*Uso da Matriz Óssea Desmineralizada
Associada a Estimulação Ultra Sônica
Pulsada de Baixa Intensidade na Correção
Óssea. Estudo Experimental em Coelhos*

*Autora: Ana Paula M. Casadei Carro
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 SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOENGENHARIA**

***USO DE MATRIZ ÓSSEA DESMINERALIZADA ASSOCIADA A
ESTIMULAÇÃO ULTRA SÔNICA PULSADA DE BAIXA INTENSIDADE NA
CORREÇÃO DE FALHA ÓSSEA. ESTUDO EXPERIMENTAL EM COELHOS.***

ANA PAULA MARZAGÃO CASADEI CARRO

SÃO CARLOS

1998

Classe.	TESE
Cutt.	1219
Tombo	0023/99

S/S 0023/99

1007161

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento
da Informação do Serviço de Biblioteca - EESC-USP**

C319u Carro, Ana Paula Marzagão Casadei
Uso de matriz óssea desmineralizada associada a
estimulação ultra sônica pulsada de baixa
intensidade na correção de falha óssea : estudo
experimental em coelhos / Ana Paula Marzagão Casadei
Carro. -- São Carlos, 1998.

Dissertação (Mestrado) -- Área Interunidades
Bioengenharia da EESC/FMRP/IQSC-Universidade de
São Paulo, 1998..

Orientador: Prof. Dr. Affonso Luiz Ferreira.

1. Osso desmineralizado. 2. Enxertia.
3. Ultra-som. I. Título.

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOENGENHARIA**

***USO DE MATRIZ ÓSSEA DESMINERALIZADA ASSOCIADA A
ESTIMULAÇÃO ULTRA SÔNICA PULSADA DE BAIXA INTENSIDADE NA
CORREÇÃO DE FALHA ÓSSEA. ESTUDO EXPERIMENTAL EM COELHOS***

Ana Paula Marzagão Casadei Carro

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

1998

DEDICATÓRIA

Aos meus avós, Domingos e Ana, por acreditarem no meu potencial.

Aos meus pais Sylvio e Leila por terem me dado a oportunidade da vida.

Ao meu marido João pela paciência nos momentos mais difíceis

Às minhas filhas Andréa e Ana Carolina por existirem.

"É graça divina começar bem. Graça maior persistir na caminhada certa. Mas a graça das graças é não desistir nunca." (D. Hélder Câmara)

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador e mestre Prof. Dr. Affonso Luiz Ferreira, pelo carinho e atenção com que sempre me orientou na realização deste trabalho.

Ao amigo Nelson Ferreira da Silva Jr., pela inestimável cooperação em todos os momentos da realização deste trabalho.

Ao amigo Orivaldo Lopes da Silva pelo impagável apoio na execução deste trabalho em todas as etapas.

À amiga Marielza Ortega Roma, pelo carinho e delicadeza com que sempre me atendeu e pela competência na realização das referências bibliográficas.

À Secretária Janete Ferreira Rodrigues dos Santos pelo apoio e auxílio carinhoso na digitação final do trabalho.

À todos os professores, pelo conhecimento transmitido, sem o qual este trabalho não seria possível ser realizado.

Ao Departamento de Engenharia e Ciências de Materiais pelo uso do laboratório e pela dedicação dos funcionários.

À CAPES (Coordenadoria de Apoio Pessoal de Ensino Superior), pela concessão da bolsa de mestrado indispensável para a realização deste trabalho.

À todos aqueles que, de alguma forma, favoreceram para que fosse possível a realização deste trabalho.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	VI
RESUMO.....	VII
ABSTRAT	VIII
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	2
2.1 GENERALIDADES SOBRE O TECIDO ÓSSEO	6
2.1.1 <i>ESTRUTURA DO OSSO</i>	7
2.1.2 <i>COMPONENTES DO OSSO</i>	9
2.1.3 <i>HISTOGÊNESE DO OSSO</i>	11
2.2 CONSOLIDAÇÃO DE FRATURAS	13
2.3 PROPRIEDADES ELÉTRICAS DO OSSO.....	15
2.3.1 <i>PIEZOELETRICIDADE DO OSSO</i>	16
2.3.2 <i>POTENCIAIS GERADOS PELA PRESSÃO</i>	16
2.4 ULTRA SOM.....	17
2.4.1 <i>GERAÇÃO DE ONDAS ULTRA SÔNICAS</i>	18
2.4.2 <i>TIPOS DE ONDA ULTRA-SÔNICA</i>	18
2.4.3 <i>PARÂMETROS FÍSICOS QUE FUNDAMENTAM A ONDA</i>	18
2.4.4 <i>CARACTERÍSTICAS DO ULTRA SOM</i>	19
2.4.5 <i>EFEITOS BIOLÓGICOS DO ULTRA-SOM</i>	20
3 OBJETIVO.....	22
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1 MATERIAL	23
4.1.1 <i>O EQUIPAMENTO DE ULTRA SOM</i>	23
4.1.2 <i>ANIMAL DE EXPERIMENTAÇÃO</i>	23
4.1.2.1 <i>OBSERVAÇÕES ANATÔMICAS</i>	23
4.1.3 <i>REPARO DO OSSO GRANULADO</i>	24
4.1.3.1 <i>DESMINERALIZAÇÃO DO OSSO GRANULADO</i>	25
4.2 MÉTODOS	25
4.2.1 <i>ANESTESIA E PROCEDIMENTO CIRÚRGICO</i>	25
4.2.2 <i>ORGANIZAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS</i>	27
4.2.3 <i>MÉTODOS DE AVALIAÇÃO</i>	28
4.2.3.1 <i>AVALIAÇÃO RADIOLÓGICA</i>	28
4.2.3.2 <i>PREPARO DO MATERIAL PARA EXAME HISTOLÓGICO</i>	29
5 RESULTADOS.....	30
5.1 OBSERVAÇÕES GERAIS PÓS OPERATÓRIAS.....	30
5.2 ESTUDO RADIOLÓGICO PÓS-OPERATÓRIO	30
5.3 ACHADOS HISTOLÓGICOS.....	35
6 DISCUSSÃO	42
7 CONCLUSÃO	45
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46

LISTA DE FIGURAS

- Figure 1: Esquema tridimensional mostrando o aspecto em corte longitudinal e transversal dos vários componentes que entram na estrutura do córtex diafisário de um osso longo.....8
- Figure 2: desenhos mostrando colares periostais que se formam, aproximam-se um do outro e terminam por fundir-se, durante a consolidação de uma fratura. 15
- Figure 3:- Foto mostrando com 15 dias de pós-operatório. O lado estimulado apresenta uma maior formação radiodensa quando comparado com o lado controle.31
- Figure 4:- Foto mostrando 30 dias de pós-operatório. Observar a falha óssea totalmente preenchida e o lado estimulado indicando calo ósseo neo formado em estágio mais adiantado que o lado controle. 32
- Figure 5:- Fotos do seguimento radiológico dos animais sacrificados com 45 dias. Observar a presença de osso cortical e reabsorção do calo ósseo..... 34
- Figure 6:- Fotomicrografias de regiões da falha óssea dos animais sacrificados com quinze dias de pós-operatório. Observar a presença de células multinucleadas (osteoclastos seta negra), o que indica uma reorganização de tecido ósseo neo formado. Fotos com foram coradas com Hemalumen e Eosina (H.E.). Foto com foi analisada sob luz polarizada e prisma de quartzo.37
- Figure 7:- Fotomicrografias do osso rádio dos animais sacrificados com 30 dias de P.O. . Observar na foto de lâminas analisadas sob luz polarizada feita do material controle de 30 dias, um grau de organização das fibras colágenas menor em relação a foto mostrada na figura 6. Fotos com .Na foto corada com Tricrômico de Masson (foto em azul com seta sinalizando um osteócito). 38
- Figure 8:- Foto micrografia do osso rádio dos animais sacrificados com 30 dias. Observar na foto de material corado por Tricrômico de Massom a presença de osteócitos aprisionados na matriz óssea em formação. Observar também a presença de material cartilaginoso em grande quantidade na foto feita do material controle comparado ao estimulado que contém maior número de osteócitos (fotos coradas com H.E. marcadas com). 39
- Figure 9:- Fotomicrografias de regiões da falha óssea de animais sacrificados com 45 dias de P. O . Observar o material corado por Tricrômico de Masson (fotos com fundo em azul) uma maior organização do tecido ósseo neo formado no lado estimulado em relação ao controle. Nas fotos de material corado com H.E. é maior a presença de células osteoblásticas no lado estimulado que no controle. 40
- Figure 10:- Fotomicrografias de regiões da falha óssea de animais sacrificados com 45 dias de P. O. .Observar o maior número de osteócitos na foto corada por Tricrômico de Masson no lado estimulado em relação ao controle. 41

RESUMO

No presente trabalho, procurou-se investigar o efeito do ultra som pulsado de baixa intensidade como um agente acelerador do princípio indutor da matriz óssea desmineralizada, utilizada no preenchimento de falhas ósseas, criadas experimentalmente na diáfise do rádio de coelhos. Foram criadas falhas na diáfise do rádio de aproximadamente 1 cm de comprimento, tentando-se preservar ao máximo o periósteo. As falhas foram preenchidas com pó de osso desmineralizado. Os animais foram estimulados com o ultra som, durante 15 dias consecutivos após a cirurgia e foram observados pôr até 30 dias, tendo sido sacrificados aos 15, 30 e 45 dias após a cirurgia. Os resultados foram avaliados radiológica e histologicamente nos 3 períodos, possibilitando um estudo da evolução do processo osteogênico. As falhas ósseas preenchidas com matriz óssea desmineralizada e que receberam o estímulo com o ultra som de baixa intensidade apresentaram uma sensível aceleração no processo de formação de osso, demonstráveis histológica e radiologicamente.

ABSTRAT

In the present work, it has been investigated the effect of the low intensity pulsed ultrasound on the use of demineralized bone matrix used as bone gap filling material in experimental diaphysial osteotomies of rabbit radius bone. Preserved periosteum 1 cm bone gaps have been surgically created in the radius bone diaphysis and filled with demineralized bone powder. The experimental animals received the ultrasound stimulus for 15 days following the surgery and were observed for until 30 days. The sacrifices were performed 15, 30 and 45 days after surgery. In order to study the healing process evaluation were performed at the end of the 3 periods. The bone gaps whose received demineralized bone matrix and low intensity and low intensity ultrasound simulation presented a remarkable aceleration in the bone formation process as shown by histological and radiological evaluation.

