ESTUDO EXPERIMENTAL DOS EFEITOS DA
ESTIMULAÇÃO ULTRA-SÔNICA DE BAIXA
INTENSIDADE NA CONSOLIDAÇÃO ÓSSEA EM
RATOS SUBMETIDOS AO DIABETES
ALOXÂNICO

Ana Cláudia Garcia de Oliveira Duarte

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**

**ESTUDO EXPERIMENTAL DOS EFEITOS DA ESTIMULAÇÃO ULTRA-
SÔNICA DE BAIXA INTENSIDADE NA CONSOLIDAÇÃO ÓSSEA EM
RATOS SUBMETIDOS AO DIABETES ALOXÂNICO**

DEDALUS - Acervo - EESC

31100036775

ANA CLÁUDIA GARCIA DE OLIVEIRA DUARTE

**SÃO CARLOS
1996**

Class.	TESE - EESC
Cutt.	1954
Tombo	T0215/971

st 120 3834

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

D812e Duarte, Ana Claudia Garcia de Oliveira
Estudo experimental dos efeitos da estimulação
ultrasônica de baixa intensidade na consolidação óssea
em ratos submetidos ao diabetes aloxânico / Ana Claudia
Garcia de Oliveira Duarte. -- São Carlos, 1996.

Dissertação (Mestrado) -- Escola de Engenharia de
São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-
Universidade de São Paulo, 1996.

Orientador: Prof. Dr Affonso Luiz Ferreira

1. Consolidação óssea. 2. Diabetes. I. Título

data defesa 22.08.96

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

**ESTUDO EXPERIMENTAL DOS EFEITOS DA ESTIMULAÇÃO ULTRA-
SÔNICA DE BAIXA INTENSIDADE NA CONSOLIDAÇÃO ÓSSEA EM
RATOS SUBMETIDOS AO DIABETES ALOXÂNICO**

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

Orientador : Prof. Dr. Affonso Luiz Ferreira

ANA CLÁUDIA GARCIA DE OLIVEIRA DUARTE

SÃO CARLOS

1996

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, LAYER e MARIA IGNEZ, por minha formação e pelo estímulo que sempre dispensaram à minha realização profissional,

Ao MARCELLO, à BRUNA e ao IAGO, meu marido e meus filhos, que comigo compartilharam intensamente os dias e horas vividos , constituindo-se em toda minha motivação.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Affonso Luiz Ferreira**, pela orientação, carinho e ensinamentos transmitidos.

Ao **Prof. Dr. Luiz Romariz Duarte**, pelo apoio, incentivo e ensinamentos transmitidos.

Ao professor **José Marcos Alves**, do Laboratório de Bioengenharia EESC-USP, pela ajuda e amizade demonstradas no dia a dia.

Aos funcionários **Luiz Paulo, Mário e Marielza** do Laboratório de Bioengenharia, pela dedicação demonstrada.

Ao funcionário **Silvano** do Departamento de Materiais da EESC-USP, pelo auxílio na instrumentação utilizada.

Ao Departamento de Fisiologia e **funcionários** do Biotério da Universidade Federal de São Carlos, pelo fornecimento dos animais utilizados neste trabalho.

Aos demais colegas do Curso de Pós-Graduação em Bioengenharia.

A **Coordenadoria de Apoio de Pessoal de Ensino Superior (CAPES)**, pela bolsa concedida para a realização deste trabalho.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao **Nelson Ferreira da Silva Júnior**, técnico do Laboratório de Bioengenharia, que mais do que um colaborador, foi um verdadeiro amigo e contribuiu definitivamente para a realização deste trabalho, meus mais sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1.INTRODUÇÃO	01
1.1 - Objetivo.....	01
2. REVISÃO DA LITERATURA	03
2.1. O ultra-som.....	03
2.2. Características das Ondas ultra-sônicas.....	05
2.3. Efeitos biológicos da ação do ultra-som.....	07
2.3.1. Mecanismo térmico.....	08
2.3.2. Mecanismos não-térmicos.....	08
2.3.2.1. Mecanismo cavitacional.....	08
2.3.2.2. Microfluxo acústico.....	09
2.3.2.3. Mecanismo piezoelétrico.....	09
2.4. Considerações morfo-histológicas do osso.....	10
2.4.1. Tecido ósseo - histologia básica.....	10
2.4.2. Propriedades mecânicas do osso.....	14
2.4.3. Piezoeletricidade óssea.....	15
2.5. Fases da consolidação óssea.....	16
2.5 1. Histogênese Óssea.....	16
2.5.2. Crescimento e remodelagem óssea.....	17
2.5 3. Reparação de fraturas.....	19
2.6. Diabetes Melito.....	20
2.6.1. Classificação.....	22
2.6.2. Ação da insulina.....	23
2.6.3. Diabetes aloxânico.....	23
2.6 4. Diabetes e consolidação óssea.....	26
3.0. MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1. Descrição do procedimento experimental.....	30
3.2. Equipamento de ultra-som.....	30
3.3. Indução do diabetes Melito.....	31

3.4. Procedimento cirúrgico.....	32
3.5. Tratamento dos animais.....	33
3.6. Coleta do material.....	34
3.7. Técnicas de avaliação.....	34
3.7.1. Técnica radiológica.....	34
3.7.2. Técnica histológica.....	35
4.0. RESULTADOS.....	36
4.1. Avaliação radiológica.....	36
4.2. Avaliação histopatológica.....	39
5.0. DISCUSSÃO	45
5.1. Procedimento experimental.....	45
5.2. Tratamento.....	46
5.3. Resultados.....	47
5.3.1. Atuação do ultra-som na consolidação óssea.....	48
5.4.1. Prováveis mecanismos responsáveis pelos resultados obtidos.....	49
6.0. CONCLUSÕES.....	52
6.1. Considerações e sugestões para futuros trabalhos.....	52
7.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

RESUMO

O diabetes Melito é uma doença metabólica caracterizada por quadro de hiperglicemia permanente associada a lesões vasculares e neurológicas e portanto, a retardo em processos de reparação. Este trabalho apresenta os resultados experimentais da aplicação do ultra-som de baixa intensidade na consolidação de osteotomias experimentais em fíbulas de ratos diabéticos aloxânicos. Os resultados radiológicos e histopatológicos são compatíveis com uma redução no tempo necessário para a regeneração óssea.

