1969). Propriedades geométricas constituem a resistência estrutural do osso, como a quantidade da área cortical e subperiosteal, o plano do momento de inércia máximo (a superfície com a maior resistência ao arqueamento) e o plano do momento de inércia mínimo (a superfície com a menor resistência ao arqueamento). Em alguns casos, as mudanças nas propriedades materiais que enfraqueceriam o osso podem ser compensadas por modificações nas propriedades geométricas.

Várias teorias têm versado a respeito do mecanismo que estimula o modelamento e o remodelamento ósseo. Basset (1964 e 1965) relata que os ossos sujeitos a deformação mecânica desenvolvem cargas elétricas, onde as regiões comprimidas (tendendo a ser côncavas) apresentam uma carga negativa, e as regiões estendidas (tendendo a ser convexas) apresentam cargas positivas. Em virtude dessa polaridade, o osso pode ser depositado em regiões negativamente carregadas pelos osteoblastos e reabsorvidos pelos osteoclastos em áreas carregadas positivamente. Essas ligações de deformação mecânica e polarização elétrica são denominadas de "efeito piezoelétrico" e se apresentam como um possível estímulo para o modelamento e o remodelamento ósseo. Fukada (1964) identificou a atividade piezoelétrica como sendo originada pelas fibras colágenas. Becker e Murray (1970) relatam que o campo elétrico causado pela tensão é observado nos sítios de fraturas é capaz de ativar organelas sintetizadoras de proteína, nas células indiferenciadas, em sapos. Além disso afirmaram que a presença do

campo elétrico próximo aos tropocolágenos em polarização levaram as fibras a uma orientação perpendicular às linhas de força.

A tensão adequada, dentro de um limite apropriado, é essencial para a resistência óssea, visto que um osso sub ou supertensionado pode se tornar enfraquecido (HAYES & CARTER, 1979).

A lei de Wolff de 1884 defendida por Frankel e Nordin (1980) relaciona o crescimento ósseo a tensão e a deformação localizadas no osso; isto é, a capacidade do osso de adaptar-se às mudanças de tamanho, forma e estrutura, depende das tensões mecânicas no osso. Se a tensão diminui, ocorre a reabsorção do osso periostal e subperiostal com a conseqüente diminuição em resistência e rigidez. Se o osso é sujeito a altas e consistentes tensões mecânicas, concernentes a um índice fisiológico normal, pode ocorrer uma hipertrofia do osso periostal e subperiostal, com um aumento na densidade óssea.

Alterações nas propriedades mecânicas do osso podem ser explicadas por uma das teorias de remodelamento apresentadas através de uma combinação de teorias ou talvez através de um processo ainda não completamente entendido. Em virtude das fibras colágenas proverem resistência à tensão, rigidez e flexibilidade, fibras de elastina provêm extensibilidade e fragilidade, glicosaminoglicanas provêm resistência à compressão. Uma alteração na porcentagem desses materiais pode consideravelmente alterar as propriedades mecânicas de um tecido. A curva tensão-deformação do colágeno e da elastina demonstraram que as fibras colágenas podem resistir 10% ou menos ao alongamento, ao passo que fibras de elastina podem ser alongadas em até 200% de seu comprimento original, antes da ruptura (FRANKEL & NORDIN, 1980). Fibras de colágeno e elastina podem variar em grandes

porções na orientação, dentro de qualquer tecido conjuntivo, incluindo o osso. Fibras podem se compor paralelas, perpendiculares, oblíquas ou ao acaso a qualquer carga aplicada; podem cursar isoladamente ou em séries; podem ainda ser onduladas (existe uma condição ondulatória quando relaxada e uma linear quando carregada). Se todas as fibras fossem orientadas equitativamente, em todas as direções, o tecido seria isotrópico; isto é, teria as mesmas propriedades mecânicas quando carregado em todas as direções. De qualquer forma, a natureza anisotrópica do osso resulta em propriedades mecânicas diferentes que dependem da orientação da estrutura óssea com relação à carga aplicada (HAYES & CARTER, 1979).

1.2 - Fontes de Energia Capazes de Promover a Osteogênese

Está atualmente bem estabelecido que fontes extrínsecas de energia podem induzir a osteogênese e podem ser utilizadas terapeuticamente para promover o reparo de fraturas e vencer a falta de união (BASSET, 1964; FRIEDENBERG, 1966; FRIEDENBERG et alii, 1974; BRIGHTON et alii, 1977; DUARTE, 1977; FITTON & BASSET, 1980; SHTEYER et alii, 1980; XAVIER & DUARTE, 1983).

1.2.1 - Corrente Elétrica

Das diversas forças físicas que agem sobre uma célula óssea para produzir sua resposta genética, a eletricidade foi uma das amplamente estudada (BASSET, 1968; FRIEDENBERG, 1966; BASSET, 1971). A estimulação do crescimento ósseo pela aplicação de corrente elétrica,

embora eficiente, apresenta o inconveniente da natureza invasiva do método de implantação dos eletrodos. Com a estimulação elétrica ocorre uma resposta osteogênica reprodutível ao redor de um cátodo quando pequenas quantidades de corrente contínua são aplicadas sob certas condições (BASSET, 1964; FRIEDENBERG, 1966; FRIEDENBERG et alii, 1974). A intensidade deve ser mantida entre 10 a 20 micro ampères onde há máxima osteogênese, com o potencial inferior a 1 volt. Microamperagem maior tende a produzir necrose do tecido local (FRIEDENBERG et alii, 1970)

Bassett e Pawlick (1964) implantaram uma placa de metal próximo à diáfise femoral em um cachorro adulto vivo, e observaram que quando uma corrente adequada era utilizada, osso novo depositava-se no cátodo, sendo que o efeito máximo foi identificado em duas semanas. Relatam que não ocorreu osteoclase no ânodo.

A osteogênese induzida eletricamente é máxima próximo do eletrodo negativo e esse fenômeno está associado com uma tensão muito baixa de oxigênio local e alcalinidade (BRIGHTON & BRIEDENBERG, 1974).

Experimentalmente, mostrou-se que as fibras colágenas se tornam orientadas em um campo elétrico (BECKER, 1972). Isso sugere que é um prelúdio necessário à distribuição espacial para a mineralização.

Basset & Becker (1962) utilizaram a piezoeletricidade, iniciando um estudo experimental de estimulação da consolidação de fraturas ósseas, empregando eletricidade como estímulo.

Basset e col (1964) implantaram eletrodos nos orifícios laterais, provocados na região médio diafisária de fêmures de cães, aplicando correntes que variaram de 1 a 100 micro ampères durante 30 minutos,

por um período de 21 dias. Concluíram que a corrente de 10 micro ampères produzia melhores resultados para a neoformação óssea.

Os pesquisadores Friedenberg & Kohanin (1968) reproduziram o experimento de Basset e col (1964) implantando eletrodos em tíbias de coelhos adultos jovens, variando a corrente de 3 a 10 micro ampères. Detectaram necrose de tecido e um pequeno aumento de tecido conjuntivo no ânodo, cartilagem e formação óssea no cátodo.

Friedenberg & Brighton (1971) utilizaram correntes de 10 micro ampères em fraturas de fíbula de coelhos. Os eletrodos foram colocados em várias posições, em relação à fratura, e mantiveram a fíbula contralateral como controle do animal estimulado. No controle os eletrodos eram implantados porém sem utilizar o estímulo elétrico. Obtiveram uma aceleração no processo de consolidação em 18 dias de pós operatório.

Brighton (1972) estimulou eletricamente pseudoartroses hipertróficas e retardos de consolidação de fraturas, introduzindo o cátodo no foco de fratura, obtendo resultados satisfatórios.

1.2.2 - Campos Eletromagnéticos

Campos eletromagnéticos pulsáteis, acoplados indutivamente, produzem correntes elétricas pulsáteis fracas no tecido (BASSET, 1974; BASSET, 1978). Basset (1976) propôs um método não invasivo como estímulo da consolidação de fraturas em fêmures de cães, aplicando campos eletromagnéticos.

As correntes induzidas por campos eletromagnéticos não são constantes e, por isso, podem exercer através de impulsos, uma

influência seletiva sobre as espécies iônicas no ambiente celular e podem produzir efeitos de ressonância. As correntes pulsáteis induzidas modificarão o comportamento celular no osso (FITTON & BASSET, 1980; SHTEYER, 1980)

Segundo Hayne (1984), o campo eletromagnético atua diretamente sobre a permeabilidade dos vasos sanguíneos de maneira seletiva, isto é, atua somente sobre as células com função diminuída e nunca sobre células sãs ou mortas. Explica ainda que quando ocorre algum tipo de trauma ou lesão num tecido, há um desequilíbrio iônico, e na região em questão, ocorrerá uma resposta inflamatória, caracterizada também pelo aumento do fluido extra-celular e dor. O campo eletromagnético atua como meio de normalização da polaridade celular, fazendo com que gradualmente as células com atividade diminuída se restabeleçam e retornem às suas funções normais.

1.2.3 - Ultra-som

As pesquisas de aplicação com energia ultra-sônica pulsátil de baixa intensidade tiveram em nosso país e na América Latina como pioneiro o Prof. Dr. Luiz Romariz Duarte e sua equipe da Escola de Engenharia de São Carlos - USP.

O uso do ultra-som para o tratamento de fraturas e/ou pseudo-artroses tem sido investigado por vários pesquisadores (DUARTE, 1977; XAVIER & DUARTE, 1983; DYSON & PAROOKES, 1983; COLOMBO, 1992). Os estudos demonstraram evidências de que o ultra-som pode acelerar o reparo ósseo.

A aplicação de um campo acústico pode determinar a ação de um campo elétrico a nível da membrana celular, o que leva a um afastamento da condição de equilíbrio eletroquímico, com o surgimento de uma densidade de corrente iônica para o interior da célula (SILVA, 1987). O autor ressalta ser possível, através da aplicação do ultra-som na região da fratura óssea, um aumento no influxo de certos íons envolvidos com o próprio ciclo celular, podendo-se esperar uma diminuição no tempo necessário para a consolidação de uma fratura óssea, em função da maior disponibilidade intracelular de tais íons.

A colocação de cargas elétricas na superfície celular, decorrente da aplicação da energia ultra-sônica pulsada, mantém a polarização elétrica média enquanto durar o estímulo. Esta polarização faz com que os osteoblastos alterem seus potenciais de membrana permitindo um bombeamento de íons e a captação de nutrientes. As células atuam, então, como um transdutor biológico, onde o estímulo elétrico produz uma maior atividade mitótica das células, as quais se agruparão segundo polaridades compatíveis com sua natureza, isto é, os osteoblastos serão atraídos pelo pólo negativo e os osteoclastos pelo pólo positivo, promovendo, assim, o reparo ósseo segundo o processo de retroalimentação negativo (BECKER, 1972).