1 INTRODUÇÃO

A maior parte da pesquisa científica, sempre teve como finalidade proporcionar ao homem uma boa qualidade de vida, eliminando ou minimizando ao máximo todos os fatores ou situações que pudessem atrapalhar sua evolução, socialmente, física ou mentalmente.

Sendo assim, muito tem sido pesquisado no sentido de manter o homem o mais próximo possível do estado de saúde perfeita, para que possa dispor de suas capacidades físicas e mentais plenamente.

Acidentes ou patologias que afastem o homem do seu convívio social, principalmente do seu trabalho, têm sido estudadas no sentido de reduzir ao máximo o tempo para sua reabilitação e devolver o indivíduo a um grau o mais próximo possível da normalidade.

Nesse sentido, situações em que a clínica se mostra complicada e o indivíduo pode permanecer incapacitado pôr um período prolongado, tem merecido a atenção da comunidade científica com empenho cada vez maior.

É o caso de cirurgias ortopédicas reparadoras, que se fazem cada vez mais necessárias. Situações clínicas nas quais o processo natural de reparação óssea fica prejudicado, ou impossibilitado, são cada vez mais comuns. São elas, pseudartroses, más formações congênitas, fraturas ou necroses ósseas com perda de substância, ressecções tumorais extensas e alongamentos ósseos, entre outras.

O reparo de defeitos ósseos representa o maior desafio da cirurgia ortopédica hoje em dia, quando em casos em que o enxerto autólogo não está disponível em quantidade suficiente.

Muito se tem avançado no sentido de descobrir um substituto ideal para situações nas quais um enxerto ósseo se faz necessário.

Uma possibilidade encontrada e que tem ganho uma credibilidade cada vez maior da comunidade médica, é o enxerto homólogo de matriz óssea desmineralizada e granulada. Sua utilização em alguns casos clínicos já tem sido realizada (Glowacki 1981), mas ainda se tem muito o que avançar antes que isso possa se transformar em rotina nos hospitais.

2 REVISÃO DA LITERATURA

O problema de transplante de ossos vem merecendo a atenção de médicos e cientistas desde o século XVII, quando na Holanda, em 1668, Job van Meekerem corrigiu um defeito no crânio de um soldado russo com um pedaço de osso da calota craniana de cachorro. Esse transplante fez com que o soldado fosse excomungado e mais tarde necessitasse retirar o implante. Quando isso foi feito, entretanto, o osso já havia sido refeito.

No século XIX Senn usou, pela primeira vez, osso desmineralizado como material de enxerto para preencher falhas ósseas resultantes de osteomielites (Senn 1889). Desde então, o assunto vem merecendo a atenção de cientistas preocupados com o assunto, e os resultados das pesquisas ainda são pôr vezes conflitantes.

Em 1965 criou se uma nova situação experimental usando matriz óssea desmineralizada e liofilizada como indutora de osteogênese em tecido não ósseo. (Urist 1965) verificou que o músculo era capaz de desenvolver neoformação óssea onde a matriz óssea descalcificada havia sido implantada, num período de 4 a 6 semanas. Urist chamou esse processo de autoindução. Esses resultados foram confirmados mais tarde (Huggins 1970).

Histologicamente, observou-se que a osteogênese ocorria no interior de lacunas de reabsorção da matriz óssea, produzidas por células clásticas (Van Putte e Urist 1965). Linden, deu grande importância para a erosão do implante (Linden 1975). Observou-se grande número de células conjuntivas que surgem desde o primeiro dia do implante e vão se transformando em condroblastos e osteoblastos. Após 5 ou 6 dias da realização do implante, é possível observar, nas regiões mais centrais do implante, a presença de cartilagem que atinge o máximo no 7º e 8º dias, sofrendo condrólise no 9º dia dando lugar a formação de tecido ósseo entre o 10º e 12º dias. (Reddi e Huggins 1972)

Os mecanismos fisiológicos envolvidos no processo de formação de tecido ósseo podem ocorrer de três maneiras distintas: OSTEOGÊNESE, que é a formação de matriz óssea mineralizada a partir de osteoblastos ou pré osteoblastos, por exemplo, transplantes de lascas da crista do osso ilíaco com medula para outra parte do corpo. Nesse tipo de enxerto muitos osteoblastos mais células precursoras

sobrevivem e formam um novo centro de ossificação nos locais onde o novo osso é necessário. OSTEOCONDUÇÃO, que é conseguida através de osso não vivo (banco de ossos) congelado, liofilizado ou irradiado, o que caracteriza um implante e não um enxerto. Na osteocondução, o osso morto age como uma malha onde vão crescer vasos, seguidos pela reabsorção do implante e deposição de novo osso originado das margens da falha óssea. OSTEOINDUÇÃO, que é a conversão de tecido conjuntivo em osso por um estímulo apropriado. Osso desmineralizado e dentina são considerados como fatores de estimulação a osteoindução (Ray e Holloway, 1957; Urist, 1965). Depois de implantados no tecido subcutâneo de ratos, pó de osso desmineralizado, induziram a conversão de tecido conjuntivo em cartilagem, que se calcificou, foi invadida por vasos sanguíneos e substituída posteriormente por osso (Reddi e Huggins 1972). Essa sequência altamente especializada de eventos, é análoga ao processo de ossificação endocondral..

Observou-se que a proliferação de mucosa do rim, ureter e bexiga induzia a formação de osso em tecido conjuntivo (Huggins, 1931). Mais recentemente demonstrou-se que a osteogênese poderia ser induzida por matriz óssea desmineralizada ou dentina (Ray e Holloway, 1957; Urist, 1965 e Reddi e Huggins, 1972). O requisito mais importante para a matriz é que todos os componentes ácido solúveis sejam removidos (Glowacki, Altobelli e Milliken 1981). Pó de osso contendo mineral, além de não ser osteoindutor, ainda promovem a reabsorção por células mono e multinucleadas (Holtrop, Cox e Glowacki 1982).

Quando implantadas no tecido subcutâneo ou intramuscular, a matriz óssea desmineralizada provoca uma leve resposta inflamatória. Células mesenquimais do hospedeiro são atraídas pelo pó de osso e se fixam em sua superfície até que, por volta do 7º dia após o implante, são convertidas fenotipicamente em condroblastos. Essas células produzem matriz cartilaginosa por 4 dias até a mineralização da cartilagem, invasão vascular e a condrólise começarem. No final de 4 semanas, osteoblastos e osso com medula óssea nos espaços são encontrados.

Acredita-se que um fator que possa disparar o processo de osteoindução seja uma “proteína óssea morfogênica”. Urist caracteriza esse fator como uma glicoproteína hidrofóbica (Urist, Mikulski e Lietze 1979).

O processo de osteogênese vem sendo estudado intensamente do ponto de vista do material indutor . O tipo de osso utilizado (cortical ou esponjoso) e a quantidade de material utilizado interferem na quantidade de osso neoformado. Outro fator que influencia o processo de osteogênese é o tamanho e a geometria das partículas. Processos físicos como calor, irradiação, correntes elétricas, campos eletromagnéticos também interferem na indução de tecido ósseo.

Foi demonstrado que o osso desmineralizado é o melhor substituto para enxerto de osso vivo em locais onde há perda de substância óssea. Material inorgânico impede mais do que acelera o processo de ossificação (Ray e Holloway 1957).

Em 1974 Linden observou através de implantes de osso desmineralizado em tecido muscular e cápsulas no rim de ratos, que na área do implante inicialmente tem-se uma rápida resposta inflamatória, depois a região do implante é invadida por tecido conjuntivo mais células sanguíneas. Acontece então uma erosão desse tecido e as cavidades são invadidas por células gigantes multinucleadas; ocorre um processo de recalcificação da área do implante e finalmente a formação de novo osso é induzida na região da erosão. (Linden 1974).

Comparando osso esponjoso do ilíaco, não descalcificado e descalcificado com ác. clorídrico (HCl) ou ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), associado ou não com medula óssea, enxertado em músculo abdominal de coelho, encontrou-se que o osso descalcificado com HCl e associado a medula óssea, foi o que melhor induziu a osteogênese (Nade e Burwell 1977). Embora o resultado tenha sido satisfatório, não foi tão positivo quanto os encontrados por Urist quando usou osso cortical descalcificado. Essa diferença entre o osso cortical e o esponjoso, como substrato indutor para osteogênese justificam futuras investigações sobre o assunto. A influência do tipo anatômico de osso, juntamente com o efeito do tamanho, área de superfície de contato, além da concentração de HCl e a temperatura ideal para descalcificação também necessitam ser melhor estudadas.

O uso de osso cortical desmineralizado na forma cilíndrica no preenchimento de falhas ósseas criadas em patas de ratos, mostrou após 12 semanas, que o espaço estava preenchido e apresentava as mesmas características físicas e

biomecânicas de um processo natural de consolidação de fraturas no mesmo estágio (Einhorn et alii, 1984).

Experiências realizadas com coelhos onde foram criadas falhas ósseas de aproximadamente 2cm na ulna desses animais, foram preenchidas com pó de osso desmineralizado (72 a 850 μm) mais proteína, e tiveram o controle preenchido com auto enxerto de ilíaco. Após 12 semanas os animais foram sacrificados. Os resultados da análise radiológica, histológica e mecânica mostraram que houve preenchimento de espaços e união das terminações da falha inicialmente criada, e quanto à resistência, a ulna normal apresentava-se mais forte do que a enxertada, porém os dois tipos de enxerto (autólogo e homólogo) apresentavam a mesma resistência, o que indica o enxerto homólogo como uma boa alternativa para substituir os autólogos clinicamente (Bolander e Balian 1986).

Uso de matriz óssea desmineralizada (partículas variando de 125 a 1000 μm) mais medula óssea, comparado com enxerto autólogo de osso esponjoso, mostrou um maior potencial indutor por parte da matriz óssea em relação ao auto enxerto com osso esponjoso após 4 semanas (Aspenberg et alii, 1987). Segundo Aspenberg, o osso esponjoso é melhor indutor em sítios não ósseos e o osso cortical intacto é inferior à matriz óssea desmineralizada como indutor da osteogênese.