ABSTRACT

Diabetes Mellitus is a metabolic disease associated with chronic hyperglycemia, vascular and neurologic lesions and delayed union in healing processes. This study addresses the effect of low intensity ultrasound in the bone healing of experimental fibulae osteotomies in Alloxan diabetic rats. The effect evaluated by radiology and histopathology shows an acceleration of bone repair in the ultrasound-treated osteotomies.

1.0 - INTRODUÇÃO

A energia ultra-sônica tem sido investigada como alternativa de tratamento nos processos de regeneração de tecidos biológicos. Vários trabalhos desenvolveram-se perante a evidente necessidade de se reduzir o tempo de reparação dos tecidos, principalmente em doenças consideradas incapacitantes.

No caso das fraturas a comprovação experimental da piezoelectricidade óssea (FUKADA e YASUDA, 1957) motivou a realização de trabalhos experimentais e clínicos sobre os efeitos da estimulação ultra-sônica na consolidação óssea. Uma redução de até 50% no tempo de consolidação de fraturas experimentais (DUARTE, 1977), e uma taxa média de sucesso de 80% no tratamento de fraturas com retardo de consolidação (XAVIER e DUARTE, 1983), foram obtidas com o uso desta técnica.

O diabetes Melito, por causa das lesões vasculares, é considerada, a longo prazo, como uma doença incapacitante que leva em geral ao retardo dos processos regenerativos. Existem comprovações científicas da ocorrência de retardo na consolidação óssea em diabetes experimental (DIXIT e EKSTROM, 1987). Neste trabalho desenvolveu-se um estudo experimental com ratos diabéticos aloxânicos a fim de investigar se o uso da energia ultra-sônica pulsátil abrevia o tempo de consolidação óssea também nestes animais, que apresentam características patológicas semelhantes àsquelas encontradas em pacientes diabéticos.

1.1. OBJETIVO

Este trabalho tem por objetivo a aplicação do ultra-som de baixa intensidade em osteotomias de fíbula de ratos diabéticos-aloxânicos, com a finalidade de verificar se a consolidação óssea é acelerada com o uso deste tipo de energia ultra-sônica, uma vez que o estado de diabetes Melito parece apresentar um retardo na consolidação óssea. O parâmetro a ser investigado seria da integridade estrutural do

osso, mediante avaliações radiológicas e histológicas comparativas entre fibulas tratadas e fibulas não tratadas (grupo controle).

2.0 - REVISÃO DA LITERATURA

2.1 - O ULTRA-SOM

A descrição da piezoelectricidade óssea por FUKADA e YASUDA (1957) estimulou muitos pesquisadores a investigarem nos anos posteriores a variedade de sistemas biológicos capazes de transformar energia mecânica em energia elétrica e portanto estimular a renovação celular, bem como obter métodos seguros e preferencialmente não- invasivos para tal fim.

O primeiro estudo experimental que tentou estimular a consolidação de fraturas in vivo, foi realizado por BASSET et al (1964), e os pesquisadores usaram corrente elétrica como estímulo.

Posteriormente, o mesmo autor realizou um experimento utilizando campos eletromagnéticos com o objetivo de observar se o estímulo provocava uma aceleração no processo de reparo de fraturas ósseas (BASSET et al, 1974).

O emprego do ultra-som nos processos de reparação iniciou-se fundamentado na piezoelectricidade.

O ultra-som com finalidades terapêuticas teve seu início nos anos 70, através dos experimentos de DYSON et al (1970) que investigaram a aceleração da cicatrização de tecidos moles.

Entre nós, a tecnologia do ultra-som de baixa intensidade resultou de um trabalho experimental com coelhos, realizado por DUARTE (1977). Através deste trabalho pioneiro comprovou-se uma redução de 50% no tempo de consolidação de fraturas em osteotomias experimentais.

XAVIER e DUARTE (1983) utilizando clinicamente o método proposto por DUARTE (1977), obtiveram 80 % de sucesso na consolidação óssea em casos que apresentavam retardos ou em pseudo-artroses.

DYSON e BROOKES (1983) avaliaram o tratamento com ultra-som no reparo da fraturas bilaterais de ratas Wistar, durante as fases de "soft callus" , "hard callus "e remodelamento, bem como o tempo ótimo de estimulação. Os resultados indicaram que o tratamento com o ultra-som é mais efetivo durante as duas primeiras

semanas após as osteotomias, ou seja, durante as fases inflamatória e proliferativa do processo de reparação.

PILLA et al (1990) utilizando os mesmos parâmetros ultra-sônicos propostos por DUARTE (1977), ao tratarem osteotomias em fíbulas de coelhos da raça Nova Zelândia, constataram que o ultra-som pulsado de baixa intensidade é capaz de acelerar a razão de restabelecimento biomecânico, devido à rápida formação do calo ósseo.