Duarte (1977) utilizando o ultra-som de baixa intensidade como um método não invasivo, realizou estimulações em osteotomias de fêmur, fíbulas e costela de coelhos, obtendo uma aceleração da osteogênese.

Dyson (1983) sugere que o estímulo ultra-sônico é mais eficiente quando utilizado durante os 15 primeiros dias após o trauma, isto é, durante a fase inflamatória e o começo da fase proliferativa da cicatrização.

Xavier e Duarte (1983) utilizando o método proposto por Duarte (1977) em pseudartroses e/ou retardo de consolidação óssea, obtiveram 70 % de sucesso nos casos tratados.

Reuter e col (1984) realizaram osteotomias em tíbias de coelhos. Os autores utilizaram o ultra-som com intensidade de 100 mW/cm^2 , durante dois minutos. Observaram um aumento na formação e maturação do calo ósseo com o ultra-som. A mineralização por meio do ultra-som mostrou que a sua atuação é realizada provavelmente através do efeito piezoelétrico no local onde é provocada a tensão, resultando numa quantidade de osso mineralizado em 2 semanas após a osteotomia. Esse experimento vem confirmar casos clínicos.

Riolo (1985) utilizando a estimulação ultra-sônica, variou a frequência de repetição entre 100, 500 e 1000 pulsos por segundo (pps), mantendo constantes os demais parâmetros: largura de pulso de 50 micro segundos, amplitude de 30 V e tempo de estimulação de 20 minutos diários. Obteve-se, como resultado satisfatório para melhor consolidação óssea, a frequência de 1000 pulsos por segundo.

Ortega (1986) seguindo a mesma linha de pesquisa de Riolo (1985), variou no seu experimento a largura de pulso em 50, 100 e 200 micro segundos, mantendo constantes os demais parâmetros: frequência de repetição de 500 pps, amplitude de 30 V (pico a pico) e tempo de estimulação de 20 minutos diários. Concluiu que obteve melhores resultados na reparação óssea com largura de pulso de 200 micro segundos.

Em estudo recente (COLOMBO, 1992) observou-se a eficiência do ultra-som pulsado de baixa intensidade na reparação de fraturas experimentais de tíbias de coelhos.

O efeito térmico, isto é, aumento na temperatura do meio quando este está sendo submetido à pressão acústica é de pouca importância para as aplicações com intensidades inferiores a 80 mW/cm^2 , já que as variações de temperatura nesta faixa de intensidade são da ordem de centésimos de graus Celsius (DUARTE, 1977).

1.3 - Hidroxiapatita

A composição química e estrutural da hidroxiapatita (HA) é marcadamente similar ao osso humano. O uso da HA como condutor do crescimento ósseo e, portanto, como substituto ósseo tem sido largamente difundido na prática clínica, após inúmeros trabalhos experimentais (COLLARES, 1994).

Os implantes aloplásticos apresentam nos dias atuais uma importante conquista na reabilitação humana, e entre estes materiais, a HA está sendo amplamente difundida nas áreas médica e odontológica (CARVALHO, 1994).

A hidroxiapatita é um fosfato de cálcio $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$, onde cada molécula contém 10 cátions cálcio, 6 anions fosfato e 2 anions hidroxila, dispostos espacialmente formando cristais biocompatíveis com a estrutura óssea humana.

O tamanho dos poros influi na eficácia da condução do crescimento tecidual para o seu interior (melhor entre 40 e 400 micro metros). A HA mais usada internacionalmente é comercializada com poros de 200 micrometros e está sendo utilizada na prática médica a mais de 18 anos. No Brasil, desde 1989, podemos encontrar uma HA de produção nacional com uma mudança em sua estrutura química (um dos radicais é

fluorado) e com poros de 40 micrometros. As vantagens em termos de custo é marcante em favor do produto nacional, numa proporção de 10 para 1 (COLLARES, 1974).

O peso do osso é composto de 65 a 70% de minerais inorgânicos, 95% dos quais representam o cálcio e o fosfato de sódio. Um fosfato de cálcio amorfo está presente em quantidades maiores no tecido jovem, recém-formado (40 a 50%) do que no osso mais antigo, mais maduro (25 a 30%). A composição química e a estrutura dessa fase fisicamente amorfa ainda não foi esclarecida mas os estudos sugerem que a substância amorfa seja $\text{Ca-HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ou $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$.

O principal fosfato de cálcio, sólido, é a hidroxiapatita precariamente cristalina com a fórmula celular unitária de $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. De acordo com alguns pesquisadores, ela pode ser o fosfato de octacálcio com a fórmula $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. A proporção molecular teórica de Ca:P é 1,67 mas raramente iguala esse valor no osso.

Os padrões de difração de Roentgen da hidroxiapatita sintética e dos cristais ósseos são semelhantes. O tamanho dos cristais de hidroxiapatita e ósseos são similares, variando nas dimensões aproximadas de 25 a 50 Å X 400 Å X 200 a 350 Å.

A direção do eixo longitudinal γ (eixo C) do cristal é paralela ao do fibra de colágeno. Somente cerca de 0,65 do cálcio ósseo humano é parte de um reservatório facilmente cambiável. Pode-se identificar os locais onde se realiza o intercambio rápido por meio de radionuclídeos e eles parecem ser o revestimento dos canais haversianos e cavidades de reabsorção. Os locais de deposição óssea não parecem participar dessas reações de intercambio. Todos os

cristais em um líquido são circundados por uma camada de água, uma capa de hidratação.

Teoricamente, os íons podem entrar e sair com facilidade de uma fase aquosa e fazer a troca com rapidez. Na superfície do cristal, os íons são mantidos pelas cargas eletrostáticas. Apenas os íons com propriedades químicas semelhantes às do elemento que compõe o cristal podem realmente penetrar e tornar-se parte do cristal. Assim, o estrôncio e o chumbo podem repor e substituir as posições do cálcio da apatita; o fluoreto ou cloreto podem substituir o íon hidroxila. Essa substituição ocorre em um ritmo lento quando comparado com a rapidez do intercambio na camada aquosa.

UCHIDA e col (1990) utilizaram a cerâmica de hidroxiapatita de cálcio para enxerto de falha óssea, após a ressecção e curetagem de tumores ósseos benignos. No acompanhamento, por um período de 6 a 60 meses, os pacientes não apresentavam nenhuma recorrência local do tumor ou efeitos adversos ao implante. Quase todos os casos radiografados mostraram que a hidroxiapatita estava bem incorporada ao osso hospedeiro, com neoformação óssea ao redor e entre os cristais de hidroxiapatita. A histologia das biópsias mostraram crescimento ósseo entre os cristais da estrutura de hidroxiapatita na zona central.

COLLARES e col (1994) visando comparar a eficácia de dois materiais cerâmicos, um importado (HA-200) e outro nacional (HA-40), quanto as suas propriedades de osteocondução em cranioplastias de ratos, observaram que os dois materiais apresentam capacidade de condução do crescimento ósseo, porém ressaltam que a integração tecidual da HA-200 foi significativamente mais satisfatória.

Em estudo comparativo entre as hidroxiapatitas, Osteosynt (ENCO Ltda) e HA-40 (Houmus - Ind. Com. Ltda), em estudo histomorfológico em ratos, Carvalho e col (1994) observaram que no pós-operatório de 30 e 60 dias, não havia ocorrido a absorção dos materiais implantados e que o tecido ósseo neoformado no grupo do Osteosynt era de qualidade superior ao da HA-40.

Trabalhos recentes (DUCHEYNE, 1980; DONISHI, 1989) indicam que a HA aderida à superfície metálica de uma prótese, pelo processo de plasma spray, pode oferecer precoce e resistente fixação do implante ao osso.

Donishi e col (1989), testaram implantes porosos $[Ti_4Al_4V]$ com ou sem revestimento de HA. A força de aderência ao osso das amostras com HA era quatro vezes maior do que as outras, após duas semanas, e duas vezes mais resistente após seis semanas. Doze semanas após a implantação, esse índices eram similares. Os autores concluíram que a superfície porosa com hidroxiapatita oferece maior fixação, além de ser precoce. Os resultados também revelaram que a invasão óssea no implante com HA de sete dias de evolução se equipara à invasão óssea de 21 dias sem implantes sem HA.

2.0 - A CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA

A época atual, se caracteriza pelo aumento da participação individual em tráfego de alta velocidade, indústria complexa, esportes competitivos e recreativos, bem poderia ser chamada a era da lesão ou a era do trauma. A incidência atual das lesões é perturbadoramente alta e continua a aumentar. De todas as lesões que acometem o homem, pelo menos dois terços envolvem o sistema músculo-esquelético: fraturas, luxações e lesões associadas dos tecidos moles.

Embora lesões músculo-esqueléticas isoladas em indivíduos sadios raramente sejam fatais, elas são importantes porque causam grande sofrimento físico, angústia mental e perda de tempo para a vítima; isto significa dizer que elas têm mortalidade baixa, mas morbidade alta.

Nas últimas décadas, pesquisadores têm procurado desenvolver equipamentos e também metodologia que auxiliem processos naturais existentes no corpo humano, de forma a obter um melhor e mais eficaz resultado no tratamento de sistemas biológicos, bem como o encurtamento no tempo de reparo. A necessidade de se abreviar o tempo de consolidação das fraturas ósseas é evidente quando se observa ser a fratura óssea um fator incapacitante, de alta morbidade, que acarreta ao ser humano não só problemas relativos à saúde, como também problemas de caráter sócio-econômico. Esta necessidade levou vários pesquisadores a estudarem o osso nos mais diversos aspectos. As propriedades biofísico-químicas, a interação osso-implante além, dos agentes físicos que viessem a estimular a osteogênese.