O estudo do potencial indutor da matriz óssea desmineralizada (granulação 70 a 420 μm), demonstrou a superioridade desta em relação ao enxerto autólogo cortado em lascas, no preenchimento de falhas ósseas com mais de 50% do comprimento do osso (Gepstein et alii 1987).

Um estudo coparativo entre matriz óssea desmineralizada em pó (350-710 μm), osso íntegro na mesma granulação e hidroxiapatita foi feito por Volpon em 1980, onde ficou constatado ser a matriz óssea desmineralizada melhor indutora da osteogênese que os outros dois tipos de material usados no preenchimento de falhas ósseas de aproximadamente 2 cm criadas no osso rádio de coelhos.

A utilização de agentes físicos e químicos, que possam interferir aumentando ou abolindo o potencial indutor da matriz óssea desmineralizada, vem sendo pesquisada por vários autores. Wientroub e Reddi (1988) observaram que a matriz óssea submetida a diferentes doses de radiação (1 a 15 Mrad), quando

implantada em sub-cutâneo de ratos, mantinha o seu potencial indutor. Doses de 2,5 Mrad, que são normalmente utilizadas em esterilização em banco de ossos, não são deletéreas. Doses entre 3 e 5 Mrad, ao contrário, aumentam o potencial indutor da matriz óssea. Nenhuma das doses utilizadas eliminaram o potencial indutor, embora doses acima de 5 Mrad tenham diminuído esse potencial.

Yamamoto, usando matriz óssea desmineralizada em falhas óssea criadas em maxila de ratos, testaram a ação do campo eletromagnético pulsado como acelerador do potencial de indução óssea já constatado existir na matriz óssea. Observaram que a falha óssea preenchida com enxerto e submetida a ação do campo eletromagnético apresentava maior quantidade de osso na região do enxerto (preenchendo a falha), que a região não estimulada. Encontraram que o campo eletromagnético pulsado promove um aumento nas propriedades indutoras da matriz óssea (Yamamoto, et alli 1992).

2.1 GENERALIDADES SOBRE O TECIDO ÓSSEO

O osso é uma variedade de tecido conjuntivo altamente especializado, com uma estrutura colágena mineralizada responsável, entre outras funções, pela sustentação esquelética do corpo. Por ser um tecido especializado para suportar pressões, sucede à cartilagem tanto na ontogênese como na filogênese.

Os ossos diferem da cartilagem em sua estrutura em um ponto importantíssimo: sua substância intercelular pode ser impregnada intensamente por sais de cálcio, sem que suas células (que ficam situadas em lacunas), não fiquem privadas de nutrição.

Isso é possível porque o osso possui em sua estrutura interna uma rede de canaliculos que permitem a comunicação entre as células (osteócitos), enclausuradas nas lacunas e suas fontes de nutrição.

Outra diferença entre os ossos e a cartilagem está no fato do osso ser um tecido ricamente vascularizado e seu suprimento sanguíneo fazer-se mediante a existência de canaliculos contendo vasos.

O osso pode apresentar uma estrutura esponjosa ou compacta. A esponjosa consiste de uma rede de trabéculas dispostas em formas diversas (sempre

acompanhando as linhas de tensão do osso) preenchidas com medula óssea. O osso compacto consiste de uma massa óssea contínua contendo canais vasculares microscópicos interligados.

2.1.1 *ESTRUTURA DO OSSO*

Os ossos, quaisquer sejam suas formas, são compostos quase sempre por tecido compacto na periferia, e, por osso esponjoso e medula óssea no interior.

O osso esponjoso é composto por uma malha de trabéculas ósseas dispostas geralmente ao longo da linha de tensão máxima do osso e interligadas por lâminas regularmente distribuídas ao redor de canais ramificadores (canais de Havers) por onde circulam os vasos nutritivos. Esses canais se ramificam, comunicam com o exterior ou com a medula óssea, através de canais de Volkmann.

Sistema haversiano é o nome que se dá à unidade estrutural do osso, em homenagem a Clopton Havers, que foi quem tentou definir originalmente a estrutura do osso, em 1691. Havers não descreveu a lâmina concêntrica em redor dos vasos.

A unidade estrutural do osso, também chamada de ósteon é composta por lâminas distribuídas concêntricamente em redor dos canais de Havers. Esses canais são dirigidos segundo o eixo longitudinal do osso (figura 01).

Figure 1: Esquema tridimensional mostrando o aspecto em corte longitudinal e transversal dos vários componentes que entram na estrutura do córtex diafisário de um osso longo.

O osso compacto é composto por um grande número de sistemas haversianos, havendo entre eles lâminas intersticiais ou fundamentais que são remanescentes de sistemas haversianos que foram parcialmente reabsorvidos.

Apresenta ainda lâminas circunferenciais (de tecido conjuntivo) na sua face externa e interna por onde penetram os canais de Volkmann com vasos responsáveis por levar nutrientes até os canais de Havers.

Existem também as fibras de Sharpey (colágenas), que fixam o periósteeo à superfície óssea principalmente onde se inserem tendões, onde penetram os grandes vasos e na junção da epífise com a diáfise do osso (vasos epifisários).

O periósteeo, que consiste de tecido conjuntivo denso, contendo vasos sanguíneos, possui em sua camada mais interna células osteogênicas. Ele reveste externamente o osso, a exceção das superfícies articulares.

O endósteeo reveste internamente o osso nos espaços medulares e é composto de fina camada de tecido conjuntivo e também osteogênico.

2.1.2 COMPONENTES DO OSSO

PERIÓSTEEO:- é uma membrana que recobre o osso externamente; é equivalente ao pericôndrio da cartilagem; é formado por um tecido conjuntivo denso , muito fibroso em sua face interna.

As células do periósteeo que são morfológicamente fibroblastos, possuem a capacidade de transformarem-se rapidamente em osteoblastos e são muito importantes no crescimento ósseo em espessura e na reparação de fraturas,pela formação do “calo periostal”.

ENDÓSTEEO:- é semelhante ao periósteeo sendo muito mais delgado, não sendo possível identificar nele duas camadas como ocorre no periósteeo.

No tecido conjuntivo do periósteeo e endósteeo existem vasos sanguíneos que se ramificam e penetram nos ossos através de canais encontrados na matriz óssea.

Esses dois tecidos possuem duas funções importantíssimas, sendo uma a nutrição do tecido ósseo, pois são seus vasos que penetram através dos canais de Volkmann e a outra, servir como fonte de células osteogênicas (osteoblastos) para o crescimento em espessura e reparação dos ossos, em casos de fratura.

CÉLULAS OSTEOGÊNICAS:- aparecem na camada profunda do periósteeo em contato com a superfície óssea bem como no endósteeo. No periósteeo essas células se diferenciam em osteoblastos e são responsáveis pelo crescimento do osso em espessura. No endósteeo elas parecem se unir e se diferenciar em osteoclastos

sendo responsáveis pela reabsorção óssea. Essas células mantêm seu potencial de diferenciação (em condroblastos, osteoblastos e talvez osteoclastos) por toda a vida.

OSTEOBLASTOS:- são células que revestem a superfície do osso em crescimento, medem de 15 a 20 μm , possuem um único grande núcleo e um nucléolo. Essas células estão freqüentemente ligadas entre si por seus prolongamentos citoplasmáticos. Possuem um alto teor de retículo endoplasmático rugoso, que sintetiza a matriz intercelular orgânica (tropocolágeno). Essas células tornam-se mais evidentes quando envolvidas pela matriz recém sintetizada, e uma vez aprisionada no meio dela, passa a chamar-se “osteócito”.

OSTEÓCITOS:- são células achatadas em forma de amêndoas com prolongamentos citoplasmáticos que ocupam os canálculos responsáveis pela comunicação dessas células entre si e com os vasos que levam nutrientes à célula. Uma vez aprisionados nas lacunas, os osteócitos são essenciais para a manutenção da matriz mineralizada do osso e sua morte resulta em reabsorção da matriz.

OSTEOCLASTOS:- são células gigantes multinucleadas (6 a 50 núcleos) formadas provavelmente pela união de vários osteoblastos ou de células do estroma medular. Sua função é reabsorver tanto minerais como a substância intercelular. Geralmente os osteoclastos situam-se em depressões da matriz, as lacunas de Howship.

SUBSTÂNCIA INTERCELULAR:- é constituída pela matriz orgânica, sais inorgânicos e água. A matriz orgânica é constituída em sua maior parte (90%) por fibras colágenas e em pequena quantidade por substância fundamental amorfa, que contém mucopolissacarídeos ácidos e neutros associados a proteínas, uma das quais a conhecida como osteomucoide.

A parte inorgânica da matriz óssea representa 50% e é composta basicamente por cristais de hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)(\text{OH})_2$ que se apresentam em forma de agulha ou tabletes alongados medindo $40 \times 25 \times 3 \text{ nm}$. Esses cristais arranjam-se ao longo das fibras colágenas e são envolvidos pela substância fundamental amorfa.

Podem ainda aparecer ligados a hidroxiapatita, íons como Mg^+ , Na^+ , bicarbonatos, citratos e fluoretos.

Microscópicamente, o osso pode apresentar-se de duas formas:- 1- osso imaturo ou fibroso; 2- osso maduro ou lamelar.

1- Osso imaturo ou fibroso :- O osso é inicialmente formado no desenvolvimento embrionário, na consolidação de fraturas, ou que geralmente se forma em certos tipos de tumores ósseos. Este tipo de osso possui relativamente mais células, mais colágeno e menos substância cementante e mineral que o osso maduro.

2- osso maduro ou lamelar:- pode ser diferenciado do osso imaturo porque se cora menos intensamente e de modo uniforme, pela regularidade de suas lamelas e pelo fato de ser diversa a direção das fibrilas em lamelas adjacentes, pelo seu conteúdo relativamente maior de substância cementante e minerais , e por último, pelo seu menor número de células, as quais estão dispostas de modo regular em lacunas mais estreitas que a do osso imaturo.