A tecnologia do ultra-som de baixa intensidade iniciada por DUARTE (1977) vem se desenvolvendo com o objetivo de identificar o mecanismo de ação do ultra-som (SILVA, 1987), os efeitos da variação acústica sobre a consolidação óssea (COLOMBO, 1994), bem como confirmar seus efeitos sobre a consolidação óssea e ampliar suas finalidades terapêuticas.

RYABY et al (1989) descreveu um aumento na incorporação de cálcio pelo ultra-som de baixa intensidade em culturas de células ósseas.

PÁDUA (1990) realizou um experimento para investigar o efeito do ultra-som de baixa intensidade no processo de reparo de fraturas do osso zigomático em ratos.

HILÁRIO (1993) desenvolveu um estudo clínico dos efeitos do ultra-som no reparo de úlceras varicosas crônicas.

NOLASCO (1993) investigou os efeitos da estimulação ultra-sônica sobre a cicatrização da pele de ratos diabéticos aloxânicos. Os resultados mostraram um aumento de 30% na resistência à ruptura do tecido tratado em comparação aos não-tratados.

E por fim, podemos citar WANG et al (1994) que constatou um aumento na resistência óssea em fraturas femorais de ratos, quando tratados por energia ultra-sônica.

Com os resultados positivos apresentados pelos trabalhos já realizados com o ultra-som de baixa intensidade, encontramos estímulos para prosseguir e atingir nosso objetivo.

2.2 - CARACTERÍSTICAS DAS ONDAS ULTRA-SÔNICAS

O ultra-som é uma energia mecânica de alta frequência (acima de 20 khz e superior aos limites da audição humana) que se propaga como uma onda de pressão, causando agitação nas moléculas do meio em que estão se propagando, fazendo-as oscilarem.

Uma onda mecânica transmite energia através da vibração das moléculas do meio no qual a onda está se propagando, quer o meio seja sólido, líquido ou gasoso (HAAR, 1987). O ultra-som é transmitido em forma de ondas de compressão, onde a oscilação de partículas se dá paralelamente à direção de propagação da onda, constituindo zonas de compressão e rarefação; ou em forma de ondas de cisalhamento (somente para sólidos), onde as partículas oscilam em direção perpendicular à direção de propagação das ondas.

ONDA	CONFIGURAÇÃO
LONGITUDINAL	
TRANSVERSAL	

Fig. 2.2.1 - Modo de propagação das ondas ultra-sônicas

O aparelho de ultra-som pulsado é assim chamado quando o sinal elétrico gerador de ondas é descontínuo, e o ultra-som é considerado contínuo quando o sinal elétrico não apresenta descontinuidade.

As ondas ultra-sônicas são geradas por transdutores (materiais que convertem um tipo de energia em outro) compostos de materiais piezoelétricos que convertem energia elétrica em energia mecânica. Estes transdutores consistem em um disco ou cilindro de material natural como o quartzo, ou de material sintético como o titanato zirconato de chumbo (PZT), muito usado em aparelhos de ultra-som para uso médico (WILLIAMS, 1987).

Alguns parâmetros físicos permitem a caracterização das ondas ultra-sônicas. Dentre eles podemos citar:

- *Comprimento de Onda* (λ) - distância mínima entre dois pontos nos quais as partículas encontram-se no mesmo estado de movimento.
- *Frequência* (F) - número de vezes que uma partícula realiza um ciclo oscilatório por unidade de tempo.
- *Período* (T) - tempo que uma partícula leva para realizar um ciclo completo de movimento.
- *Amplitude* (A) - descreve a magnitude do distúrbio causado pela onda. É o máximo deslocamento que uma partícula experimenta a partir de sua posição de equilíbrio (HAAR, 1987).

Fig. 2.2.2 - Representação de uma onda em função da distância.

Fig. 2.2.3 - Representação de uma onda em função do tempo.

- *Velocidade* (c) - velocidade com que a perturbação move-se ao longo do meio. A relação entre velocidade, frequência e comprimento de onda determina a equação fundamental do movimento das ondas e é dada por:

$$c = \lambda/T$$

- *Potência* (P) - energia (E) total do feixe em um intervalo de tempo (t), expressa em Watts.
- *Intensidade* (I) - quando uma onda atravessa um meio, as partículas do meio começam a vibrar e adquirem energia cinética. A energia associada com a onda ultra-

sônica é chamada de intensidade acústica e pode ser definida como a energia (E) que atravessa uma área (S) em um intervalo de tempo (t) (HAAR, 1987).

- *Atenuação* - redução da intensidade de uma onda ultra-sônica conforme ela se distancia de sua fonte. Essa atenuação é causada por espalhamento e absorção da onda pelo meio.

- *Impedância* - indica a propriedade que as ondas têm de se deslocarem mais facilmente em alguns meios que em outros. Pode ser descrita pela equação :

$$Z = \rho \cdot c, \text{ onde}$$

ρ = densidade do meio

c = velocidade da onda

2.3 - EFEITOS BIOLÓGICOS DA AÇÃO DO ULTRA-SOM

Os efeitos biológicos da ação do ultra-som dependem de muitos fatores físicos e biológicos, tais como intensidade, tempo de exposição, estrutura espacial e temporal do campo magnético e estado fisiológico do objeto. Este grande número de variáveis complica a compreensão exata do mecanismo de ação do ultra-som na interação com os tecidos biológicos (SARVAZYAN, 1983).

Experimentos realizados com o ultra-som demonstram que a interação deste com os tecidos biológicos provoca alterações fisiológicas; que podem ser benéficas ou provocar danos.

Independentemente do tipo de mecanismo de interação que está agindo no tecido biológico estudado, o objetivo principal tem sido estabelecer limiares para a intensidade ultra-sônica, abaixo dos quais não ocorrem efeitos lesivos (FERRARI, 1987).