A evolução que a cirurgia ortopédica apresentou nos últimos decênios e as múltiplas variedades de técnicas postas ao seu serviço, levaram os profissionais a recorrerem com freqüência cada vez maior a métodos que provoquem ou estimulem a osteogênese, uma vez que são muito freqüentes as situações clínicas em que o processo natural de reparação óssea está perturbado. Tais são os casos de pseudartroses, retardo de consolidação de fraturas, má-formações congênitas ou doenças osteometabólicas. Porém há situações particularmente difíceis em que há impossibilidade de contacto entre as extremidades viáveis do osso, como nas fraturas com perdas ou necrose de fragmentos, certos tipos de osteomielites em que predomina a osteólise, ressecções tumorais extensas, ou ainda nos alongamentos ósseos. Resulta, então, uma falha ou defeito devido à perda de grandes quantidades de substância óssea. Estes defeitos, se não tratados, são extremamente incapacitantes, freqüentemente evoluem para deformidades, encurtamentos, pseudartroses, resultando um estado em que, tanto a função quanto a estética, são muito prejudicadas. Surge a necessidade, portanto, de restabelecer a continuidade entre os fragmentos.

O estímulo à osteogênese reparadora pode ser conseguido através do emprego de enxerto ósseo, associado ou não a um sistema de fixação ou estimulação.

Praticamente todas as formas de enxertos já foram utilizadas, com resultados variáveis, pois, associados às vantagens, há também limitações.

Levando-se em conta a incorporação, o melhor tipo de enxerto é o autólogo (CARNESALE & SPANKUS, 1959; PARRISH, 1966; OLIVEIRA, 1967), em que o próprio indivíduo é o doador. São usados ossos corticais ou

esponjosos, como pequenos fragmentos (COLEMAN e col, 1946), ou ainda, na forma de grandes blocos, principalmente para corrigir falhas ósseas provenientes de ressecções tumorais (PALMER, 1952; TULI, 1972). O enxerto autólogo pode ainda ser utilizado imediatamente após a remoção, ou deixado no leito doador por 2 a 3 semanas, até o implante definitivo no sítio receptor, constituindo esta técnica de retardo uma maneira de favorecer a incorporação (BARBIERI, 1977). Porém, mesmo com todas essas variações, os enxertos autólogos podem ser insuficientes quanto à dimensão e quantidade, conforme o tamanho e localização do defeito, ou ainda a idade do paciente. Nestes casos recorre-se ao uso de osso de fonte estranha ao próprio indivíduo, constituindo-se os enxertos homólogos e heterólogos. Atualmente estes enxertos estão praticamente abandonados, pois devido à lentidão de incorporação, à presença de reações imunológicas, à extrusão e outras complicações, mostraram-se inferiores quando comparados com outros tipos de enxerto (KINGMA & HAMPE, 1964).

O enxerto homólogo é mais bem tolerado que o heterólogo, porém é inferior ao autólogo em termos de incorporação (MAATZ e col, 1954), tendo a vantagem de ser disponível em maior quantidade e poder ser conservado e armazenado.

Pelo exposto, pode ser visto que o problema não só da correção de falhas ósseas bem como na obtenção de reparo das fraturas no mais curto espaço de tempo é atual, e ainda demanda estudos e soluções justificando-se plenamente investigações neste campo.

3.0 - OBJETIVO

Motivados pelos trabalhos experimentais e clínicos que demonstraram a eficiência da energia ultra-sônica pulsada de baixa intensidade no processo de ossificação, propusemo-nos a elaborar e executar um modelo experimental, cujo objetivo principal é verificar se a hidroxiapatita de fabricação nacional, quando estimulada pelo ultra-som pulsado de baixa intensidade, favorece a osteogênese, em falhas ósseas de rádio de coelhos, executadas experimentalmente.

4.0 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Material

4.1.1 - Animal de Experimentação

No presente experimento foram utilizados doze coelhos albinos da linhagem Nova Zelândia, com peso médio de cerca de dois quilogramas, provenientes do biotério do Laboratório de Anatomia da Universidade Federal de São Carlos.

A vantagem de se utilizar o coelho neste experimento provém de que os ossos do antebraço apresentam uma disposição particular. O rádio ocupa uma posição anterior e está firmemente unido à ulna em toda a extensão de sua diafise por uma forte membrana interóssea. Nas extremidades proximal e distal, articulam-se mediante sinartroses as quais, permitem somente pequenos deslizamentos. Além disso, um forte aparelho ligamentar une os dois ossos nas extremidades, portanto, o rádio pode ser considerado como um osso imóvel.

4.1.2 - Hidroxiapatita

A hidroxiapatita utilizada para o preenchimento da falha óssea foi a HA-40, fabricada pela BAUMER Ortopedia.

A HA-40 é um hidroxiapatita policristalina onde cada molécula contém 10 cátions cálcio, 6 ânions fosfato e 2 ânions hidroxilas, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ dispostos espacialmente formando cristais biocompatíveis com a estrutura óssea.

4.1.3 – Equipamento Gerador de Ultra-som

O equipamento utilizado no presente experimento foi projetado e montado no Laboratório de Bioengenharia da Escola de Engenharia de São Carlos – USP. Os parâmetros físicos encontram-se no quadro 1.

Quadro 1: Parâmetros físicos do ultra-som

Forma de Onda	pulsada
Largura do Pulso	200 μ s
Frequência do PZT-4	1,5 MHz
Frequência de Repetição	1,0 KHz
Intensidade Acústica (SATA)	16 mW/cm ²

Como parte da metodologia o equipamento de ultra-som foi calibrado em uma balança de pressão acústica (modelo UPM-DT 10), alocada no Laboratório de Biengenharia, antes do início de cada grupo.

4.2 – Método

4.2.1 – Anestesia e Procedimento Cirúrgico para a Confecção da Falha Ossea

A indução anestésica foi realizada mediante injeção intramuscular de uma mistura de Ketalar* e Rompum** nas doses de 0,5 e 0,7 ml,

* R – Ketalar (cloridrato de cetamina) Parke Davis

** R – Rompum (cloridrato de xilidino-dihidro-tiazina) Parke Davis

respectivamente. Com a perda da consciência fez-se a tricotomia dos membros anteriores com posterior lavagem com solução anti-séptica. Em seguida o animal foi posicionado em decúbito lateral para o ato cirúrgico. A cirurgia foi realizada sob condições assépticas. Não houve a necessidade de se promover o garroteamento do membro, uma vez que os vasos de grande calibre eram cuidadosamente afastados. A incisão foi retilínea, na face medial do antebraço, sobre o rádio, de mais ou menos 3 cm de extensão incluindo pele e aponeurose, procurando-se evitar os vasos mais calibrosos. O perióstio foi incisado longitudinalmente e descolado para evitar lesões no mesmo. O perióstio foi mantido aderente à musculatura adjacente, sendo afastado em bloco juntamente com ela, deixando a diáfise do rádio totalmente exposta. Duas pequenas lâminas metálicas foram interpostas entre o rádio e o perióstio, no momento da osteotomia, com o intuito de proteger a ulna e os tecidos moles adjacentes. A osteotomia foi realizada perpendicularmente ao eixo longitudinal da diáfise do rádio, com o emprego de uma serra circular, acoplada a um motor de baixa rotação. A osteotomia foi de 8 milímetros de extensão, no terço distal. Tanto o rádio direito quanto o esquerdo foram submetidos aos mesmos procedimentos para a confecção das osteotomias.

A falha óssea foi inspecionada e lavada com soro fisiológico. Em um grupo de animais o espaço promovido pela osteotomia permaneceu vazio e no outro, foi preenchido com hidroxiapatita, sob a forma grânulos.

O perióstio foi recolocado sobre a falha óssea, preenchida ou não com hidroxiapatita, a musculatura reposicionada e a aponeurose e a pele foram suturadas com fios de mononylon nº 4 por pontos separados.

Após o ato cirúrgico os animais foram mantidos em gaiolas coletivas com 2 animais cada uma, e conservados nas melhores condições de higiene possíveis. Antes da cirurgia os animais guardaram jejum de 12 horas e após a cirurgia até o sacrifício receberam ração balanceada e água à vontade.

4.2.2 - Organização dos Grupos Experimentais

Os animais foram divididos em dois grupos iguais (seis animais por grupo), sendo que na composição dos grupos os animais foram distribuídos aleatoriamente por sorteio, conforme quadro 2.

4.2.2.1 - Grupo I-V (Osteotomia Vazia)

Os animais deste grupo permaneceram com a osteotomia vazia. Em todos os animais a osteotomia direita recebeu estímulo ultra-sônico com intensidade de 18 mW/cm^2 , por um período de 15 dias consecutivos durante 20 minutos, com um intervalo médio de 24 horas entre as estimulações. As estimulações tiveram início 24 horas após o processo cirúrgico. A osteotomia esquerda servia de controle.

4.2.2.2 - Grupo II-HA (Osteotomia preenchida com Hidroxiapatita)

Os animais deste grupo tiveram as osteotomias direita e esquerda preenchidas por hidroxiapatita. Em todos os animais a osteotomia direita recebeu estímulo ultra-sônico com intensidade de 18 mW/cm^2 , por um período de 15 dias consecutivos durante 20 minutos, com um

intervalo médio de 24 horas entre as estimulações. As estimulações tiveram início 24 horas após o processo cirúrgico. A osteotomia esquerda servia como controle.

Quadro 2 - Distribuição dos animais nos grupos, com os respectivos períodos de seguimento.

GRUPOS	OSTEOTOMIA		TEMPO DE SEGUIMENTO*	NUMERO DO ANIMAL
	DIREITA	ESQUERDA		
I-V	S	C	21	01
	S	C	21	02
	S	C	42	03
	S	C	42	04
	S	C	63	05
	S	C	63	06
II-HA	S	C	21	07
	S	C	21	08
	S	C	42	09
	S	C	42	10
	S	C	63	11
	S	C	63	12

S - ESTIMULADO C - CONTROLE * - DIAS

As osteotomias esquerda, de ambos os grupos, foram submetidas a técnica "Mock-insonation" internacionalmente utilizada no estudo da energia ultra-sônica em tecidos biológicos. Esta técnica propõe simular a irradiação do ultra-som no segmento controle, isto é, utilizar o mesmo equipamento e procedimento adotado para os animais tratados, mas sem emissão do ultra-som. Esta técnica garante que os

segmentos tratados e controles sejam rigorosamente submetidos às mesmas condições experimentais, e de manipulação, com exceção do estímulo ultra-sônico.

4.2.3 – Métodos de Avaliação

4.2.3.1 – Exame Radiológico

Todos os antebraços osteotomizados foram radiografados em perfil após 24 horas do procedimento cirúrgico. A cada período de 3 semanas, dois animais eram novamente radiografados e em seguida sacrificados para colheita do material destinado à análise macroscópica e histopatológica até completar-se 9 semanas, convencionadas por nós como tempo máximo de observação.

O lado direito e esquerdo do filme corresponde aos membros direito e esquerdo, respectivamente.