O osso maduro substitui gradativamente o tecido ósseo imaturo no processo de ossificação e, no final, suas fibras colágenas aparecem organizadas em lamelas de 3 a 7 μm de espessura, que ficam paralelas umas às outras ou se dispõem em camadas concêntricas em torno de canais com vasos, formando os sistemas de Havers. Este sistema de Havers ou (ósteon como já foi citado anteriormente) é constituído por um cilindro longo, formado por 4 a 20 lamelas ósseas concêntricas. No centro existe um canal, o canal de Havers, que contém vasos e nervos. A comunicação dos canais de Havers com a cavidade medular e a superfície externa do osso é feita pelos canais de Volkmann.

2.1.3 HISTOGÊNESE DO OSSO

O processo de ossificação começa no período de vida embrionário ou pré natal e continua no período pós natal, até que o crescimento esteja completado. Este processo pode ocorrer de duas formas:- ossificação intramembranosa, que recebeu esse nome por surgir no interior de membranas de natureza conjuntiva, é responsável pela formação de ossos componentes da calota craniana, como o frontal, o parietal e partes do occipital, a escama do temporal e dos maxilares superior e parte do inferior.

A ossificação começa num local da membrana conjuntiva que recebe o nome de centro de ossificação primária. Nesse local, células semelhantes a

fibroblastos jovens se transformam em grupos de osteoblastos que sintetizam o osteóide, que logo se calcifica englobando alguns osteoblastos que passam a receber o nome de osteócitos.

Ossificação endocondral é aquela que se inicia sobre um modelo cartilaginoso, cuja forma é semelhante à do osso que irá se formar definitivamente, porém de tamanho menor e acontece segundo as seguintes etapas:

- células mesenquimatosas se diferenciam em condroblastos.
- os condroblastos proliferam e secretam uma substância intercelular.
- os então condrócitos amadurecem, secretam fosfatase alcalina e a matriz cartilaginosa se calcifica.
- a matriz calcificada dificulta a difusão de nutrientes, os condrocitos morrem e a matriz calcificada sofre desintegração e dissolução.
- proliferação de tecido altamente vascular e celular com os osteoblastos, envolvendo o remanescente da cartilagem calcificada e depositando osso novo.

Baseado nessa sequência de eventos, é que se forma o centro diafisário de ossificação, que irá se estender e substituir toda a diáfise do modelo cartilaginoso formado inicialmente.

Da mesma forma, logo depois se forma o centro epifisário de ossificação, que irá substituir a epífise. Entre a epífise e a diáfise permanece uma placa cartilaginosa de crescimento garantindo o crescimento longitudinal do osso. Quando esse crescimento se encerra, a placa é substituída por osso.

Tanto na ossificação intramembranosa como na endocondral, o primeiro tecido ósseo formado é o do tipo imaturo (ou primário). Este é pouco a pouco removido e substituído por tecido secundário ou lamelar.

Concomitantemente ao processo de ossificação ocorre também em algumas regiões do osso reabsorção óssea.

Portanto, durante o crescimento dos ossos é possível observar áreas de tecido primário, áreas de absorção e áreas de tecido secundário. Existe uma combinação de formação e remoção de tecido ósseo durante o crescimento do osso. Esse processo continua acontecendo no osso adulto, por necessidade metabólica do organismo, embora numa velocidade muito menor.

2.2 CONSOLIDAÇÃO DE FRATURAS

Numa fratura completa, além do rompimento do osso em fragmentos, ocorre também, quase sempre, rompimento de tecidos moles associados ao osso (periósteo, endósteo e vasos). Uma consequência imediata desse fato é a formação de um coágulo na região da fratura devido ao extravasamento de sangue.

Nas regiões adjacentes ao foco da fratura ocorre morte celular por falta de suprimento sanguíneo devido a hemorragia. Por isso, quando ocorre uma fratura, além da morte celular na região da lesão em consequência da ação direta do traumatismo, ocorre também morte celular a uma distância respeitável de cada lado da linha de fratura, em virtude da interrupção circulatória nos sistemas de Havers que cruzam a linha de fratura.

Ocorre morte também de tecido periosteal, embora numa extensão menor que a de tecido ósseo.

A distância da linha de fratura, atingida pela morte óssea, resultado da interrupção de suprimento sanguíneo, depende do local onde ocorre a fratura e do tipo de osso atingido.

Quarenta e oito horas após a fratura, já é possível notar a proliferação de células osteogênicas da camada mais profunda do periósteo, células do endósteo, da cavidade medular e células indiferenciadas da medula óssea.

A proliferação de células periosteais (camada osteogênica) nos dois fragmentos da fratura fazem com que a camada fibrosa do periósteo, que permanece relativamente inativa se afaste do osso nesse ponto (caracterizando o calo periosteal).

Durante a primeira semana após a fratura, as células do endósteo, que revestem a cavidade medular, e as trabéculas ósseas da cavidade, além das células indiferenciadas da medula óssea, começam a formar novas trabéculas na cavidade medular, próximo à linha de fratura podendo ligar um extremo a outro dos fragmentos (calo interno).

Em seguida, a proliferação de células osteogênicas das regiões periosteal e endosteal ocorre com tal rapidez que logo formam um colar distinto em torno de cada fragmento próximo à linha de fratura.

Nessa fase ocorre uma diferenciação no tipo de células que proliferam em função da presença ou não de vasos sanguíneos proliferando concomitantemente. Ou seja, nas camadas mais internas do periósteo, além da proliferação celular ocorre também a proliferação de vasos sanguíneos ali presentes, fazendo com que essas células se diferenciem em osteoblastos que formarão trabéculas, as quais irão se fixar à matriz óssea do fragmento (morto ou não).

Já as células osteogênicas que proliferam na camada mais superficial do colar, o fazem na ausência de capilares, que proliferam mais lentamente nessa região, e portanto irão se diferenciar em condroblastos e condrócitos, dando origem a tecido cartilaginoso nas porções mais externas do colar.

Os colares, quando completamente desenvolvidos apresentam 3 camadas. Na camada interna profunda, as trabéculas ósseas são firmemente cementadas ao osso. Na camada intermediária, a cartilagem funde-se imperceptivelmente com as partes externas das trabéculas ósseas recém formadas por baixo e em uma face externa, com as células proliferantes da camada profunda perióstica que constitui a terceira camada, a externa. Os colares dos dois fragmentos tornam-se mais espessos, avançam em direção um ao outro e se fundem sendo que as trabéculas, cartilagem e células proliferantes formam uma ponte. Assim é conseguida uma união inicial.

O calo interno formado pela proliferação vascular e de células do endósteo, que se diferenciam em osteoblastos e passam a formar novas trabéculas no canal medular, é a fonte principal de união entre os fragmentos (figura 02).

A cartilagem tem duração temporária no calo ósseo sendo substituída por tecido ósseo, seguindo os mesmos passos que acontecem na formação dos ossos embrionários como se fora uma ossificação endocondral.

Figure 2: desenhos mostrando colares periostais que se formam, aproximam-se um do outro e terminam por fundir-se, durante a consolidação de uma fratura.

2.3 PROPRIEDADES ELÉTRICAS DO OSSO

Os fenômenos elétricos constituem aspectos integrais, embora não exclusivos, de processos biológicos em todos os tecidos, inclusive o osso. As interações eletromecânicas são consideradas como regulando a proliferação, diferenciação e função celular (Basset 1971).

O tecido ósseo vivo, da mesma forma que outros sistemas tissulares biológicos, apresentam potenciais estáveis de repouso, registrados na faixa de microvolts (Friendenberg 1966).

Esses potenciais de repouso parecem provir, em parte, de potenciais de fluxo originados nos vasos sanguíneos (Basset 1971). Uma vez interrompido o fluxo arterial para o osso, observa-se uma queda significativa nesse potencial de repouso, enquanto a oclusão venosa produz um aumento.

Na metáfise existe um fluxo sanguíneo lento, pO_2 baixo, uma eletronegatividade e osteogênese ativa. A baixa tensão de O_2 contribui para a osteogênese.

Quando interrompe-se o suprimento sanguíneo para o osso, os potenciais ainda persistem por 30 minutos e só desaparecem quando ocorre morte das células ósseas, o que induz a pensar que esse potencial de repouso surge em parte das células ósseas.

Quando uma diáfise é fraturada, toda ela torna-se eletronegativa, em particular sobre o foco da fratura, e a eletronegatividade da metáfise torna-se maior. Quando da consolidação dessa fratura, as diferenças de potencial (DDP) voltam ao normal (Turek 1991).

2.3.1 PIEZOELETRICIDADE DO OSSO

A piezoeletricidade é definida como a propriedade exibida por certos materiais de desenvolverem potencial elétrico quando submetidos a aplicação de forças. Esse fenômeno é descrito para cristais que não possuem um centro de simetria. Foi observada a piezoeletricidade em diversas substâncias cristalinas, tanto inorgânicas como orgânicas, incluindo os componentes extra celulares do osso (Basset 1971), particularmente o colágeno (Fukada e Yasuda, 1964; Shamos e Lavine, 1967).

Podem-se observar tanto efeitos diretos (a compressão provoca uma polarização elétrica) como indiretos ou invertidos (o campo elétrico produz uma deformação) no colágeno.

2.3.2 POTENCIAIS GERADOS PELA PRESSÃO

Das diversas forças físicas que agem sobre uma célula óssea para induzir uma resposta osteogênica, a eletricidade foi a mais amplamente estudada. O osso mecanicamente deformado gera um potencial elétrico. As áreas de compressão (lado concavo num osso longo) tornam-se eletronegativas e as de tensão (convexo) tornam-se eletropositivas. No lado eletronegativo há um estímulo a formação óssea enquanto no lado eletropositivo, um estímulo a reabsorção óssea (Brighton et al, 1977). Esses potenciais gerados pela pressão originam-se entre outros fatores pela resposta piezoelétrica do osso, que provavelmente originam-se dentro das fibras colágenas.

Os dois constituintes orgânicos principais da matriz extracelular do osso, os biopolímeros macromoleculares (constituídos por unidades tropocológenas) do colágeno e polissacarídeos proteicos, possuem uma carga real (Athenstaedete 1970), sendo portanto afetados eletricamente.

Essas moléculas migram eletroforeticamente e assumem uma orientação preferida em um campo elétrico. É portanto concebível que potenciais gerados por pressão dirijam os padrões de agregação orientando as fibras de um modo que leve à mineralização.

O significado biológico importante da piezoeletricidade óssea é que ela faz parte dos fenomenos elétricos que regulam as atividades de células formadoras de osso (Turek 1991). Pode-se dizer que a deformação mecânica repetida, aliada a contrações musculares, promove um aumento das correntes elétricas pulsadas no osso, produzindo um aumento de massa óssea .