HILL (1972) considerou o limiar de 100mW/cm^2 de intensidade como não lesivo para os tecidos biológicos.

Os mecanismos físicos envolvidos na terapêutica do ultra-som que induzem respostas clinicamente significantes sobre as células, tecidos, órgãos e organismos são geralmente classificados em mecanismos térmicos e não-térmicos (DYSON, 1987).

2.3.1 - Mecanismo Térmico

Quando uma onda ultra-sônica atravessa um tecido biológico, este é aquecido ao absorver parte da energia mecânica ultra-sônica. O aumento da temperatura provoca: um aumento temporário na extensibilidade das estruturas altamente colagenosas como tendões, ligamentos e cápsulas articulares; uma redução na dor e espasmos musculares e produz ainda uma reação inflamatória branda.

O aquecimento local produzido pelo ultra-som depende do tipo de tecido (os tecidos altamente proteicos absorvem energia mais prontamente do que os tecidos com alto teor de gordura), do fluxo sanguíneo que irriga o local (uma vez que o calor produzido pode ser dissipado por corrente sanguínea) e da frequência ultra-sônica aplicada (as altas frequências têm uma melhor absorção) (DYSON, 1987).

Estudos indicam que as altas temperaturas são lesivas e podem danificar tecidos e células quando a intensidade utilizada ultrapassa o limiar de 100mW/cm^2 (HILL, 1972).

2.3.2 - Mecanismos não-Térmicos

Com a constatação dos efeitos lesivos provocado pelas altas intensidades muitos autores têm utilizado intensidades acústicas mais baixas na estimulação ultra-sônica. Estas intensidades são muito baixas para provocarem um aumento significativo na temperatura, fato que indica que outros mecanismos que não os térmicos estão envolvidos na interação do ultra-som com o tecido biológico (DYSON, 1987). Dentre os mecanismos não-térmicos que produzem efeitos nos tecidos biológicos podemos citar:

2.3.2.1 - Mecanismo cavitacional

Cavitação é a formação e o crescimento de cavidades ou bolhas no meio líquido, contendo quantidades variáveis de gás ou vapor, que são formadas quando as ondas ultra-sônicas atravessam os tecidos (DYSON, 1987).

Quando estas bolhas atravessam o campo ultra-sônico oscilando em um feixe estável, aumentando e diminuído seus volume conforme as variações de pressão do campo, dizemos que a cavitação é estável (HAAR,1987). Este tipo de cavitação é responsável em parte pela estimulação no reparo de tecidos que a onda ultra-sônica produz, através de modificações na permeabilidade da membrana celular para os íons de cálcio (MUMMERY,1978) e sódio (MORTIMER e DYSON,1988) que provocam um aumento na síntese de proteínas.

Quando o feixe ultra-sônico atravessa o campo oscilando violentamente, provocando grandes alterações no volume das bolhas levando-as ao colapso, o que pode determinar também a implosão celular., chamamos a cavitação de transiente (HAAR, 1987). A cavitação transiente é extremamente danosa. As alterações de pressão e temperatura produzidas no sítio do colapso das bolhas pode desintegrar o tecido local com formação de radicais livres altamente reativos que podem causar mudanças químicas nas células e lise celular (OKUNO et al, 1986).

Não existem evidências que ocorram efeitos danosos de cavitação *in vivo* em tecidos tratados com ultra-som de baixa intensidade (DYSON, 1990).

2.3.2.2 - Microfluxo acústico

Movimentos unidirecionais de um fluido em um campo ultra-sônico induzidos por forças de radiação que podem alterar as organelas celulares e membranas de maneira reversível ou irreversível, dependendo de sua magnitude. O microfluxo pode ter seu valor terapêutico uma vez que sua ação facilita a difusão através de membranas . Dependendo do tipo de célula, a alteração iônica produzida pode desenvolver alterações na motilidade, síntese ou secreção celular, que podem acelerar o processo de reparo (DYSON, 1987).

2.3.2.3 - Mecanismo piezoelétrico

A piezoelectricidade foi descoberta em 1880 pelos irmãos Curie (MASON, 1981) e é definida como a propriedade física segundo a qual alguns materiais quando deformados por uma tensão mecânica, desenvolvem cargas elétricas

superficiais e vice-versa, i. e. , ao se colocar um material piezoelétrico sob campo elétrico, as cargas elétricas interagem com o mesmo e exibem deformações mecânicas (OKUNO et al, 1986).

FUKADA e YASUDA (1957) foram os primeiros a descreverem a piezoelectricidade em um tecido biológico - o osso. Eles observaram os efeitos piezoelétricos direto e inverso no osso, e mostraram que ao sofrer deformações mecânicas, cargas elétricas são formadas na face oposta do osso, sendo este efeito devido à molécula de colágeno (SILVA, 1987).

A piezoelectricidade continuou a despertar o interesse da comunidade científica, que procurou estabelecer uma relação entre eletricidade e os mecanismos de crescimento e regeneração.

DUARTE (1983) atribuiu a aceleração do processo de consolidação de fraturas ósseas por ultra-som de baixa intensidade ao mecanismo da piezoelectricidade.

XAVIER e DUARTE (1983) consideraram que o processo de reparação óssea se estabelece quando uma corrente elétrica estimula a "alocação" de cargas elétricas no sítio lesado, que induzem a proliferação de células ósseas.