As radiografias foram obtidas mediante o emprego de um equipamento da General Eletric, utilizando sempre os seguintes parâmetros: o tubo posicionado a uma distância de 20 centímetros do segmento, regulado para 45 KVp, 15 mA e exposição de 0.1 segundo. O filme utilizado foi o oclusal EKTASPEED EO-41 Kodak.

A revelação foi realizada em processadora automática.

4.2.3.2 – Exame Macroscópico e Histopatológico

Após cada período de 3 semanas, a contar da data da cirurgia, dois animais eram sacrificados (mediante inalação excessiva de éter)

tendo os antebraços desarticulados no cotovelo e punho. As partes moles foram rapidamente removidas e a peça óssea colocada em solução de Bouin por um período de 72 horas. Após a fixação inicial, o osso rádio foi cuidadosamente inspecionado quanto à forma, tamanho, cor e consistência. A região da falha óssea foi fotografada para acompanhamento macroscópico.

O fragmento ósseo contendo a área da falha óssea preenchida ou não preenchida com HA, após completado o período de fixação, foi submetido a descalcificação em solução de EDTA e corrente elétrica de 500 mA (miliampéres). Após a descalcificação as peças foram processadas obedecendo à rotina habitual, para inclusão em parafina. Fizeram-se cortes de 10 micrômetros de espessura os quais foram corados pelo hemalumen e eosina e tricrômico de Masson, para análise microscópica.

Os cortes histológicos foram examinados e fotografados em fotomicroscópio Zeiss

5.0 - RESULTADOS

Os animais toleraram bem a anestesia e o ato cirúrgico. Houve um discreto edema sobre a região operada, regredindo espontaneamente a partir do terceiro dia. A partir do segundo dia pós operatório os animais já se movimentavam normalmente pela gaiola.

Todos os animais submetidos a osteotomia foram analisados. Nenhum dos animais apresentou sinais de infecção ou fratura da ulna no decorrer dos experimentos.

5.1 - Avaliação Radiológica

Decorridas 24 horas do procedimento cirúrgico foi realizada uma radiografia, em perfil do antebraço, para avaliar o estado da osteotomia. As imagens mostraram que as osteotomias estavam na localização desejada e apresentavam as dimensões previstas. Não ocorreram fraturas consequentes do ato cirúrgico.

Quando a falha óssea foi deixada vazia o aspecto radiológico imediato foi a transparência total ao Rx. Já nos casos onde foi utilizada a hidroxiapatita, esta aparecia nas radiografias como uma imagem radiodensa granulosa.

Após períodos de 3 semanas, a contar da data da cirurgia, dois animais de cada grupo eram radiografados para se determinar radiologicamente o grau de ossificação nos diferentes grupos experimentais. O período de intervalo foi convencionado previamente, bem como o período final de 9 semanas.

A avaliação foi realizada levando-se em conta a espessura do osso cortical, a granulação da hidroxiapatita e a dimensão do calo ósseo periosteal. Os resultados sempre foram considerados mediante comparação entre as osteotomias do rádio direito e do rádio esquerdo do mesmo animal. Nos filmes radiográficos apresentados a seguir, o membro esquerdo (controle) corresponde a imagem esquerda, assim como o membro direito (estimulado), corresponde a imagem direita.

5.1.1 - Osteotomia Vazia (Grupo I-V)

Do ponto de vista radiográfico, todas as osteotomias mostraram-se bem definidas e com uma boa padronização. Nenhum caso evoluiu, ao estudo radiológico, com fratura de ulna ou reabsorção óssea. À medida que o tempo evoluía, a radiopacidade aumentava na região da falha óssea.

A figura 1 mostra as imagens radiográficas dos ossos do antebraço em perfil, dos animais cuja falha óssea permaneceu vazia. O segmento direito recebeu estímulo ultra-sônico pulsado por um período de 20 minutos e por 15 dias consecutivos. O segmento esquerdo corresponde ao segmento controle dos animais deste grupo.

Quando as falhas ósseas foram deixadas vazias o aspecto radiológico imediato, 24 horas após o ato cirúrgico (imagens O-E e O-D), foi a transparência total. Nota-se que as osteotomias estão bem delimitadas, apresentando a falha completamente vazia e não há sinais de lesão da ulna.

Nas imagens 3-C e 3-S do Grupo I-V, 3 semanas após o ato cirúrgico, observa-se um calo ósseo bastante exuberante nos dois

segmentos, com sinais de formação de osso cortical no lado estimulado. Comparando-se o tamanho dos calos ósseos pode-se admitir como tendo aproximadamente o mesmo tamanho dos calos ósseos das imagens 6-C e 6-S do Grupo II-HA, com 6 semanas de evolução. Nota-se que na osteotomia estimulada não é possível mais distinguir os seus limites, podendo-se considerar a osteotomia como radiologicamente consolidada (não apresenta mais a "linha de fratura").

Nas imagens 6-C e 6-S do Grupo I-V, 6 semanas após o ato cirúrgico, nota-se que o canal medular já está formado do lado estimulado, enquanto que no lado controle ainda não é possível distingui-lo.

Nas imagens 9-C e 9-S do Grupo I-V, 9 semanas após o ato cirúrgico, observa-se que o osso já se encontra totalmente remodelado, com o canal medular bastante definido. Nesta fase os parâmetros já se encontram próximos da normalidade. As diferenças entre a falha estimulada e a falha controle são quase imperceptíveis.

5.1.2 - Osteotomia Preenchida com Hidroxiapatita (Grupo II-HA)

Do ponto de vista radiográfico, todos os casos mostraram boa aceitação do implante. Nenhum caso evoluiu, ao estudo radiológico, com o aparecimento de imagens lacunares ou reabsorção óssea. A medida que o tempo evoluía, a radiopacidade aumentava no local do enxerto de hidroxiapatita.

A figura 2 reúne as imagens radiográficas dos ossos do antebraço, em perfil, dos animais cuja falha óssea foi preenchida com

hidroxiapatita. O segmento direito recebeu estímulo ultra-sônico, enquanto que segmento esquerdo corresponde ao controle.

As imagens radiográficas O-E e O-D do Grupo II-HA, foram colhidas 24 horas após o ato cirúrgico. Nota-se que as osteotomias estão bem delimitadas, apresentando a falha completamente preenchida e não há sinais de lesão da ulna. A hidroxiapatita apresenta um aspecto granuloso e se encontra restrita ao espaço da falha.

Nas imagens 3-C e 3-S do Grupo II-HA, 3 semanas após o ato cirúrgico, nota-se a formação de um calo ósseo periostal, mais proeminente no segmento estimulado (S), quando comparado ao seu controle (C). A aparência "granulosa" da hidroxiapatita é modificada apresentando-se uma imagem mais compacta, parecendo ser mais homogênea no lado estimulado.

O calo ósseo periostal se mostra bastante exuberante após 6 semanas do ato cirúrgico, imagens 6-C e 6-S do Grupo II-HA, possibilitando um aumento de aproximadamente duas vezes o diâmetro inicial do rádio. Na osteotomia estimulada já se observa a formação do osso cortical, dando segmento à diáfise do rádio.

Ao final de 9 semanas pode-se observar nas imagens 9-C e 9-S do Grupo II-HA, que tanto na osteotomia estimulada quanto na controle havia formação de osso cortical. O enxerto de HA já se apresentava bastante homogêneo, com a sua radiopacidade diminuída, abrangendo uma maior área. Os limites da osteotomia contendo a hidroxiapatita não se apresentam mais como bem definidos.

Um ponto que deve ser destacado é que em todos os períodos de tempo observados, a hidroxiapatita esteve confinada exclusivamente à falha óssea, não sendo observada entre os tecidos moles adjacentes.

Isto mostra a boa retenção da hidroxiapatita por parte do periosteio que a envolve.

Figura 1: Acompanhamento radiológico das falhas ósseas que permaneceram vazias. A imagem direita corresponde ao segmento estimulado e a esquerda ao controle. Grupo I-V.
Imagens 0-E e 0-D: Falha óssea após 24 horas
Imagens 3-C e 3-S: Falha óssea após 3 semanas
Imagens 6-C e 6-S: Falha óssea após 6 semanas
Imagens 9-C e 9-S: Falha óssea após 9 semanas

Figura 2: Acompanhamento radiológico das falhas ósseas que foram preenchidas com hidroxiapatita. A imagem direita corresponde ao segmento estimulado e a esquerda ao controle. Grupo II-HA.
Imagens 0-E e 0-D: Falha óssea após 24 horas
Imagens 3-C e 3-S: Falha óssea após 3 semanas
Imagens 6-C e 6-S: Falha óssea após 6 semanas
Imagens 9-C e 9-S: Falha óssea após 9 semanas

5.2 - Avaliação Macroscópica

A avaliação macroscópica foi realizada mediante a observação da área osteotomizada, após 72 horas de fixação em solução de Bouin, comparando-se sempre as osteotomias direita e esquerda do mesmo animal. A neoformação tecidual da osteotomia direita (estimulada) foi sempre superior à esquerda (controle), independente do período de observação.

5.2.1 - Osteotomia Vazia (Grupo I-V)

A figura 3 reúne as imagens fotográficas, em vista anterior, dos ossos rádio (direito e esquerdo) dos animais cuja falha óssea permaneceu vazia. O segmento direito recebeu estímulo ultra-sônico, enquanto que segmento esquerdo corresponde ao controle.

Nas amostras colhidas 3 semanas após o ato cirúrgico pode-se notar que ambas as osteotomias já se encontravam completamente envolvidas pelo calo periostal. Não sendo possível nenhuma visualização da porção interna do osso. O ponto de destaque se refere ao tamanho do calo periostal o qual é de menor tamanho na osteotomia estimulada pelo ultra-som. Notar que o sulco deixado por um tendão muscular no calo ósseo do segmento esquerdo (controle) é de maior profundidade que o do segmento direito (estimulado), imagem "A" do Grupo I-V, Figura 3.

O calo periostal já se encontra em menores proporções após 6 semanas de acompanhamento, evidenciando a remodelação óssea. Observar

que a falha óssea estimulada encontra-se em nível de reparação mais avançada que a controle.

Ao final das 9 semanas não é possível observar a área da falha óssea, o calo periosteal já foi totalmente remodelado. A diáfise está totalmente reparada.