Duarte aliando o conhecimento da piezoeletricidade ao conhecimento da propagação de ondas mecânicas em materiais biológicos (ultra som), desenvolveu uma técnica de estimulação ultra sônica do calo ósseo visando acelerar a reparação de fraturas (Duarte 1977; 1983).

O método ultra-sônico, que não é invasivo, vem sendo usado clinicamente desde 1979, com sucesso na consolidação de fraturas com retardo ou pseudartroses, mostrando também resultados positivos na redução do tempo de consolidação de fraturas recentes (Pilla et alli 1991).

2.4 *ULTRA SOM*

O ultra som é uma forma de energia mecânica de alta frequência. Suas ondas se propagam provocando oscilações nas partículas do meio por onde passam.

As ondas ultra sônicas possuem uma frequência que variam em torno de 20.000 e 20.000.000 de ciclos por segundo (1 ciclo/segundo = 1 hertz).

O ouvido humano consegue captar frequências audíveis da ordem de 20 a 20.000 Hz, o que torna as frequências ultra sônicas imperceptíveis ao ouvido humano.

2.4.1 GERAÇÃO DE ONDAS ULTRA SÔNICAS

Langevin em 1917 foi quem originalmente produziu uma onda ultra sônica através de um cristal de quartzo vibrante, submetido a uma corrente de alta frequência.

Existem transdutores naturais, como o quartzo e a turmalina, mas hoje são usados cristais cerâmicos sintéticos, como o sulfato de lítio, fosfato dihidratado de amônia, titanato de bário, e o titanato zirconato de chumbo (PZT) este último o mais utilizado em terapia médica, por ser mais eficiente e durável.

Pode-se dizer que um transdutor é transmissor quando ele converte energia elétrica em vibração mecânica (onda acústica) e é receptor quando converte onda acústica em elétrica.

2.4.2 TIPOS DE ONDA ULTRA-SÔNICA

O tipo de onda ultra sônica mais comum é a longitudinal ou de compressão, onde a oscilação da partícula ocorre na mesma direção de propagação da onda. Ela ocorre em sólidos, líquidos e gases.

Existe o modo transversal de propagação de onda, ou de cisalhamento, que somente ocorre em sólidos, e a oscilação das partículas acontece perpendicularmente a propagação das ondas.

As ondas ultra sônicas podem ser ainda consideradas contínuas quando não há interrupção no sinal elétrico gerador da onda, ou pulsado quando há interrupção no sinal gerador.

2.4.3 PARÂMETROS FÍSICOS QUE FUNDAMENTAM A ONDA

COMPRIMENTO DE ONDA (λ) - mínima distância entre dois pontos nos quais as partículas se encontram em um mesmo estado de movimento.

AMPLITUDE (A) - máximo deslocamento que uma partícula experimenta a partir de sua posição de equilíbrio.

PERÍODO (T) - tempo para que uma partícula realize um ciclo completo de movimento.

FREQÜÊNCIA (f) - número de vezes que uma partícula realiza um ciclo oscilatório por unidade de tempo.

VELOCIDADE DE ONDA (c) - velocidade com que a perturbação move-se ao longo do meio.

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

INTENSIDADE ACÚSTICA (I) - energia (E) que atravessa uma área (S) em um intervalo de tempo (t).

ATENUAÇÃO - redução da intensidade de uma onda ultra sônica a medida em que a distância da fonte sonora aumenta. Essa atenuação é causada por espalhamento e absorção da onda pelo meio.

IMPEDANCIA ACÚSTICA (Z) -indica a propriedade que as ondas tem de se deslocarem mais facilmente em alguns meios que em outros. Pode ser descrita pela equação:

2.4.4 CARACTERÍSTICAS DO ULTRA SOM

ATENUAÇÃO - diminuição da intensidade e da amplitude que ocorre a medida que as ondas de U. S. se propagam através de um meio heterogêneo. As perdas de energia no meio ocorrem segundo dois mecanismos, absorção (conversão direta em calor) e espalhamento (redirecionamento da energia).

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

REFLEXÃO - quando o ultra som atravessa uma interface de um meio para outro e esses meios apresentam impedâncias diferentes, parte dessa onda será refletida e não atravessará para o segundo meio. A energia refletida é sempre menor que a incidente.

REFRAÇÃO - quando a onda ultra sônica atravessa de um tecido para outro meio com impedância acústica diferente, a onda incidente oblíqua sofre um

desvio angular na propagação através da interface, penetrando no segundo meio com um ângulo de propagação, diferente do incidente.

2.4.5 EFEITOS BIOLÓGICOS DO ULTRA-SOM

Os mecanismos físicos envolvidos na terapêutica por ultra som, que induzem respostas clinicamente significantes sobre as células, tecidos, órgãos e organismos, são classificados em térmicos e não térmicos (Dyson 1987):

EFEITOS TÉRMICOS: a onda ultra sônica pode produzir efeitos térmicos, ou seja, aumento de temperatura de tecidos por onde passa, a uma profundidade de até 5 cm ou mais. A quantidade de calor produzido irá depender da intensidade e da frequência do ultra som, da duração da exposição e do tipo de tecido exposto à irradiação.

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

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

As respostas fisiológicas atribuídas aos mecanismos térmicos incluem o aumento da extensibilidade do tecido colágeno, alterações no fluxo sanguíneo, mudanças na velocidade de condução nervosa, aumento no limiar da dor, aumento na atividade enzimática e mudanças na atividade contrátil do músculo. Com o aumento da temperatura nos tecidos, pode-se esperar também uma suave resposta inflamatória.

Para que esses efeitos ocorram, é necessário manter a temperatura dos tecidos num nível entre 40° e 45° C.

MECANISMOS NÃO TÉRMICOS: Alguns efeitos do ultra som não podem ser explicados por mecanismos térmicos. Esses efeitos não térmicos incluem a cavitação e o microfluxo acústico.

CAVITAÇÃO: é a formação de bolhas gasosas provocada pelo feixe ultra sônico. Mudanças de pressão local produzidas pelo ultra som, pode causar

expansão e compressão em pequenas bolhas gasosas que podem estar presentes no sangue ou em fluidos dos tecidos. Durante o período de rarefação as bolhas se expandem e durante o período de condensação as bolhas são comprimidas. Quando o campo ultra sônico for suficientemente intenso pode causar mudanças na atividade celular e lesões nos tecidos. Quando a movimentação no volume das bolhas não é muito intenso, tem-se uma cavitação estável, que pode provocar alteração na permeabilidade da membrana celular, alterando sua função. Quando a expansão sofrida pelas bolhas for muito intensa, elas podem colapsar resultando na destruição do tecido, alterações químicas na célula e lise celular. Esta é a cavitação instável ou transiente.

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

3 OBJETIVO

Pesquisas experimentais anteriores, demonstraram que o ultra-som pulsado e de baixa intensidade mostrou ser um recurso eficiente na aceleração do processo de ossificação, quer em falhas ósseas induzidas experimentalmente, quer em pseudartroses “in vivo”.

Esses fatos nos levaram a empreender a presente pesquisa, na qual pretendemos avaliar a ação do ultra-som pulsado na osteogênese de falhas ósseas induzidas experimentalmente (em coelhos) e preenchidas com pó de osso homólogo desmineralizado (matriz óssea desmineralizada).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 O EQUIPAMENTO DE ULTRA SOM

Foi utilizado no presente experimento um equipamento de ultra som de baixa intensidade, projetado e montado no laboratório de bioengenharia da Escola de Engenharia de São Carlos -USP. Os parametros físicos do aparelho foram os seguintes:

- forma de onda pulsada
- largura do pulso de 200 μ s
- frequência de repetição de 1,0 KHz
- frequência do PZT-4 de 1,5 MHz
- intensidade acústica (SATA) de 16mW/cm

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 bioengenharia, antes do início de cada grupo.

4.1.2 ANIMAL DE EXPERIMENTAÇÃO

No presente experimento, foram utilizados coelhos adultos, jovens, fêmeas, com peso médio variando entre 2 e 3 quilogramas, fornecido pelo biotério central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Foram utilizados 12 animais os quais após a cirurgia, ficaram confinados em gaiolas coletivas contendo 2 animais em cada uma. Durante o período experimental, esses animais foram alimentados com ração adequada e água a vontade.

4.1.2.1 OBSERVAÇÕES ANATÔMICAS

Foram escolhidos coelhos para a realização deste trabalho, porque esses animais apresentam algumas características anatômicas que facilitam o acesso

cirúrgico ao osso rádio para a realização da falha óssea e a posterior imobilização do membro operado.

Essas vantagens se dão pelo fato dos ossos do antebraço do coelho apresentarem uma disposição peculiar. O rádio ocupa uma posição anterior e está firmemente ligado à ulna em toda a extensão de sua diáfise por uma forte membrana conjuntiva interóssea. Nas extremidades proximal e distal os ossos do antebraço estão articulados mediante sinartroses, as quais, permitem apenas movimentos mínimos, além da existência de um forte aparelho ligamentar unindo os dois ossos pelas suas extremidades

Esses fatores possibilitam a realização de falhas ósseas no osso rádio que permanece imóvel, fixado à ulna íntegra, não sendo necessária a imobilização do antebraço do animal após a cirurgia.

Os ossos do antebraço do coelho apresentam uma curvatura diafisária de convexidade anterior, tornando-os em consequência, mais superficiais.

A musculatura extensora do membro anterior do coelho apresenta uma disposição em relação aos ossos, que permite um acesso fácil à diáfise do rádio apenas afastando-se o músculo extensor radial do carpo e o adutor longo do polegar.

4.1.3 REPARO DO OSSO GRANULADO

Para a preparação do pó de osso usado neste experimento, foram sacrificados 10 coelhos adultos da raça Nova Zelândia, dos quais, foram retirados os ossos fêmur, tíbia, úmero, rádio e ulna. Esses ossos foram limpos e tiveram suas epífises retiradas, sendo aproveitadas somente as diáfises.

Essas diáfises foram limpas minuciosamente para retirar-se toda a medula óssea, partes moles aderidas e perióstio. Após a limpeza, os ossos foram quebrados em pedaços menores com o auxílio de uma cisalha e para que os ossos pudessem ser armazenados, foram submetidos a desidratação.