2.4 - CONSIDERAÇÕES MORFO-HISTOLÓGICAS DO OSSO

2.4.1 - Tecido Ósseo - Histologia básica

O tecido ósseo é uma variedade de tecido conjuntivo altamente especializado, formado a partir de um tecido mesenquimal não especializado, em um processo denominado ossificação. É um dos mais resistentes e rígidos de todo o corpo humano. Como constituinte principal do esqueleto suporta as partes moles, protege os órgãos vitais contidos nas cavidades torácicas e cranianas e aloja a medula óssea, formadora das células sanguíneas.

O osso também serve como uma reserva de cálcio, fosfato, e outros íons que podem ser liberados ou estocados com o objetivo de manter as concentrações ideais e constantes destes íons nos fluidos corporais.

Em adição a estas funções o osso forma um sistema de alavancas que multiplica a força gerada durante as contrações musculares, transformando-as em movimentos corporais.

O tecido ósseo é constituído por componentes orgânicos (matriz orgânica), sais minerais (matriz mineral) e células.

A matriz inorgânica representa 50 % do peso da matriz óssea. Os íons mais encontrados são o cálcio e o fosfato, e em menores proporções encontramos também bicarbonato, magnésio, potássio, sódio e citrato. O cálcio e o fosfato formam cristais de hidroxiapatita.

O principal componente da matriz orgânica é a molécula de colágeno tipo I (95%), da qual se origina a molécula de tropocolágeno. O tropocolágeno por sua vez consiste de três cadeias polipeptídicas que se enrolam em hélice e estão unidas entre si por meio de pontes de hidrogênio. As características ósseas de resistência, dureza e elasticidade são dadas pela associação dos cristais de hidroxiapatita com as fibras colágenas (JUNQUEIRA et al, 1989).

As células ósseas podem ser de três tipos :

- osteoblastos - são as células que sintetizam a parte orgânica da matriz óssea, que é composta por moléculas de colágeno tipo I, proteoglicanas e glicoproteínas. A deposição dos componentes inorgânicos no osso é dependente da presença de osteoblastos. Dispõem-se nas superfícies ósseas, lado a lado, lembrando um epitélio simples. Possuem prolongamentos citoplasmáticos que se prendem aos dos osteoblastos vizinhos. Quando aprisionados pela matriz óssea recém-sintetizada passam a se chamar osteócitos. A matriz é depositada ao redor da célula e de seus prolongamentos, formando as lacunas e os canaliculos, respectivamente.
- osteócitos - são simplesmente osteoblastos que cercaram-se com matriz óssea. Os osteócitos situam-se nas lacunas, entre as lamelas da matriz óssea. Apenas um osteócito é encontrado em cada lacuna. São células achatadas, com forma de amêndoa, e são essenciais para a manutenção da matriz. A morte dos osteócitos determina a reabsorção da matriz óssea.
- osteoclastos - são células móveis, gigantes e multinucleadas que se relacionam com o processo de reabsorção e remodelamento do tecido ósseo. Contém de 2 a 50 núcleos ou mais, que aparecem nas superfícies ósseas quando ocorre reabsorção no

tecido. O papel exato dos osteoclastos na reabsorção óssea não está perfeitamente esclarecido, todavia há evidências de que eles secretam enzimas colagenolíticas que atacam a parte orgânica da matriz óssea (JUNQUEIRA et al, 1989).

As células ósseas são constantemente renováveis, havendo formação e reabsorção ósseas no decorrer de toda a vida do indivíduo (DAMASK, 1978).

Como não existe difusão de substâncias através da matriz calcificada do osso, a nutrição dos osteócitos depende de *canalículos* que existem na matriz. Esses canalículos permitem a comunicação dos osteócitos com seus vizinhos, com as superfícies externa e interna do osso e com os canais vasculares da matriz.

O tecido ósseo é revestido interna e externamente por membranas conjuntivas, denominadas respectivamente endóstio e perióstio. O endóstio é constituído por delgada lâmina de tecido conjuntivo frouxo que reveste as cavidades do osso esponjoso, o canal medular, os canais de Harvers e os de Volkman. O perióstio é formado por tecido conjuntivo denso, muito fibroso em sua parte externa e rico em células e vascularizado na porção interna, junto ao tecido ósseo. As células do perióstio, que morfologicamente são fibroblastos, transformam-se muito facilmente em osteoblastos e têm importante papel no crescimento dos ossos e na reparação de fraturas. As principais funções do perióstio e endóstio são nutrir o tecido ósseo e servir de fonte de osteoblastos para o crescimento e reparo ósseo, formando nas fraturas o calo periosteal. Por estes motivos os procedimentos cirúrgicos devem tentar preservar sempre o perióstio.

Fig. 2.4.1.1 - Representação dos componentes ósseos em um processo de ossificação intramembranosa. (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1974)

Fig.2.4.1.2- Desenho esquemático de 2 osteócitos e parte de um sistema haversiano (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1974).

Histologicamente o tecido ósseo pode ser classificado em imaturo ou primário (primeiro tecido a ser formado) e maduro, secundário ou lamelar.

O tecido ósseo primário apresenta fibras colágenas sem organização definida e tem menor quantidade de minerais e maior porcentagem de osteócitos do que o tecido secundário. Este tipo de tecido ósseo é encontrado em pessoas em fase de crescimento.

O tecido ósseo secundário ou lamelar substitui gradativamente o tecido ósseo primário. O que o difere do tecido primário é que possui fibras colágenas organizadas em lamelas de 3 a 7 μm de espessura que ficam paralelas umas as outras ou se dispõem em camadas concêntricas em torno de canais com vasos, formando os sistemas de Havers. Cada sistema de Havers é constituído por um cilindro longo formado por 4 a 20 lamelas concêntricas. No centro existe um canal, o canal de Havers, que contém vasos e nervos. A comunicação entre os canais de Havers e entre estes e a cavidade medular e a superfície externa do osso é feita por meio dos canais de Volkmann, que são canais transversais ou oblíquos e não apresentam lamelas ósseas concêntricas. Entre as lamelas ocorre um acúmulo de glicoproteínas, que recebe o nome de *substância cimentante*.