Figura 3: Fotografias das falhas ósseas que permaneceram vazias após o ato cirúrgico. Grupo I-V. A imagem direita corresponde ao segmento estimulado e a esquerda ao segmento controle. Observar a figura [a) V-3] onde a seta indica o sulco ósseo de maior profundidade deixado por um tendão.
 Imagem V-3: 3 semanas de acompanhamento
 Imagem V-6: 6 semanas de acompanhamento
 Imagem V-9: 9 semanas de acompanhamento

5.2.2 - Osteotomia Preenchida com Hidroxiapatita (Grupo II-HA)

A figura 4 reúne as imagens fotográficas, em vista anterior, dos ossos rádio (direito e esquerdo) dos animais cuja falha óssea foi preenchida com hidroxiapatita. O segmento direito recebeu estímulo ultra-sônico, enquanto que segmento esquerdo corresponde ao controle.

Nas amostras analisadas 3 semanas após o ato cirúrgico pode-se observar uma área extensa não preenchida pelo calo periostal tanto na falha estimulada quanto na controle. Cabe ressaltar que em todas as amostras estimuladas a formação óssea foi maior quando comparada com a controle. O não fechamento de toda a falha óssea pelo calo periostal nos permite visualizar a hidroxiapatita no interior da osteotomia.

As amostras analisadas 6 semanas após o ato cirúrgico demonstram que o calo periostal é mais extenso e preenche quase toda a osteotomia. Uma pequena área, de ausência de calo periostal, ainda pode ser notada. Em todos os casos a osteotomia estimulada apresentou-se em fase mais adiantada de reparação.

No que se refere a análise das osteotomias retiradas 9 semanas após o ato cirúrgico notou-se que as estimuladas estavam completamente envoltas pelo calo periostal, não sendo possível a visualização da hidroxiapatita utilizada para o preenchimento da mesma. Já nas osteotomias não estimuladas pode-se notar uma pequena área não revestida pelo calo periostal, semelhante a amostra de 6 semanas estimulada.

Figura 4: Fotografias das falhas ósseas que foram preenchidas com hidroxiapatita após o ato cirúrgico. Grupo II-HA. A imagem direita corresponde ao segmento estimulado e a esquerda ao segmento controle.

Imagem HP-3: 3 semanas de acompanhamento

Imagem HP-6: 6 semanas de acompanhamento

Imagem HP-9: 9 semanas de acompanhamento

5.3 - Avaliação Histopatológica

A microscopia óptica ratificou os resultados obtidos tanto na análise radiográfica quanto na macroscópica. Em linhas gerais as falhas ósseas não preenchidas (vazias) apresentaram tecido neoformado em melhores condições que as falhas preenchidas com hidroxiapatita, independentes do estímulo ultra-sônico. Cabe ressaltar que nas osteotomias vazias, sem estímulo, a reparação foi sempre superior as osteotomias preenchidas com hidroxiapatita estimuladas.

5.3.1 - Osteotomia Vazia (Grupo I-V)

Após três semanas de acompanhamento, o tecido conjuntivo neoformado não apresenta diferenças significativas entre os segmentos controle e estimulado no que se refere a sua organização.

Não constou em material e métodos, que o estudo microscópio (histopatológico) incluiu o exame dos cortes à luz polarizada e prisma de quartzo. O prisma serve para repartir a vibração da luz em dois planos à 45° cuja refringência aparece em cores diferentes, permitindo a observação da organização espacial do tecido conjuntivo contido nos cortes

Nos dois grupos o tecido neoformado está disposto com certa uniformidade, porém com pouca organização. Pode ser observado a presença de tecido cartilaginoso em maturação e osso recém-formado, Figura 5. Este por sua vez apresentava-se em traves dispostas aparentemente ao acaso, com características de osso esponjoso. Entre elas encontrava-se tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e tecido hemopoético.

Na área do periósteeo a celularidade parece ser maior nas osteotomias estimuladas, o que confirma a maior exuberância do calo ósseo analisada pelas imagens radiográficas, Figura 6a e 6b.

Com o decorrer do período de observação, 6 semanas, pode-se notar grande quantidade de osso neoformado que praticamente preenche todo o espaço da falha óssea. Nesta fase não era mais possível observar áreas cartilaginosas. As amostras já apresentam diferenças marcantes quanto a organização do tecido neoformado quando comparadas com as amostras de 3 semanas, estimuladas ou não. Pode ser observado a orientação das fibras para a formação dos Sistemas de Harvers, Figura 7. Cabe destacar ainda que os segmentos estimulados apresentaram uma organização maior que os controles. Os osteoblastos eram mais numerosos e dispunham-se em fileiras margeando as trabéculas ósseas.

No último grupo de animais, sacrificados após 9 semanas de acompanhamento, todos apresentavam a falha óssea preenchida com osso maduro. Não foi possível observar áreas de tecido cartilaginoso ou conjuntivo. O canal medular já estava formado.

Figura 5: Fotomicrografias da falha óssea vazia (Grupo I-V) de animal sacrificado após 3 semanas de acompanhamento. Imagem superior: falha óssea controle - observar tecido cartilaginoso e imagem inferior: falha óssea estimulada - observar as traves ósseas e a pouca organização do tecido neoformado.

Figura 6: Fotomicrografias da falha óssea vazia (Grupo I-V), de animal sacrificado após 6 semanas de acompanhamento. Imagem superior - falha óssea controle e imagem inferior - falha óssea estimulada. Observar as diferenças entre a celularidade e a espessura do periósteo

Figura 7: Fotomicrografia da falha óssea vazia (Grupo I-V) estimulada, de animal sacrificado após 6 semanas de acompanhamento. Observar a orientação do tecido neoformado.

5.3.2 - Osteotomia Preenchida com Hidroxiapatita (Grupo II-HA)

As falhas ósseas preenchidas com hidroxiapatita, em todos os períodos observados, apresentaram um processo de reparação óssea, inferior aquele observado nas osteotomias vazias.

Nas amostras colhidas após 3 semanas pode ser observado a presença de grandes vacúolos após a descalcificação das mesmas, caracterizando possivelmente a remoção dos cristais de hidroxiapatita neste período. O tecido neoformado se apresenta em completa desorganização tanto nos segmentos estimulados quanto nos controles, Figura 8.

A presença dos vacúolos pode ser destacada mesmo após ter-se transcorrido 6 semanas do ato cirúrgico, Figura 9. O tecido neoformado

apresenta-se em maior quantidade quando comparado com as amostras de 3 semanas, porém ainda com uma organização deficiente. Nos segmentos estimulados há uma tendência à organização maior que nos segmentos controles.

Os segmentos que foram acompanhados por 9 semanas apresentam grande variação entre as amostras estimulada e controle. As amostras do grupo estimulado apresenta osteoclastos em maior número que as controle, Figura 10a e 10b. Nas amostras do grupo controle não houve o completo preenchimento por osso neoformado, destacando que a sua orientação é precária. Já nos segmentos estimulados o preenchimento é mais uniforme, e a celularidade também é maior. O tecido neoformado neste caso apresenta-se com orientação mais satisfatória.

Figura 8: Fotomicrografia da falha óssea preenchida com hidróxiapatita (Grupo II-HA) controle, de animal sacrificado após 3 semanas de acompanhamento. Observar a desorganização do tecido neoformado e a presença de grandes vacúolos.

Figura 9: Fotomicrografia da falha óssea preenchida com hidroxiapatita (Grupo II-HA) estimulada, de animal sacrificado após 6 semanas de acompanhamento. Observar a desorganização do tecido neoformado e a presença de grandes vacúolos.

Figura 10: Fotomicrografia da falha óssea preenchida com hidroxapatita (Grupo II-HA) de animal sacrificado após 9 semanas de acompanhamento. Imagem superior - falha óssea controle e imagem inferior - falha óssea estimulada. Observar a presença de vacúolos na amostra controle e a desorganização do tecido neoformado.

Quadro 3: Compilação da metodologia utilizada e dos resultados obtidos

ANIMAL Nº	FALHA ÓSSEA (D e E) enxerto	ESTÍMULO ULTRA-SÔNICO					TEMPO SEGUIMENTO (dias)	RESULTADOS - AVALIAÇÃO					
		intensidade (mW/cm²)	tempo (min)	estímulo (dias)	falha óssea E D			RADIOLOGICA E D		MACROSCOPICA E D		HISTOPATOLOGICA E D	
01	vazio	16	20	15		X	21	+++	+++	+++	+++	++	+++
02	vazio	16	20	15		X	21	+++	+++	+++	+++	++	+++
03	vazio	16	20	15		X	42	++++	++++	++++	++++	+++	++++
04	vazio	16	20	15		X	42	++++	++++	++++	++++	+++	++++
05	vazio	16	20	15		X	63	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
06	vazio	16	20	15		X	63	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
07	HA	16	20	15		X	21	+	+	+	+	+	+
08	HA	16	20	15		X	21	+	+	+	+	+	+
09	HA	16	20	15		X	42	++	++	+	+	++	++
10	HA	16	20	15		X	42	++	++	+	+	++	++
11	HA	16	20	15		X	63	+++	+++	++	+++	++	+++
12	HA	16	20	15		X	63	+++	+++	++	+++	++	+++

6.0 — DISCUSSÃO

A opção pela osteotomia ao invés da fratura, no procedimento cirúrgico, decorre do fato de que a padronização é mais facilmente obtida e é possível se analisar melhor as diversas etapas que antecedem a formação do tecido ósseo. A osteotomia foi realizada no terço distal da diáfise do rádio de coelhos, visto que este osso é imóvel e sua diáfise apresenta a forma cilíndrica. O acesso é facilitado uma vez que a face medial do antebraço é desprovida de estruturas vasculares e nervosas importantes, bem como de tecido muscular. Estes parâmetros permitiram um acesso fácil e pouco traumático ao osso, bem como um campo cirúrgico que permitiu um bom afastamento do perióstio, passo importante na técnica proposta. As funções principais tanto do perióstio quanto de endóstio são nutrir o tecido ósseo, pois dos seus vasos partem ramos que penetram nos ossos pelos canais de Volkmann, bem como servir de fonte de osteoblastos para a osteogênese. Por estas razões, nas cirurgias dá-se uma grande atenção tanto ao perióstio como ao endóstio.

A presença de uma forte membrana interóssea e a união do rádio à ulna nas extremidades, impedindo os movimentos de prono-supinação, serviram para evitar os desvios dos fragmentos após a osteotomia. Esse fato também contribuiu para que os grânulos de hidroxiapatita permanecessem dentro da falha. A rápida recuperação funcional observada nos membros demonstraram que a ulna intacta serviu como suporte adequado ao apoio dos membros anteriores e para a movimentação, dispensando assim qualquer dispositivo acessório de fixação ou imobilização.