À desidratação seguiu-se os seguintes passos: lavagem em água corrente por 2 horas; depois permanência em álcool etílico por 1 hora; e finalmente em éter etílico por mais 1/2 hora. Depois disso o material foi colocado em estufa a 37°C por no mínimo 12 horas (Reddi e Huggins 1972).

4.1.3.1 DESMINERALIZAÇÃO DO OSSO GRANULADO

Antes de serem desmineralizados os ossos foram triturados em liquidificador e peneirados em peneiras granulométricas a fim de se obter a granulação desejada, 297 μm a 590 μm . O pó de osso mais fino foi desprezado e o mais grosso triturado e peneirado novamente.

A desmineralização foi feita segundo Reddi e Huggins (1972) ou seja, em solução de HCl 0,5 N na proporção 25mEq de HCl 0,5 N/g. de osso; isto equivale a 50 ml HCl 0,5 N/ g. de osso.

A desmineralização seguiu os seguintes passos: o osso granulado foi mergulhado em solução de HCl 0,5N por 3 horas, seguido de lavagem em várias trocas de água por 2 horas; depois passagem em álcool etílico puro por 1 hora e em éter etílico por mais 1/2 hora. Finalmente o material foi colocado em estufa a 37°C por no mínimo 12 horas. Todos os passos da desmineralização foram realizados com o auxílio de um agitador magnético.

Foram obtidos ao final do processo 73,3gr de pó de osso na granulação 297 μm a 590 μm .

A fim de garantir a assepsia do material a ser implantado, o granulado ósseo a ser utilizado foi colocado em álcool etílico 70°, em temperatura ambiente.

No dia da cirurgia, o granulado ósseo foi lavado várias vezes em soro fisiológico estéril a fim de remover o álcool.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 ANESTESIA E PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Antes da anestesia os animais eram colocados e contidos em uma prancha de fixação onde era realizada a tricotomia dos membros anteriores, seguida da lavagem com solução antisséptica.

Com o animal ainda contido era realizada a anestesia, mediante a injeção intra muscular de uma mistura de Rompum^R e Ketalar^R nas doses indicadas no anexo 1 segundo o peso do animal.

Com o animal anestesiado, realizava-se uma nova assepsia a fim de garantir-se condições rigorosas de assepsia, antes da colocação dos campos cirúrgicos.

O lado esquerdo foi sempre operado em primeiro lugar, após garroteamento na região acima do cotovelo com tubo de latex, com o objetivo de se obter um campo exangue.

Após incisão longitudinal na face dorsal do antebraço, sobre o rádio, aproximadamente de 4cm interessando pele e aponeurose, os músculos extensor radial do carpo e abdutor longo do polegar eram afastados, o que possibilitava a visualização de quase toda a diáfise do rádio, procurando-se evitar a lesão de vasos calibros.

O periósteo sofreu igualmente incisão longitudinal e foi descolado do osso cuidadosamente, sendo afastado junto com a musculatura, para ser preservado.

Com a diáfise do rádio quase totalmente exposta, foram interpostas duas lâminas metálicas entre o rádio e a ulna, através da membrana interóssea para proteger a ulna e a musculatura afastada.

A osteotomia foi realizada perpendicularmente ao eixo longitudinal da diáfise do rádio, usando-se uma serra circular acoplada a um motor de baixa rotação.

Durante a realização da osteotomia, o local era constantemente banhado com soro fisiológico para se evitar o aquecimento da superfície óssea e consequentemente necrose térmica do tecido.

Foi obtida uma falha óssea de 8 mm de extensão, a qual após inspecionada, era lavada com soro fisiológico e preenchida com osso granulado desmineralizado úmido, até o preenchimento total do espaço da falha.

O periósteo era, na medida do possível, recolocado sobre a falha óssea já preenchida com osso granulado e, a seguir, a musculatura reaproximada, a aponeurose e a pele suturadas com fio de algodão com pontos separados.

^R nomes comerciais respectivamente de: cloridrato 2(2-6 xilideno) 5,6-dihidro-4H-1,3-tiazina e cloridrato de cefamina

Após a soltura do garrote, a incisão foi borrifada com rifamicina (rifocina spray).

Procedimento cirúrgico identico fora realizado no membro direito do mesmo animal.

4.2.2 ORGANIZAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram separados em 3 grupos experimentais, A, B e C em função do tempo de sacrificio após a cirurgia 15, 30 e 45 dias respectivamente.

Em todos os animais o lado esquerdo recebeu a estimulação com o ultra-som e o lado direito foi deixado como controle.

Todos os animais, nos primeiros 15 dias após a cirurgia, receberam o mesmo tratamento, ou seja, foram radiografados logo após a cirurgia e receberam estimulação ultra-sônica diária nos 15 dias subseqüentes à cirurgia.

A partir desse momento os grupos passaram a receber tratamentos diferentes.

O grupo A₁₅: nesse grupo, os 4 animais tiveram seus membros radiografados no 16º dia após a cirurgia e foram sacrificados.

O grupo B₃₀: nesse grupo os 4 animais tiveram seus membros radiografados no 16º dia após a cirurgia e foram mantidos vivos por mais 14 dias, sem receber estimulação de ultra-som; quando no 30º dia após a cirurgia foram novamente radiografados e então sacrificados.

O grupo C₄₅: nesse grupo os animais tiveram o mesmo tratamento do grupo B₃₀ exceto que no 30º dia após a cirurgia tiveram seus membros radiografados e foram mantidos vivos por mais 15 dias. Só então no 45º dia após a cirurgia esse grupo foi novamente radiografado e posteriormente sacrificado.

Todo esse procedimento pode ser melhor observado no esquema:

4.2.3 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO

4.2.3.1 AVALIAÇÃO RADIOLÓGICA

Todos os animais tiveram seus antebraços radiografados logo após a cirurgia (equipamento de RX Spectro II Dabi-Atlante uso odontológico). Depois disso, a cada 15 dias os animais foram novamente radiografados e de acordo com o grupo a que pertenciam, ou foram sacrificados, ou foram mantidos vivos para seqüência do estudo, até o período de 45 dias após a cirurgia, quando o último grupo fora radiografado e posteriormente sacrificado.

Os animais do grupo A₁₅ foram sacrificados logo após a radiografia aos 15 dias de pós operatório, os animais do grupo B₃₀ foram sacrificados após 30 dias de pós operatório e os animais C₄₅ foram sacrificados após 45 dias de pós operatório.

4.2.3.2 PREPARO DO MATERIAL PARA EXAME HISTOLÓGICO

A cada 15 dias 4 animais foram sacrificados (mediante inalação excessiva de éter) e seus antebraços foram desarticulados e separados nas alturas de seus cotovelos e punhos.

Os ossos do antebraço foram retirados cuidadosamente e liberados de quaisquer estruturas moles (músculos, periósteo e inserções de tendões). Os ossos limpos foram colocados em solução fixadora de Bouin. Após a fixação o fragmento ósseo, contendo a falha óssea preenchida com matriz óssea desmineralizada, fora submetido a um processo de descalcificação em solução de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). Após a descalcificação, as peças foram desidratadas e submetidas ao preparo adequado para inclusão em parafina. As peças devidamente emblocadas sofreram cortes de 6µm de espessura e foram coradas por Hemalumen, eosina (H E) e tricrômico de Masson, para a análise à microscopia óptica e à luz polarizada sob prisma de quartzo.

5 RESULTADOS

5.1 OBSERVAÇÕES GERAIS PÓS OPERATÓRIAS

Todos os animais suportaram bem o retorno da anestesia após a intervenção cirúrgica.

A recuperação nos dias que se seguiram à cirurgia foi boa. Os animais no segundo dia já apoiavam normalmente os membros anteriores e movimentavam-se normalmente nas gaiolas. Houve entre todos os animais operados apenas um caso de infecção na região operada, em um dos coelhos que acabou indo a óbito. Todos os animais restantes evoluíram bem, com uma boa cicatrização da incisão cirúrgica. Não foi necessário a retirada dos pontos pois os próprios animais se encarregaram de fazê-lo com os dentes.

Os estudos radiológico e morfológico serão descritos a seguir, conforme a evolução do processo de osteogênese no rádio esquerdo, que foi o estimulado com o ultra som pulsado de baixa intensidade, em comparação com o rádio direito que sofreu o mesmo processo de enxertia mas não foi estimulado pelo ultra som.

5.2 ESTUDO RADIOLÓGICO PÓS-OPERATÓRIO

As radiografias, realizadas imediatamente após a cirurgia, mostraram que as osteotomias estavam bem localizadas e apresentavam o tamanho desejado.

O aspecto radiológico do pós-operatório imediato das falhas em ambas patas era de transparência total, uma vez que foi usado osso granulado desmineralizado no preenchimento das mesmas .

Nas radiografias executadas após 15 dias em todos os animais que receberam a estimulação ultra sônica no membro esquerdo E (estimulado) e tendo o antebraço direito (C) mantido como controle (sem estímulo), foi possível observar a presença de tênues formações radiodensas espalhadas pela falha óssea, com maior concentração nas áreas próximas aos extremos da falha óssea e menos concentradas na área mais central da falha (Figura 03).

Figure 3:- Foto mostrando com 15 dias de pós-operatório. O lado estimulado apresenta uma maior formação radiodensa quando comparado com o lado controle.

Em alguns animais foi possível também constatar-se nas radiografias realizadas no 15º dia, um aumento na formação radiodensa no lado estimulado (E) pelo ultra som em comparação ao não estimulado (C). Embora esse fato não tenha sido constatado em todos os animais (12 ao todo) podemos dizer, pela aparência radiológica, que a estimulação ultra-sônica parece ter acelerado o processo osteogênico já nesse período.

Em 8 animais, nos quais os RX foram realizados no 30º dia de pós-operatório, (a estimulação por ultra-som fora interrompida no 15º dia), as radiografias apresentaram imagem radiodensa mais acentuada em relação ao período anterior, ocupando a falha óssea praticamente em toda sua extensão. Apesar de basicamente estar preenchida a falha óssea, seu aspecto radiológico ainda não se assemelhava ao do osso maduro e sim ao de um calo ósseo neo-formado (Fig. 04).