Fig. 2.4.1.3 - Esquema da estrutura da diáfise dos ossos longos.(JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1974)

2.4.2 - Propriedades mecânicas do osso

Apesar da sua resistência e de sua dureza, o tecido ósseo é muito elástico, sendo capaz de remodelar sua estrutura interna em resposta a modificações nas forças a que está submetido normalmente. Muitos pesquisadores da área da saúde têm se interessado pelos efeitos que diversas forças, como impactos, osteosínteses e próteses exercem sobre o tecido ósseo (quer influenciando sua forma quer sua estrutura), com o objetivo de desenvolver e manufaturar melhores implantes e técnicas de reparação.

O comportamento mecânico como resultado da aplicação de uma força é influenciado pelo fato de que o osso é um material viscoelástico. Consequentemente, quando uma força é aplicada o osso tende a resistir "imóvel" ou deformar-se. Quando a força não ultrapassa o limite elástico do osso toda deformação elástica é recuperada no menor tempo possível, após a retirada da carga ou força. As forças ou

cargas superiores ao limite elástico ósseo e pouco tempo de recuperação podem levar a deformações plásticas permanentes ou fraturas. (BAKER, 1979).

WOLFF (1892) postulou que a estrutura óssea organiza-se em função das forças mecânicas aplicadas ao tecido ósseo.(Lei de Wolff)

2.4.3. Piezoeletricidade óssea

As propriedades bioelétricas do tecido ósseo são responsáveis pela diferenciação das células mesenquimais em osteoblastos (sintetizadores da matriz óssea) e osteoclastos (promovem a reabsorção óssea), caracterizando a natureza elétrica da homeostase óssea. A diferenciação celular no osso está diretamente relacionada à polarização elétrica local do tecido. (BASSET, 1971).

O efeito piezoelétrico no osso foi descrito por FUKADA E YASUDA (1957), ao demonstrarem que o osso desenvolve campos elétricos em sua superfície, quando submetidos a tensão mecânica e vice-versa.

Segundo YASUDA (1977) a aposição óssea ocorre sempre na presença de potenciais negativos. Em osso submetido a pressão, o lado sob tensão desenvolve potencial positivo. No lado sob compressão, o potencial é negativo. Portanto o que ocorre é a formação de tecido ósseo nas regiões eletronegativas e reabsorção nas regiões eletropositivas (BRIGHTON et al, 1977).

SHAMOS e LAVINE (1967) afirmam que o lado côncavo do osso submetido a estresse mecânico é negativo em referência ao lado convexo. Na concavidade ocorre aposição e na convexidade reabsorção óssea.

O osso compacto é composto primariamente de : colágeno, que é piezoelétrico e ocupa 50% do volume do osso ; a parte mineral, que ocupa 40% do volume ; e os poros, que representam os 10% restantes.(JOHNSON et al, 1980)

A piezoeletricidade óssea ocorre devido ao colágeno , pois mesmo o osso desmineralizado em solução ácida apresenta o efeito piezoelétrico (FUKADA e YASUDA, 1964).

ATHENSTAEDT (1970) notou que o efeito piezoelétrico segue a direção longitudinal da fibrila de colágeno.

KOBERLE (1974) afirmou que o efeito piezoelétrico é diferente entre as amostras tiradas paralela e perpendicularmente ao longo do eixo do osso.

O conhecimento desta propriedade e dos efeitos da propagação de ondas mecânicas nos materiais levou DUARTE (1977) a postular o princípio da estimulação ultra-sônica de baixa intensidade do calo ósseo.

O método ultra-sônico postulado por DUARTE (1977) teve sua aplicação clínica iniciada em 1979, e XAVIER e DUARTE (1983) comprovaram o sucesso do método obtendo resultados positivos da ordem de 80% no tratamento de retardos de consolidação e pseudo-artroses.

PILLA et al (1991) obtiveram uma redução significativa no tempo de consolidação de fraturas recentes.

2. 5 - FASES DA CONSOLIDAÇÃO ÓSSEA

2.5.1. - Histogênese óssea

O tecido ósseo é formado por ossificação intramembranosa ou por ossificação endocondral.

A ossificação intramembranosa ocorre no interior de uma membrana conjuntiva, local onde o processo começa e chamado de *centro de ossificação primária* . O processo tem início pela diferenciação de células mesenquimais que se transformam em osteoblastos. Estes sintetizam os osteóides, que logo se calcificam, englobando osteoblastos que se transformam em osteócitos. Os centros de ossificação crescem radialmente, acabando por substituir a membrana conjuntiva pré-existente. A parte da membrana conjuntiva que não sofre ossificação e que recobre o tecido ósseo formado passa a constituir o periósteo.

A ossificação intramembranosa é o processo através do qual se formam os ossos dérmicos como o frontal, parietal , partes do occipital e do temporal. Este processo também regula o crescimento no sentido radial e produz osso compacto e esponjoso, sob a forma de diploe.