Optou-se pela realização da osteotomia bilateral uma vez que cada animal é o seu próprio controle. Com isso os resultados puderam ser analisados comparativamente entre: as osteotomias do mesmo animal e as osteotomias dos diferentes animais de um mesmo grupo levando-se em conta se estimuladas ou não com o ultra-som.

O fato da estimulação iniciar-se 24 horas após a osteotomia, deve-se a pesquisa realizada por Owen (1971), onde a autora relata que no sítio da osteotomia a proliferação de células fibroblásticas do perióstio aumenta nas primeiras 36 horas, atingindo uma população máxima e caindo logo após este tempo, o que facilita a reabsorção e formação da matriz extracelular. Dando seguimento a esta observação, Dyson (1983) sugere que o estímulo ultra-sônico é mais eficiente quando utilizado durante os 15 primeiros dias após o trauma, isto é, durante a fase inflamatória e o começo da fase proliferativa da cicatrização. Duarte (1977) também se posiciona com referência ao tempo de estimulação, recomendando o período de 15 dias para a formação do calo ósseo quando da utilização do ultra-som pulsado de baixa intensidade.

Estudos realizados anteriormente utilizando a energia ultra-sônica pulsada de baixa intensidade demonstraram a eficácia desta forma de energia no que se refere a redução do tempo de reparação do tecido ósseo. Seja através de fraturas experimentais (DYSON et alii, 1968; DUARTE, 1977; DYSON & BROOKES, 1983; COLOMBO, 1992; WANG et alii, 1994) ou de casos clínicos (XAVIER & DUARTE, 1983; HECKEMAN et alii, 1994).

Os parâmetros físicos do ultra-som utilizados neste experimento foram otimizados anteriormente por diversos pesquisadores.

Riolo (1985) obteve como resultado satisfatório para melhor consolidação óssea a frequência de 1000 pulsos por segundo (1 KHz), com um ciclo de trabalho igual a 0.05. Ortega (1986) obteve melhores resultados na reparação óssea, com a largura de pulso de 200 microssegundos com um ciclo de trabalho igual a 0.01.

O uso da hidroxiapatita (HA) como indutor do crescimento ósseo e, portanto, como substituto ósseo tem sido largamente difundido na prática clínica após inúmeros trabalhos experimentais. O tamanho dos poros influi na eficácia da condução do crescimento tecidual para o seu interior (melhor entre 40 e 400 micrometros). No Brasil, desde 1989, podemos encontrar uma HA de produção nacional com uma mudança em sua estrutura química e com poros de 40 micrometros. As vantagens em termos de custo é marcante em favor do produto nacional, numa proporção de 10 para 1 (COLLARES, 1994).

Com base nos dados colhidos dos trabalhos que utilizaram a energia ultra-sônica e daqueles que fizeram uso da hidroxiapatita, ambos com capacidade osteogênica, nos permitia defender a hipótese, antes da realização dos experimentos, de que os dois recursos associados aumentariam a osteogênese da falha óssea. Falamos em hipótese pois não há conhecimento de nenhum trabalho em que se relaciona a energia ultra-sônica pulsada de baixa intensidade e o enxerto de hidroxiapatita.

A hipótese inicialmente levantada não foi confirmada com os resultados dos nossos experimentos, uma vez que as falhas ósseas preenchidas com hidroxiapatita se mostraram em fase de reparação menos desenvolvida do que as falhas que permaneceram vazias. Pode ser observado tecido conjuntivo com células clásticas que reabsorviam a

matriz. Com o decorrer do período de acompanhamento, os grânulos de hidroxiapatita foram diminuindo em tamanho e número, sendo que os mesmos podiam ser observados após 9 semanas. No que se refere ao preenchimento da falha, alguns pontos podem ser considerados. Bang e Urist (1967) relatam que o mineral retarda a absorção da matriz e segundo Reddi (1974) e Urbinati (1978), ele inibe a osteogênese. Nas nossas amostras, o mesmo podia ser visualizado mesmo após 9 semanas. Somado a isto, o osso não desmineralizado mostra uma auto-indução deficiente, talvez porque a difusão de proteína óssea morfogenética (BMP) para a câmara de escavação é lenta e o princípio de indução pode ser suficientemente degradado antes que alcance o local de indução (URIST, 1972). O princípio da indução óssea age melhor em osso desmineralizado. A presença de minerais impede o processo de reabsorção da matriz, retarda a formação das câmaras de escavação e atrasa o início da indução óssea. A matriz orgânica do osso e a dentina, mesmo na ausência de células vivas, contém uma proteína óssea morfogenética (BMP) denominada princípio de indução óssea (URIST e col, 1967).

Um ponto que pode ser levantado diz respeito a hidroxiapatita utilizada no experimento. Será que o material atende a todas as especificações ou, se existe outro produto de melhor qualidade?. Este fato não foi questionado por nós, uma vez que o objetivo do trabalho era testar o produto nacional utilizado em larga escala pela área médica e odontológica.

O fato de que as osteotomias preenchidas com hidroxiapatita não apresentaram o preenchimento total da falha nos tempos observados (3, 6 e 9 semanas) parece-nos ser em parte decorrente da barreira física

promovida pela hidroxiapatita. Os estágios de reparo após fratura ou osteotomia e sua relação com o suprimento sanguíneo são fundamentais. Cofield e col (1975) relatam que os leitos circulatórios tanto medulares como periósticos proliferam-se muito, mas o sistema arterial medular representa um papel fundamental no suprimento sanguíneo para o calo de união e no córtex necrótico revascularizante no local da fratura. O predomínio do suprimento sanguíneo medular aumenta à medida que progride a reparação. A barreira física imposta pela hidroxiapatita limitaria a proliferação de vasos sanguíneos, essenciais para o processo de reparação.

O tecido ósseo vivo apresenta potenciais estáveis de repouso, registrados na faixa de microvolts. Estes potenciais de repouso parecem provir em parte de potenciais de fluxo originados nos vasos sanguíneos, visto que a interrupção do fluxo arterial para o osso produz uma queda significativa nos potenciais de repouso enquanto que a oclusão venosa produz um aumento (BASSET, 1971; ERIKSON, 1974).

Segundo Owen (1978) as células endoteliais das paredes dos vasos e sinusóides do estroma da medula óssea têm potencial osteogênico. A autora relata que há também células mesenquimais indiferenciadas, derivadas do estroma de vários tecidos que são capazes de formar osso quando da presença de um agente indutor adequado. Este potencial osteogênico também fica deficiente, uma vez que o estroma da medula óssea foi retirado na osteotomia e as células endoteliais das paredes dos vasos não conseguem penetrar no enxerto de hidroxiapatita.

Quando a falha óssea permaneceu vazia, houve um completo preenchimento por tecido ósseo em todos os tempos observados (3, 6 e 9 semanas), que pode ser ratificado pelas três formas de análise

utilizadas no experimento (radiológica, macroscópica e histopatológica). Os dados da literatura podem diferir dos resultados encontrados por nós, uma vez que a extensão da falha é fator determinante. Neste aspecto podemos citar o experimento desenvolvido por Volpon (1980), onde o autor não encontrou nenhum sinal de osteogênese em falhas de 20 mm de extensão.

Observa-se porém, que nos segmentos estimulados com o ultra-som, independente se a falha óssea foi ou não preenchida com hidroxiapatita, a osteogênese foi mais evidente. Isto vem confirmar mais uma vez que a energia ultra-sônica é um agente ósteo-indutor.

Hogan e col. (1982) relatam que, quando um tecido isquêmico é estimulado com ultra-som, novos capilares são formados e a circulação é restabelecida numa proporção mais rápida do que na ausência desse recurso terapêutico.

Wang e col. (1974) relatam que os fibroblastos e os macrófagos são ativados precocemente na reparação de uma fratura, portanto a cavitação estável, promovida pela irradiação ultra-sônica, pode causar mudanças dentro das células o que pode ter acelerado a reparação da fratura. A osteoindução depende da interação substrato-célula: os histiócitos (macrófagos) reabsorvem primeiramente a antiga matriz morta. Em seguida as células primitivas do tecido conjuntivo (células primordiais) são induzidas a se transformarem em células osteoprogenitoras e, finalmente, em osteoblastos. Adicionalmente os osteoblastos respondem as forças mecânicas, apesar do efeito exato deste mecanismo ser desconhecido (HARELL e col, 1977; e HASEGAWA e col, 1985).

Devido as propriedades bioelétricas do osso, a carga mecânica que nele atua por ação de forças hemodinâmicas, age como estímulo externo, fazendo com que a matriz extra-celular óssea se deforme induzindo campos elétricos intramoleculares. De acordo com este sinal elétrico, o osso operará mudanças materiais de maneira adequada quanto a quantidade, tempo e direções necessárias à regeneração, remodelamento ou crescimento ósseo, segundo o processo de retroalimentação negativo. Isto é, à medida que mais material vai se formando aumentará a resistência ao estímulo, como um exemplo típico da lei de Wolff (DUARTE, 1977).

A lei de Wolff (1884) defendida por Frankel e Nordin (1980) relaciona o crescimento ósseo as tensões e deformações localizadas no osso; isto é, a capacidade do osso de adaptar-se às mudanças de tamanho, forma e estrutura, depende das tensões mecânicas no osso. Se a tensão diminui, ocorre a reabsorção do osso periosteal e subperiosteal com a conseqüente diminuição em resistência e rigidez. Se o osso é sujeito a altas e consistentes tensões mecânicas, concernentes a um índice fisiológico normal, pode ocorrer uma hipertrofia do osso periosteal e subperiosteal, com um aumento na densidade óssea.

Basset (1971) menciona que a regeneração e o remodelamento ósseo pode ser explicada em face dos efeitos de transdução de energia elástica em elétrica, associando mesmo um vetor permanente de polarização elétrica na direção do crescimento ósseo. Essa polarização deve-se a orientação dos dipolos formados pelas moléculas de tropocolágeno, na mesma direção desenvolvida pelas suas fibrilas. Parece então que, ligada à estimulação mecânica, necessária e

indispensável para o desenvolvimento do tecido ósseo, está associado um mecanismo de transdução mecânico-elétrico.