Figure 4:- Foto mostrando 30 dias de pós-operatório. Observar a falha óssea totalmente preenchida e o lado estimulado indicando calo ósseo neo formado em estágio mais adiantado que o lado controle.

No último lote de 4 animais, radiografados aos 45 dias de pós-operatório, foi possível observar além do preenchimento total da falha óssea, uma organização maior do tecido ósseo neo-formado, já mostrando, na maioria das radiografias analisadas, a presença de osso cortical e uma reabsorção do calo ósseo, que já aparecera na fase anterior (30º dia de pós operatório) mostrando uma reorganização do osso neo formado (FIG. 05).

Os resultados da análise radiológica são condizentes com uma progressiva evolução da imagem radiodensa e uma organização do osso ao nível da falha óssea, mais evidente do lado estimulado.

Figure 5:- Fotos do seguimento radiológico dos animais sacrificados com 45 dias. Observar a presença de osso cortical e reabsorção do calo ósseo.

5.3 ACHADOS HISTOLÓGICOS

Nos animais sacrificados com 15 dias de pós-operatório, a análise histológica mostrou a presença de numerosos osteoblastos margeando trabéculas ósseas em vias de ossificação, áreas de tecido cartilaginoso, com a presença de osso neo formado na seqüência, indicando o tipo de ossificação semelhante à endocondral (Figura 06). Pode-se observar ainda a presença de células multinucleadas (osteoclastos) sugerindo a presença de um processo de reorganização óssea (figura 06 seta negra). Na análise microscópica sob luz polarizada e prisma de quartzo, foi possível observar uma orientação das fibras colágenas em dois sentidos, verificando-se uma tendência de organização dessas fibras (Figura 06).

O material histológico do lado controle (C) dos animais sacrificados com 15 dias, infelizmente se perdeu durante o processo de preparação, não tendo sido possível reproduzir fotos desse material.

Os animais sacrificados com 30 dias de pós-operatório, já apresentavam imagem radiodensa na falha óssea como fora observado radiologicamente. Na análise histológica dos lados que foram estimuladas com o ultra-som, pode-se observar a presença de osteócitos já aprisionados na matriz óssea (Figura 07); pode-se observar ainda, a presença de áreas em processo de ossificação com o conjuntivo evoluindo para cartilagem e posteriormente tecido ósseo neo formado (Figura 08).

Em contra partida, ao analisar o material histológico obtido dos rádios que foram utilizadas como controle no experimento, ou seja, que não receberam a estimulação por ultra som, pode-se observar a presença apenas de cartilagem na zona de transição da falha óssea (Figura 08). Observa-se a presença maciça de tecido cartilaginoso em detrimento de células de tecido ósseo neo formado sugerindo um estágio de formação óssea menos evoluído que aquele encontrado nos rádios estimulados com ultra-som.

Na análise sob luz polarizada e prisma de quartzo, pode-se observar o início da organização do colágeno através dos sentidos das fibras anisotrópicas.

Analisando histologicamente o material dos animais sacrificados 45 dias após a cirurgia, foi possível constatar a evolução do osso recém formado nos lados

estimulados com ultra som, em relação aos considerados como controle. Observa-se nas fotos coradas por tricrômico de Masson uma maior organização do tecido ósseo neo formado, enquanto nos ossos controle ainda é possível observar-se a presença de tecido fibroso evoluindo para cartilagem (Fig. 09).

Nas fotos de cortes corados pelo hemalum e eosina verifica-se maior número de células osteoblásticas no lado estimulado, enquanto no lado controle o número dessas células é bem menor (Fig. 10).

Figure 6:- Fotomicrografias de regiões da falha óssea dos animais sacrificados com quinze dias de pós-operatório. Observar a presença de células multinucleadas (osteoclastos seta negra), o que indica uma reorganização de tecido ósseo neo formado. Fotos com * foram coradas com Hemalumen e Eosina (H.E.). Foto com ★ foi analisada sob luz polarizada e prisma de quartzo. 37

E15*

E15*

E15*

E15*

Figure 7:- Fotomicrografias do osso rádio dos animais sacrificados com 30 dias de P.O. . Observar na foto de lâminas analisadas sob luz polarizada feita do material controle de 30 dias, um grau de organização das fibras colágenas menor em relação a foto mostrada na figura 6. Fotos com ★ .Na foto corada com Tricrômico de Masson (foto em azul com seta sinalizando um osteócito). 38

Figure 8:- Foto micrografia do osso rádio dos animais sacrificados com 30 dias. Observar na foto de material corado por Tricrômico de Masson a presença de osteócitos aprisionados na matriz óssea em formação. Observar também a presença de material cartilaginoso em grande quantidade na foto feita do material controle comparado ao estimulado que contém maior número de osteócitos (fotos coradas com H.E. marcadas com *).39

E30*

E30

C30*

C30

Figure 9:- Fotomicrografias de regiões da falha óssea de animais sacrificados com 45 dias de P. O . Observar o material corado por Tricrômico de Masson (fotos com fundo em azul) uma maior organização do tecido ósseo neo formado no lado estimulado em relação ao controle. Nas fotos de material corado com H.E. é maior a presença de células osteoblásticas no lado estimulado que no controle.

..... 40

Figure 10:- Fotomicrografias de regiões da falha óssea de animais sacrificados com 45 dias de P. O. .Observar o maior número de osteócitos na foto corada por Tricrômico de Masson no lado estimulado em relação ao controle. 41

6 DISCUSSÃO

Para a realização deste trabalho foi escolhido o coelho como animal de experimentação porque fora o animal que melhor preencheu os requisitos básicos para a atividade proposta. Na literatura, a maioria dos trabalhos pesquisados e que tinham interesse em reparação de fraturas de ossos longos com perda de substância, tinham o coelho como animal de experimentação escolhido.

Além do coelho ser um animal de fácil aquisição em condições de saúde ideal para realização de trabalhos científicos, é possível também uma melhor padronização de raça, sexo, peso e faixa etária.

A anatomia do antebraço do coelho apresenta algumas características importantes que facilitam esse tipo de cirurgia. Por exemplo, a diáfise é cilíndrica e se apresenta bem superficialmente na sua face anterior, o que facilita o acesso cirúrgico. A disposição anatômica da musculatura do antebraço também permite um acesso ao osso rádio apenas através do afastamento da mesma, não sendo necessário a realização de lesões nos músculos. A região também permite que se desvie de vasos e nervos mais importantes. Além de todos esses fatores, a presença de uma forte membrana interóssea unindo o rádio e a ulna fazendo com que esta funcionasse fixando o rádio, não permitindo que o mesmo se movimentasse, dispensando assim o uso de fixadores ósseos.

A escolha do osso para enxerto na forma de grânulos deveu-se à existência de vários trabalhos publicados sobre o assunto, mostrando ser o osso granulado melhor indutor que o osso inteiro ou fragmentado em pedaços maiores, pois apresenta maior área de superfície de contato, o que estimula a osteoindução. A dimensão dos grânulos também foi escolhida segundo as respostas indutoras relatadas na literatura. (Reddi e Huggins 1972; Urbinati 1978; Volpon 1980; Glowacki 1981). Acredita-se que a proteína morfogênica contida nas moléculas de colágeno da matriz óssea desmineralizada, interaja com células precursoras das células osteogênicas indiferenciadas do hospedeiro e cause nelas a diferenciação em células osteogênicas funcionalmente ativas.

A desmineralização do osso foi realizada segundo Reddi e Huggins (1972) que conseguiram bons resultados com a técnica por eles proposta. Trabalhos posteriores (Nade e Brurwell 1977) mostraram que o HCl é um dos melhores ácidos utilizados na desmineralização do osso, sem prejuízo do seu potencial indutor.

Sabendo-se do potencial da matriz óssea desmineralizada em induzir a osteogênese, sendo por isso o melhor substituto provável para o enxerto autólogo; conhecendo-se o fenômeno da piezoelectricidade do osso, que é capaz de gerar um campo elétrico decorrente de um estímulo mecânico e sabendo-se que essa propriedade da piezoelectricidade se encontra nas moléculas de tropocolágeno (parte orgânica do osso) como foi demonstrado por Fukada e Yasuda (1964), torna-se bastante pertinente pesquisar também a ação do ultra-som sobre a capacidade indutora da matriz óssea desmineralizada. Esta matriz quando colocada em sítios de fratura, apresentava um grande potencial indutor da osteogênese, já comprovado por vários autores (Ray e Holloway 1957; Urist 1967; Huggins et al 1970; Reddi e Huggins 1972; Reddi 1974; Urbinati 1978; Volpon 1980; Glowacki 1981).

Em vista desses fatos, a proposta deste trabalho fora analisar a ação do ultra som pulsado de baixa intensidade que demonstrou, através de vários trabalhos, ser um excelente fator de aceleração na consolidação de fraturas, principalmente nos casos em que o reparo normal não ocorre de uma maneira fisiológica adequada (pseudartroses) . (Dyson et al 1968; Duarte 1977; Colombo 1992).

Os parâmetros físicos do ultra-som utilizados neste trabalho foram otimizados através de pesquisas realizadas por Riolo (1985) que verificou que a melhor frequência para acelerar o processo de consolidação de fraturas era de 1000 pulsos por segundo (1kHz). Já a largura do pulso de 200 micro segundos, foi sugerida como ideal nesses casos por Ortega (1986) em seu trabalho, quando analisou diversas variações na largura do pulso.

O que se pode constatar neste trabalho foi inicialmente uma confirmação dos achados de Volpon (1980), que conseguiu através do uso de matriz óssea desmineralizada induzir a formação de osso no preenchimento de falhas ósseas criadas no osso rádio de coelhos. Ele observou ser a matriz óssea desmineralizada melhor indutora que o osso completo e a hidroxiapatita, quando conseguiu ao final de 9

semanas ter as falhas ósseas totalmente preenchidas por osso neo formado em alguns casos inclusive com a formação de canal medular.

No presente trabalho, conseguiu-se obter osso neo formado em todas as falhas ósseas inicialmente preenchidas com matriz óssea desmineralizada. Infelizmente, não foi possível constatar através de análise histológica, a organização desse osso e a presença de canal medular em formação no final do período de experimentação. O que se pode constatar foi uma aceleração no processo osteogênico, em relação ao conseguido por Volpon no mesmo período e o obtido no grupo controle, fato esse que pode ser atribuído à ação do ultra-som.