A ossificação endocondral inicia-se sobre um modelo cartilaginoso de forma semelhante à do osso a ser formado, porém de tamanho menor. Consiste

essencialmente de dois processos. Primeiro: a cartilagem hialina sofre modificações, ocorrendo hipertrofia dos condrócitos, que morrem deixando cavidades separadas por finos tabiques de matriz cartilaginosa que se calcificam. Segundo: as cavidades da cartilagem calcificada são invadidas por capilares sanguíneos e células mesenquimatosas indiferenciadas. Essas células vão se diferenciar em osteoblastos que depositarão matriz óssea sobre os restos de cartilagem calcificada. Deste modo aparece tecido ósseo onde antes havia tecido cartilaginoso sem que ocorra a transformação de um tecido em outro, mas a sua substituição. Este tipo de ossificação é o principal responsável pela formação dos ossos curtos e longos além de regular o crescimento no sentido longitudinal e produzir também o osso esponjoso.

A formação dos ossos longos tem o seguinte princípio: o modelo cartilaginoso possui uma parte média estreitada e as extremidades dilatadas, correspondendo respectivamente à diáfise e epífises do osso. O primeiro tecido ósseo aparece na parte média da diáfise por ossificação intramembranosa. Este centro de ossificação é chamado de *centro primário* e seu crescimento rápido e longitudinal acaba por ocupar toda a diáfise do osso. Desde o início da formação do centro primário surgem osteoclastos e ocorre absorção do tecido ósseo formado no centro da cartilagem, aparecendo assim o *canal medular*, o qual também cresce longitudinalmente à medida que a ossificação progride. Muito mais tarde formam-se os centros de ossificação secundária, um em cada epífise, porém não simultaneamente. Esses centros são semelhantes ao centro primário da diáfise, mas o seu crescimento é radial em vez de longitudinal. A cartilagem epifisária fica entre o tecido ósseo das epífises e o da diáfise e seu desaparecimento por ossificação determina o fim do crescimento longitudinal dos ossos (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1974) (Figura 2.5.1.1).

2.5.2 - Crescimento e remodelagem óssea

O crescimento dos ossos consiste na formação de tecido ósseo novo, associada à reabsorção parcial de tecido já formado; este é o modo como os ossos conseguem manter sua forma enquanto crescem . Os ossos chatos crescem por formação do tecido ósseo pelo perióstio situado entre as suturas e na face externa do

osso, enquanto ocorre reabsorção na face interna. Os ossos longos crescem em comprimento por atividade do disco epifisário e em espessura por aposição do tecido ósseo periosteal(JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1974) (Figura 2.5.2.1)

Segundo MOHAN e BAYLINK (1991) , pesquisas laboratoriais sugerem que fatores de crescimento podem agir localmente para modular a formação óssea e estimular a proliferação e atividade osteoblástica.

Fig. 2.5.1.1 - Formação de um osso longo a partir de um modelo cartilaginoso.

Fig. 2.5.2.1. - Desenho esquemático representando o crescimento dos ossos longos

2. 5. 3. - Reparação de fraturas

Quando um osso é fraturado ocorre hemorragia local pela lesão dos vasos sanguíneos do osso e periósteo. Ocorre também a destruição da matriz e morte das células junto ao local fraturado.

Um processo de reparação tem início quando os macrófagos removem o coágulo sanguíneo e os restos celulares. O periósteo e endósteo respondem com intensa proliferação de seus fibroblastos formando um colar em torno da fratura. Esse processo evolui para a formação de um calo ósseo constituído de tecido ósseo imaturo, que une provisoriamente as extremidades da fratura. Com a volta gradual do osso às suas atividades, as tensões normais a que está sujeito voltam a atuar e vão determinar o remodelamento do calo ósseo. O tecido ósseo primário do calo vai sendo reabsorvido e substituído por tecido ósseo maduro. Os osteoclastos participam deste processo de remodelagem (JUNQUEIRA et al, 1989).

Fig. 2.5.3.1. - Reparo de um osso fraturado pela proliferação de células do periósteo e endósteo (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1974).

2.6. - DIABETES MELITO

GÊNESE: O diabetes Melito pode ser produzido por uma lesão das células beta do pâncreas, induzida por vírus, fatores genéticos e/ou imunológicos. (ROBBINS, 1986).

Pode ser definido como: " uma perturbação crônica do metabolismo dos carboidratos, gorduras e proteínas, caracterizada por uma deficiência relativa ou absoluta de insulina, hiperglicemia, glicosúria, tendência ao desenvolvimento de aterosclerose , microangiopatia, nefropatia e neuropatia." (ROBBINS, 1986).

"O diabetes Melito é uma doença que apresenta lesões patológicas nas Ilhotas de Langerhans e em outros órgãos pela insuficiente quantidade de insulina,

denominado *diabetes Tipo I* , ou deficiente ação da insulina, *diabetes Tipo II*" (CAMPOS, 1992).

Assim, o diabetes Melito pode ser considerado como uma síndrome crônica, com hiperglicemia permanente, com ou sem glicosúria. Como os casos mais importantes de diabetes Melito são em si heterogêneos quanto à etiologia e a patogênese eles foram deliberadamente agrupados em três classes e chamados de uma maneira neutra: diabetes tipo I ou diabetes insulino-dependente, diabetes tipo II ou diabetes não insulino-dependente e o diabetes gravídico.

Todos os tipos de diabetes têm como resultado a hiperglicemia. A hiperglicemia causa lesões irreversíveis em muitos órgãos e tecidos pela interação química da glicose com as proteínas, sem a ajuda de enzimas.

Com a possibilidade de se repor as quantidades de insulina através de injeções e de se dosar a glicemia e a glicohemoglobina nos laboratórios clínicos conseguiu-se um grande sucesso na terapêutica do diabetes tipo I. Entretanto, apesar da insulina prevenir as mortes rápidas e trágicas pela cetoacidose, o prolongamento da vida pelo controle não previne as complicações a longo prazo.