Os estímulos pulsados de ultra-som produzem cargas elétricas que, a despeito da drenagem natural devida ao meio condutor, se acumulam na superfície do tecido ósseo. Com o estímulo elástico do ultra-som, foi mostrado que o potencial induzido pelo efeito piezoelétrico é negativo. Com o campo elétrico assim formado, poderá haver uma maior atividade mitótica das células situadas na vizinhança, as quais, de acordo com sua função, se agruparão nos sítios de sinal elétrico e pH compatíveis com sua natureza (DUARTE, 1977). Segundo Becker (1972) a colocação de cargas elétricas na superfície celular, decorrente da aplicação da energia ultra-sônica pulsada, mantém a polarização elétrica média enquanto durar o estímulo. Esta polarização faz com que os osteoblastos alterem seus potenciais de membrana permitindo um bombeamento de íons e a captação de nutrientes. As células atuam, então, como um transdutor biológico, onde o estímulo elétrico produz uma maior atividade mitótica das células, as quais se agruparão segundo polaridades compatíveis com sua natureza.

A polaridade e o pH não influem apenas na formação ou destruição da célula, mas também na matriz. Por exemplo o colágeno e sais de cálcio são menos solúveis em pH alcalino. O pH baixo favorece a reabsorção mineral (TUREK, 1991).

Diante deste fato fica mais fácil entendermos a ação de alguns tipos de estímulos, corrente elétrica e o ultra-som, como agentes estimuladores do crescimento ósseo. No caso específico do ultra-som, a energia mecânica seria a fonte estimuladora do aparecimento de campos

elétricos no tecido ósseo, dado a propriedade piezoelétrica por ele apresentada.

Segundo Silva (1987) a aplicação de um campo acústico pode determinar a ação de um campo elétrico a nível da membrana celular, o que leva a um afastamento da condição de equilíbrio eletroquímico, com o surgimento de uma densidade de corrente iônica para o interior da célula. O autor ressalta ser possível, através da aplicação do ultrassom na região da fratura óssea, um aumento no influxo de certos íons envolvidos com o próprio ciclo celular, pode-se esperar uma diminuição no tempo necessário para a consolidação de uma fratura óssea, em função da maior disponibilidade intracelular de tais íons.

Vale ressaltar que os cristais de hidroxiapatita presentes no enxerto não apresentam a propriedade piezoelétrica, capaz de desenvolver um campo elétrico decorrente do estímulo ultra-sônico, uma vez que o experimento de Fukada & Yasuda (1957) demonstrou a existência de piezoeletricidade no tropocolágeno, componente orgânico do osso, de grande importância na formação do tecido ósseo. A ação da energia ultra-sônica neste caso pode ser explicada então pela estimulação da membrana periosteal, visto que em todas as falhas de 3 e 6 semanas, o enxerto permanecia visível apresentando somente um envoltório de osso neoformado, oriundo do calo periosteal.

7.0 - CONCLUSÕES

Tanto o modelo experimental quanto a metodologia utilizada neste trabalho mostraram-se adequados para os propósitos deste estudo;

As falhas ósseas preenchidas com grânulos de hidroxiapatita não são corrigidas totalmente até 9 semanas após o ato cirúrgico. Vale destacar que as falhas ósseas estimuladas com o ultra-som pulsado de baixa intensidade apresentaram melhores resultados do que aquelas não estimuladas;

As falhas ósseas que permaneceram vazias, apresentaram intensa formação óssea, sendo que após 3 semanas já era possível observar-se macroscópica e radiologicamente o total preenchimento das falhas por osso neoformado, tal fato também ocorreu após 6 e 9 semanas do ato cirúrgico. Pode ser visualizado a diferença entre a falha estimulada quando comparada com a não estimulada;

Os resultados obtidos permitem-nos evidenciar, comparativamente, que a energia ultra-sônica pulsada de baixa intensidade, nos parâmetros aqui utilizados, acelera a neoformação óssea de animais submetidos a osteotomia experimental, fato comprovado macroscopicamente e radiologicamente bem como ao exame histopatológico. Todos os resultados aqui encontrados foram, comparativamente melhores do que quando as falhas, por suposição, foram preenchidas com hidroxiapatita;

Diante do exposto podemos ainda admitir que a hidroxiapatita (HA-40) não se mostrou eficiente quanto ao seu possível mecanismo osteoindutor, no modelo experimental por nós utilizado.

8.0 - SUGESTÕES DE NOVOS TRABALHOS

Com base nos resultados obtidos através dos experimentos deste estudo, abrem-se novas possibilidades de investigação:

- Utilizando-se da mesma metodologia, quanto ao processo cirúrgico e as formas de análise, pode-se variar a hidroxiapatita empregada no enxerto;

- Verificar o comportamento do tecido neoformado com outras técnicas de análise, por exemplo com fluorocromos;

- Pode-se variar o modelo experimental utilizando-se de implante metálicos impregnados com hidroxiapatita;

9.0 - REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ANDREW, E.H.. Fracture. In VINCENT, J.F.V. and CURREY, J.D., editors: Mechanical Properties of Biological Materials, Symposia of the Society for Experimental Biology, Number XXXIV, Cambridge, England, 1980, Cambridge University Press
- BANG, G. and URIST, M.R.. Bone induction in excavation chambers in matrix of decalcified dentin. *Arch. Surg.*, 94:781, 1967
- BARBIERI, C.H.: Enxerto Osseo Autólogo Retardado. Estudo Experimental da sua Incorporação. Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, 1977
- BASSET, C.A.L. and BECKER, R.O.. Generation of Eletric Potentials by Bone in Response to Mechanical Stress. *Science* 137:1063-64, 1962
- BASSETT, C.A.L.; PAWLICK, R.J. and BECKER, R.O.. Effects of eletric currents on bone *in vivo*. *Nature* 204:652, 1964
- BASSET, C.A.L.. Eletrical Effects in Bone. *Science Am.* 213:18, 1965
- BASSETT, C.A.L.. Biological significanca of piezoelectricity. *Calcif Tissue Res.* 1:252, 1968
- BASSETT, C.A.L.. Biophysical principles affecting bone structure. In Bourne GH (ed): *Biochemistry and Physiology of Bone*, pp 1-76. New York, Academic Press, 1971
- BASSETT, C.A.L.. Pulsing eletromagnetic fields: A new approach to surgical problems. In Buchwald H, Varco, R1 (eds): *Metabolic Surgery*, pp 255-306. New York, Grune & Stratton, 1978
- BASSETT, C.A.L.; PAWLICK, R.J. and PILLA, A.A.. Acceleration of fracture repair by electromagnetic fields: A surgically non-invasive method. *Ann NY ACad Sci.* 238:242, 1974
- BECKER, R.O.; BASSETT, C.A.L. and BACHMAN, C.H.. Bioelectric factors controlling bone structure. In Frost, H.M. (ed): *Bone Biodynamics*, pp 209-232. Boston, Little, Brown & Co, 1964
- BECKER, R.O. and MURRAY, D.G.. The Eletrical Control Sytem Regulating Fracture Healing in Amphibians. *Clin. Orthop.* 73:169, 1970
- BECKER, R.O.. Stimulation of Partial Limb Regeneration in Rats. *Nature* 235:109-111, 1972
- BRIGHTON, R.O.. Stimulation of Partial Limb Regeneration in Rats. *Nature* 253:109-11, 1972

- BRIGHTON, C.T., BRIEDENBERG, Z.B.. Electrical stimulation and oxygen tension. *Ann. NY Acad. Sci.*, 238:314, 1974
- BRIGHTON, C.T. et alli. Treatment of non-union with constant direct current. *Clin. Orthop.* 124:106, 1977
- BURING, K. and URIST, M.R.. Transfilter Bone Induction. *Clin. Orthop.* 54:235, 1967
- BURSTEIN, A.H., REILLY, D.T. and MARTENS, M.. Aging of Bone Tissue, Mechanical Properties. *J. Bone Joint Surg* 58A:82, 1976
- CARNESALE, P.L. and SPANKUS, J.D.: A Clinical Comparative Study of Autogenous and Homogenous Bone-Grafts. *J. Bone Joint Surg.*, 41-A: 887, 1959
- CARTER, D.R. and SPENGLER, D.M.. Mechanical Properties and Composition of Cortical Bone. *Clinical Orthop* 135:192, 1978
- CARVALHO, P.S.P.; GARCIA, I.R. e SANCHES, M.G.. Estudo comparativo entre as hidroxiapatitas, Osteosynt e HA-40. Estudo histomorfológico em ratos. *Anais do 19 Congresso sobre Cirurgia Experimental Relacionada a Cirurgia Plástica, Fac. Med. Botucatu*, 1994
- COLEMAN, H.M.; BATEMAN, J.E.; DALE, G.M. and STARR, D.E.: Cancellous Bone Grafts for Infected Bone Defects. A Single Stage Procedure. *Surg. Gynecol. Obstet.*, 83:392, 1946
- COLLARES, M.V.M. e col.. Estudo Comparativo entre hidroxiapatita (HA) de diferentes porosidades (40x200u) para cranioplastia em ratos. *Anais do 19 Congresso sobre Cirurgia Experimental Relacionada a Cirurgia Plástica, Fac. Med. Botucatu*, 1994
- COLOMBO, S.J.M.. Efeitos da variação da intensidade acústica na consolidação ultra-sônica de fraturas experimentais. *Dissertação de mestrado, EESC-FMRP*, 64pp, São Carlos, 1992
- COFIELD, R.H. et alli. Strontium-85 Extraction During Trans-Capillary Passage in Tibial Bone. *J. Appl. Physiol.* 39:596, 1975
- CURREY, J.D.. The Adaptation of Bones to Stress. *J. Theor. Biol.* 20:91, 1968
- DE MERCATO, G. and GARCIA SANCHEZ, F.J.. Variation of the Electric Properties Along the Diaphysis of Bovine Femoral Bone. *Med. Eng. Comput.*, 29(4):441-6, 1991
- DE MERCATO, G. and GARCIA SANCHEZ, F.J.. Correlation Between Low-Frequency Electric Conductivity and Permittivity in the Diaphysis of Bovine Femoral Bone. *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, 39(5):523-6, 1992