Foi possível observar com 30 dias que a falha óssea que recebeu a estimulação com o ultra som de baixa intensidade (nos 15 primeiros dias de pós operatório), apresentava-se totalmente preenchida com osso neo formado, enquanto o mesmo padrão de preenchimento só foi possível observar na falha óssea que não recebeu a estimulação, aos 45 dias de pós operatório.

Esses resultados demonstraram que o ultra-som de baixa intensidade, que já demonstrou sua ação como acelerador na consolidação de fraturas e pseudartroses (Duarte 1977), pode também interferir positivamente no processo de indução da osteogênese em falhas ósseas preenchidas com matriz óssea desmineralizada.

7 CONCLUSÃO

Os achados deste trabalho portanto se coadunam com as seguintes hipóteses:

- o ultra som utilizado neste trabalho, mostrou-se eficiente na indução de “osso novo” em falhas ósseas preenchidas previamente com “matriz óssea desmineralizada” (avaliada radiológica e histologicamente).
- essa indução mostrou-se mais “avançada” no tempo, em relação à mostrada em casos nos quais não fora utilizado o ultra-som.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASPENBERG, P ; WITTBGER, J ; THORNGREN, KG Bone matrix and marrow versus cancellous bone. **Arch Orthop Surg**, v.106, n.6, p. 335-340, 1987.

AN, HS; SIMPSON, JM; GLOVER, JM; STEPHANY, J. Comparision betweeb allograft plus demineralized bone matrix versus autograft in anterior cervical fusion: a prospective multicenter study. **Spine**, v.20, n.20, Oct., p. 2211-6, 1995

ATHENSTAEDT, H. Permanent Longitudinal Eletric Polarization and Piezoeletric Behavior of Colagenous Structures and Nervous Tissue in Man and Other Vertebrates. London, **Nature**, v. 28, n. 228, p. 830-834, Nov., 1970.

BASSET, 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.

BOLANDER, ME ; BALIAN, G The use of demineralized bone matrix in the repair of segmental defects. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v.68, n.8, p.1264-1274,

BRIGHTON ,C.T. et alli. Treatment of non- union with constant direct current .**Clin. Orthop.** 124:106, 1977.

COLOMBO, SJ de M Efeitos da intensidade acústica na consolidação ultra-sônica de fraturas experimentais. **Dissertação de Mestrado**. São Carlos, EESC/FMRP/IQSC-USP, 1992. 57p. (Área de Bioengenharia).

DUARTE, ACG de O Estudo experimental dos efeitos da estimulação ultra-sônica de baixa intensidade na consolidação óssea em ratos submetidos ao diabetes. **Dissertação de Mestrado**. São Carlos, EESC/FMRP/IQSC-USP, 1996. 64p. (Área de Bioengenharia).

DUARTE, L. R. Estimulação Ultra-sônica do calo ósseo. São Carlos, 1977, 109p. **Tese de Livre Docência**- Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

DYSON, M. Mechanisms Involved in Therapeutic Ultrasound. London, **Physioterapy**, v. 73,n.3,p116-120,Mar,1987.

- DYSON, M ; POND, JB ; JOSEPH, J ; WARWICK, R. The stimulation of tissue regeneration by means of ultrasound. **Clin. Sci.**, v. 35, p. 273-85, 1968.
- EINHORN, TA ; LANE, JM ; BURSTEIN, AH ; KOPMAN, CR ; VIGORITA, VJ
The healing of segmental bone defects induced by demineralized bone matrix.
The Journal of Bone and Joint Surgery, v.66-A, n.2, February, p. 274-279, 1984.
- FRIENDBERG, Z.B. and BRIGHTON, C.T. . Bioelectric potentials in bone. **J. Bone Joint Surg.** 48A:915, 1966.
- FUIRINI JR, N; LONGO, G.J. **Ultrason.** Amparo-São Paulo, KLD-BIOSISTEMAS EQUIPAMENTOS ELETRÔNICOS, 1996. 51P.
- .FUKADA, E. and YASUDA, I. Piezoelectric effect in collagen **Japanese journal of Applied Physics**, 3 (2) Feb, 1964.
- GEBHART, M; LANE, J A radiographical and biomechanical study of demineralized bone matrix implanted into a bone defect of rat femurs with and without bone marrow. **Acta Orthopaedica Belgica**, v. 57, n.2, p. 130-43, 1991
- GEPSTEIN, R.; WEISS, RE ; SABA, K; HALELL, T. Bridging large defects in bone by demineralized bone matrix in the form of a powder. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v.7, n. 69, Set, p. 984-92, 1987.
- GLOWACKI, J ; KABAN, LB ; SONIS, ST ; ROSENTHAL ; MULLIKEN, JB
Physiological aspects of bone repair using demineralized bone. In: HUNT, TK ; HEPPENSTALL, RB ; ROVEE, D **Soft and Hard Tissue Repair: biological and clinical aspects.** New York, Praeger, 1984. P.265-80.
- GUIRRO, EC de O Efeitos da estimulação ultra-sônica pulsada de baixa intensidade no processo cicatricial Estudo experimental em ratos. **Dissertação de Mestrado.** São Carlos, EESC/FMRP/IQSC-USP, 1993. 69p. (Área de Bioengenharia).
- GUIRRO, R de J O uso da hidroxiapatita associada a estimulação ultra-sônica pulsada de baixa intensidade na correção de falha óssea. Estudo experimental em coelhos. **Dissertação de Mestrado.** São Carlos, EESC/FMRP/IQSC-USP, 1995 (Área de Bioengenharia)
- HAM, A.W. et alli. **Histologia**, 7º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1977, cap. 15 p. 318-376.
- HOPP, SG; DAHNERS, LE; GILBERT, JÁ A study of mechanical strength of long bone defects treated with various bone autograft substitutes: na experimental

investigation in the rabbit. **Journal of Orthopaedic Research**, v.7, n.4, p.579-84, 1989.

JERGENSEN, HE.; CHUA, J.; KAO, RT, KABAN, L B. Age effects on bone induction by demineralized bone powder. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 268, Jul., p. 253-9, 1991.

KOHAVI, D. ; SCHWARTZ, Z ; AMIR, D. ; MAI, CM ; GROSS, U. ; SELA, J. Effect of titanium implants on primary mineralization following 6 and 14 days of rat tibial healing. **Biomaterials**, v. 13, n.4, p. 255-260, 1992.

LINDEN, GJ Bone induction in implants of descalcified bone and dentine. **J. Anat.**, v. 119, n.2, p. 359-367, 1975.

NADE, S ; BURWELL, RG Decalcified bone as a substrate for osteogenesis. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 59-B, n.2, May, p. 189-196, 1997

ORTEGA, JM Efeito do ultra-som no reparo de falha óssea experimental. Avaliação quantitativa e morfológica do parâmetro largura de pulso. **Dissertação de Mestrado**. São Carlos ,EESC/FMRP/IQSC-USP, 1986. 58p. (Área de Bioengenharia).

OKUNO, E ; CALDAS, IL ; CHOW, C **Física para ciências biológicas e biomédicas**. São Paulo, HARBRA, 1986. 490.

PIATTELLI, A.; SCARANO, M.; CORIGLIANO, M.; PIATTELLI, M. Comparision of bone regeneration with the use of mineralized and demineralized freeze-dried bone allografts: a histological and histochemical study in man. **Biomaterials**, v.17, n.11, p. 1127-31, 1996.

PIRES, MA Efeitos do ultra-som de baixa intensidade sobre o processo inflamatório crônico induzido experimentalmente em ratos. **Dissertação de Mestrado** São Carlos, EESC/FMRP/IQSC-USP, 1994. 68p. (Área de Bioengenharia).

RAY, RD ; HOLLOWAY, JA Bone implants. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 39-A, n.5, October, p. 1119-1128, 1957.

REDDI, AH ; HUGGINS, CB Biochemical squences in the transformation of normal fibroblasts in adolescent rats. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v.69,n.6, p.1601-11605, 1972.

Cyclic electrochemical inactivation and restoration of competence of bone matrix to transform fibroblasts. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v. 71, n.5, p. 1648-1652, 1974.

SCHWEIBERER, L; STÜTZLE; MANDELKOW, HK Bone transplantation. **Arch Orthop. Trauma Surg**, v. 109, n.1, p.1-8, 1990.

- SHAMOS, M.H.; LAVINE, L.S.. Piezoelectricity as a Fundamental Property of Biological Tissues. **Nature**, v.213, p.267-269, 1967.
- TAKANO-YAMAMOTO, T.; KAWAKAMI, M.; SAKUDA, M. Effect of a pulsing electromagnetic field on demineralized bone-matrix-induced bone formation in a bony defect in the premaxilla rats. **Journal of Dental Reserch**, v.71, n.12, p.1920-5, 1992.
- TUREK, SI L.,v.268, **Ortopedia: princípios & sua aplicação**. São Paulo, Manole, 1991. V.I, cap. 3, seção I e II, cap. 6, seção II, cap. 8.
- URBINATI, EC **Condrogênese e osteogênese: indução por pó de osso descalcificado. Dissertação de Mestrado** Ribeirão Preto, Faculdade de Medicina de Rib. Preto-USP, 44p., 1978.
- URIST, MR ; SILVERMAN, BF ; BÜRING, K; DUBUC, FL ; ROSENBERG, BS The bone induction principle. **Clinical Orthopaedic and Related Research**, n.53, Jul-August, p. 243-283, 1967.
- VOLPON, JB A matriz de osso cortical homólogo granulado descalcificado na correção de falha óssea diafisária. Estudo experimental em coelhos. **Tese de Doutorado** Ribeirão Preto, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, 1980. 71p. Área Ortopedia e Traumatologia.
- WIENTROUB, S; REDDI, AH Influence of irradiation on the osteoinductive potential of demineralized bone matrix. **Calcified Tissue International**, v.42, , n.9, p.255-60, 1988.
- YAMASHITA, K ; TAKAGI, T. Ultrastructural observation of calcification preceding new bone formation induced by demineralized bone matrix gelatin. **Acta Anat** , v.143, p. 261-267, 1992.
- YANG, Chyun-Yu; SIMMONS, DJ; LOZANO, R The healing of grafics combining freze-dried and demineralized allogeneic bone in rabbits. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 298, Jan., p. 286-95, 1994.