- DUARTE, L.R.. Estimulação Ultra-sônica do Calo Osseo. São Carlos, Escola de Engenharia de São Carlos - USP, Tese de Livre Docência, 1977
- DUARTE, L.R.. The Stimulation of bone growth by ultrasound. Archives of Orthop. Traum. Surgery. 101:153-159, 1983
- DUCHEYNE, P. et alli. Effect of hydroxyapatite impregnation on skeletal bonding of porous coated implants. J. Biomed Mater Res. 14:225:237, 1980
- DYSON, M., POND, J. B. and JOSEPH, J.: The Stimulation of Tissue Regeneration by Means of Ultrasound. Clinical Science, 38:273, 1968
- DYSON, M. and SUCKLING, J.: Stimulation of Tissue Repair by Ultrasound: A Survey of the Mechanisms Involved. Physiotherapy, 64:105, 1978
- DYSON, M. and PAROOKES, M.. Stimulation of bone repair by ultrasounds. Ultrasound in Med. and Biol. supplement 2, 61-66, 1983
- ERIKSON, C.. Streaming potentials and other water-dependent effects in mineralized tissues. Ann NY Acad Sci. 238:321, 1974
- EVANS, F.G. and VINCENTELLI, R.. Relation of Collagen Fiber Orientation to some Mechanical Properties of Human Cortical Bone. J. Biomech. 2:63, 1969
- EVANS, F.G.. Mechanical Properties of Bone. Springfield, III, 1973 Charles C. Thomas, Publisher
- FIRSCHEIN, H.E.. Collagen Turnover in Calcified Tissues. Arch. Biochem. Biophys. 119:119, 1967
- FITTON-JACKSON, S. and BASSETT, C.A.L.. The response of skeletal tissue to pulsed magnetic fields. In Richards, R.J. and Rajan, K.T. (eds): Culture in Medical Research, vol II, London, Pergamon Press, 1980
- FRANKEL, V. and NORDIN, M.. Basic Biomechanics of the Skeletal System. Philadelphia, 1980, Lea & Febiger
- FRIEDENBERG, Z.B. and BRIGHTON, C.T.. Bioelectric potentials in bone. J. Bone Joint Surg. 48A:915, 1966
- FRIEDENBERG, Z.B. and KOHANIM, M.. The effect of direct current on bone. Surgery, Gynecology and Obstetrics 127:97-102, 1968
- FRIEDENBERG, Z.B. et alli. Bone reaction to varying amounts of direct current. Surg. Gynecol. Obstet. 131:894, 1970
- FRIEDENBERG, Z.B. and BRIGHTON, C.T.. Stimulation of fracture

- healing by direct current in the rabbit fibula. *Journal of Bone and Joint Surgery* 53-A:1400-08, 1971
- FRIEDENBERG, Z.B. et alli. The response of non-traumatized bone to direct current. *J. Bone Joint Surg.* 56A:1023, 1974
- FROST, H.M.. Bone Remodeling and its Relationship to Metabolic Bone Diseases. Springfield, III, 1973, Charles C. Thomas, Publisher FUKADA, E. and YASUDA, I. On the piezoelectric effect of bone. *J. Physiol Soc. Jpn.* 12:1158-1162, 1957
- FUKADA, E. and YASUDA, I.. Piezoelectric Effect in Collagen *Japanese Journal of Applied Physics*, 3 (2) Feb, 1964
- FUKADA, E.. Mechanical Deformation and Electrical Polarization in Biological Substances. *Biorheology* 5:199, 1968
- GLIMCHER, M.J., FRIBERG, U.A. and ORLOFF, S.. The Role of Inorganic Crystals in Solubility Characteristics of Collagen in Lathyrotic Bone. *J. Ultrastruct Res.* 15:74, 1966
- GLISIC, B.. Piezoelectric Effect on Bone and its Origin. *Stomatol. Glas. Srb.*, 37(1):77-84, 1990
- HADDAD, S. et al Estímulo do epitélio germinativo do rato adulto com ultra-som pulsado de baixa intensidade. *Revista Bras de Engenharia*, 7: 46-52, 1990.
- HARELL, A., DEKEL, S., BINDERMA, I.. Biochemical Effect of Mechanical Stress on Cultured bone cells. *Calcif Tissue Res* 22 (suppl): 202-207, 1977
- HARRIS, M. The conservative management of osteonecrosis of the mandible with ultrasound therapy. *British Journal Oral Maxillofacial Surgery*, 30:5, pp 313-318, 1992.
- HASEGAWA, I., SATO, S., SUZUKI, Y., BRUNETTE, D.M.. Mechanical Stretching Increases the Number of Cultured Bone Cells Synthesizing DNA and alters their Pattern of Protein Synthesis. *Calcif Tissue Int.* 37:431-36, 1985
- HASTINGS, G.W. and MAHMUD, F.A.. Electrical Effects in Bone. *J. Biomed. Eng.*, 10(6):515-21, 1989
- HAYES, W.C. and CARTER, D.R.. Biomechanics of bone. In SIMMONS, D.J. and KLUNIN, A.S., editors: *Skeletal Research: An Experimental Approach*, New York, 1979, Academic Press, Inc.
- HAYNE, C.R.. Pulsed high frequency energy its place in physiotherapy. *Physiotherapy*, Dec. 1984, vol 70, n 12.
- HECKMAN, J.D. et alii.. Acceleration of Tibial Fracture-Healing by Non-Invasive, Low-Intensity Pulsed Ultrasound. *J. Bone and Joint Surg.*, 76(1):26-34, 1994

- HELLSTADIUS, A.. Studies on Osteogenesis Around Autoplastic Bone Transplants in Bone Defects. *Acta Orthop Scand.* 24:278, 1955
- HOGAN, R. D. and cols The effect of ultrasound on hemodynamics in skeletal muscle: effects during ischemia. *Microvascular Research*, 23:370-79, 1982.
- KINGMA, M.J. and HAMPE, J.I.: The Behaviour of Blood Vessels After Experimental Transplantation of Bone. *J. Bone Joint Surg.*, 46-b: 141, 1964
- JUNQUEIRA, L.C. e CARNEIRO, J.. *Histologia Básica.* 7ª ed. Ed. Guanabara, R.J., 1990
- MAATZ, R., LENZ, W. and GRAY, R.: Spongiosa Test of Bone Grafts Transplantation. *J. Bone Joint Surg.*, 36-a: 721, 1954
- MCDONALD, F. and HOUSTON, W.J.. An in Vivo Assessment of Muscular Activity and the Importance of Electrical Phenomena in Bone Remodelling. *J. Anat. Oct.* 172:165-75, 1990
- MCDONALD, F.. Electrical Effects at the Bone Surface. *Eur. J. Orthod.*, 15(3):175-83, 1993
- MARINO, A.A. and GROSS, B.D.. Piezoelectricity in Cementum, Dentine and Bone. *Arch. Oral Biol.* 34(7):507-9, 1989
- OLIVEIRA, J.C.: O Enxerto Osseo em Meio Infectado - Estudo Experimental e Clínico. Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina do Porto, Portugal, 1967
- ONISHI, H. et alli. The effect of hydroxyapatite coating on bone growth into porous titanium alloy implants. *J. Bone Joint Surg.* 71:213-216, 1989
- ORTEGA, J.M.: Efeito do Ultra Som no Reparo de Falha Ossea Experimental. Avaliação Quantitativa e Morfológica do Parametro Largura do Pulso. São Carlos, Escola de Engenharia de São Carlos e Faculdade de Medicina de Riberão Preto - USP - Dissertação de Mestrado, 1986
- OWEN, M.. The Origin of Bone Cells. *Int. Rev. Cytol.* 28:213, 1970
- OWEN, M.. Histogenesis of Bone Cells. *Calcif. Tissue Res.* 25:205, 1978
- PALMER, I.: Surgical Treatment of Defects of the Long Bones. *Acta Chir. Scand.*, 103:381, 1952
- PARRISH, F.F.: Treatment of Bone Tumor by Total Excision and Replacement With Massive Autologous and Homologous Grafts. *J. Bone Joint Surg.*, 48-A: 968, 1966

- REDDI, A.H.. Bone matrix in the solid state: Geometric influence on the differentiation of fibroblasts. In *Adv. Biol. Med. Phys.*, 15:1, 1974
- REUTER, U., STREMPER, F., JONH, F. and KNOCH, H. G.: Modification of Bone Fracture Healing by Ultrasound in an Animal Experimental Model. *Zeitschrift für Experimentelle Chirurgie, Transplantation und Künstliche Organe.* 17:290, 1984
- RHINELANDER, F.W.. Circulation of Bone. In Bourne GH (ed): *Biochemistry and Physiology of Bone*, 2 nd, New York Academic Press, 1972
- SHTEYER, S.J., NORTON, L.A. and RODAN, G.A.. Electromagnetically -induced DNA synthesis in calvaria cells. *J. Dent. Res.* 59A:362, 1980
- SPADADO, J.A.. Electrically stimulated bone growth in animals and man: A review of the literature. *Clin Orthop.* 122:125, 1977
- SINGH, I.. The Architecture of Cancellous Bone. *J. Anat.* 127:305, 1978
- TULI, S.M.: Bridging of Bone Defects by Massive Bone Grafts in Tumorous Conditions and in Osteomyelitis. *Clin. Orthop.*, 87:60, 1972
- TUREK, S.L.. *Ortopedia. Princípios e sua Aplicação.* ed. Manole, S.P., 1991
- UKLEJEWSKI, R.. Initial Piezoelectric Polarization of Cortical Bone Matrix as a Determinant of the Electrokinetic Potential zeta of that bone osteonic lamella as mechanoelectret. *J. Biomech.* 27(7):991-2, 1994
- URBANATI, E.C.. *Condrogênese e Osteogênese. Indução por pó de osso descalcificado.* Dissertação de Mestrado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 1978
- URIST, M.R.. Bone: Formation by Autoinduction. *Science* 150:893, 1965
- URIST, M.R., SILVERAMN, B.F., BURING, K. et alii. The Bone Induction Principle. *Clin. Orthop.* 53:243, 1967
- URIST, M.R.. Osteoinduction in Underminearalized Bone Implants Modified by Chemical Inhibition of Matrix Enzymes. *Clin. Orthop.* 87:132, 1972
- URIST, M.R., MIKULSKI, A. and STUART, D.B.. A Chemosterilized Antigen-Extrated Autodigested Alloimplant for Bone Banks. *Arch Surg.* 110:416, 1975

- VOLPON, J.B.. A matriz de osso cortical homólogo granulado descalcificada na correção de falha óssea disfisária. Estudo experimental em coelhos. Tese de doutoramento - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 1980
- WANG, S.J. et alii. Low Intensity Ultrasound Treatment Increases Strength in a Rat Femoral Fracture Model. J. Orthop. Res., 12: 40-7, 1994
- XAVIER, C.A.M. e DUARTE, L.R.: Estimulação Ultrassônica do Calo Osseo. Aplicação Clínica. Revista Brasileira de Ortopedia. 18:73, 1983
- YOUNG, S.R. and DYSON, M.. Macrophage responsiveness to therapeutic ultrasound. Ultrasound in Med. & Biol., 16:809-816, 1990