Em todos os tipos de diabetes, as graves complicações com a consequente morbidade e mortalidade causam um grande ônus para o paciente, para sua família e para o sistema previdenciário do país (CAMPOS, 1992).

Comprovadamente a síndrome diabética é causada por lesões e disfunções das células pancreáticas (GEPTS e LECOMPTE, 1981).

As complicações crônicas do diabetes resultam do aumento da glicose tissular, do metabolismo alterado do mio-inositol(constituinte normal da alimentação) e da glicolisação proteica não enzimática. A hiperglicemia é entretanto a anormalidade metabólica primeira, responsável pelo desenvolvimento da lesão tissular irreversível do diabetes. Uma das consequências fisiopatológicas da hiperglicemia é a excessiva interação química da glicose com as proteínas sem a ajuda de enzimas (glicolisação não enzimática), que resulta na formação de produtos irreversíveis, que se acumulam nos tecidos, i.e.; cristalino, colágeno, elastina e mielina; provocando alterações estruturais e funcionais.

Os produtos finais da glicolisação vão se acumulando durante toda a vida do indivíduo diabético, principalmente no colágeno, a proteína mais difundida no

organismo e presente em todo tipo de artérias e em todas as membranas basais de todos os tecidos orgânicos. É por este mecanismo que se formam os depósitos de fibrina encontrados nos vasos sanguíneos dos diabéticos, levando a complicações severas (CAMPOS, 1992).

As complicações severas do diabetes Melito são parecidas com os processos e doenças característicos da idade, e ocorrem em tecidos ricos em colágeno. Estas incluem a aterosclerose, retinopatia, nefropatia, neuropatia, osteoartrite e rigidez periarticular (KOHN e SCHNEIDER, 1982).

Estas complicações podem ser prevenidas ou retardadas pelo tratamento com insulina, desde que o tratamento seja realizado antes do acúmulo dos produtos finais da glicolização não enzimática. Muitos autores rejeitam o termo "complicações" afirmando que as alterações dos tecidos são parte de uma "síndrome", precedida por hiperglicemia inicial (KEEN, 1975).

2.6.1 - Classificação

No *diabetes Melito tipo I* (insulino-dependente) o principal defeito é a insuficiente secreção de insulina pelas células beta do pâncreas. Fenômenos imunológicos (humoral e celular) e fatores ambientais dão origem à destruição das células beta das Ilhotas de Langerhans. Anticorpos anti-insulina podem ser encontrados em 50% dos casos de diabetes Melito tipo I recentemente diagnosticados e antes que o paciente receba tratamento com insulina (CAMPOS, 1992).

No *diabetes Melito tipo II* a resistência periférica dos tecidos à ação da insulina parece ser o principal fator. Além disso, a hiperglicemia apresentada resulta de uma maior produção de glicose pelo fígado, e há ainda uma parcial incapacidade de secreção de insulina pelas células beta do pâncreas. A resistência insulínica, caracterizada por uma inadequada ou insuficiente resposta dos tecidos periféricos causa, em razão disso, uma alta concentração de insulina no plasma. A concentração dos ácidos graxos livre é elevada nos pacientes com o diabetes Melito tipo II porque a insulina falha em "limpar" o plasma pela oxidação dos mesmos, e nesta circunstância eles passam a atuar como um antagonista à ação da insulina.

No *diabetes gravídico* a característica fundamental também é a resistência dos tecidos à ação da insulina (CAMPOS, 1992).

2.6.2 - Ação da insulina

Insulina é o hormônio anabólico do organismo que realiza o transporte da glicose do meio extra-celular para o interior da célula e regula o metabolismo intermediário da mesma; além de promover a produção de glicogênio, lípidos e proteínas (estimulando a incorporação dos aminoácidos nestas). Quando há um aumento da glicose no sangue, ocorre uma maior liberação de insulina e é o que acontece após uma refeição. Entre as refeições as quantidades de insulina liberadas são somente as necessárias para manter o balanço da glicose liberada pelo fígado e aquelas absorvidas pelos tecidos. A ação da insulina sobre os tecidos é feita através de receptores existentes na membrana plasmática da célula (GANONG, 1983).

2.6.3.- Diabetes aloxânico

Podemos definir um agente diabetogênico como aquele que causa "qualquer diminuição temporária ou permanente no metabolismo da glicose, ou alterações neste mecanismo que resultem em tolerância anormal à glicose ou hiperglicemia com ou sem glicosúria" (DULIN e SORET, 1977).

A primeira indicação de que a aloxana foi capaz de induzir hiperglicemia transiente data de 1937. Os primeiros relatos do efeito tóxico da aloxana sobre as células beta das ilhotas de Langerhans e sua ação diabetogênica foram publicados por GOMORI e GOLDNER (1943). Desde então numerosos estudos têm sido reportados para melhor entendermos este efeito da aloxana. (DULIN e SORET, 1977).

ISHIBASHI et al (1981) investigaram a ação da aloxana sobre o metabolismo de glicose em culturas de fibroblastos e os resultados sugerem que a aloxana pode influenciar diretamente o metabolismo da glicose além da fosforilação.

JANSSON e SANDLER (1986) investigaram a ação da aloxana em camundongos e concluíram que esta causa um aumento na permeabilidade vascular

das ilhotas, que se manifesta num estágio posterior à degeneração citotóxica das células beta do pâncreas.

A droga Aloxana (2,4,5,6- Tetraoxypyrimidina; 5,6- Dioxyuracila/ monohidratada) - SIGMA produz "diabetes química" devido aos efeitos citotóxicos nas células beta das ilhotas de Langerhans. GOMORI e GOLDNER (1943) ao produzirem diabetes Melito em ratos constataram que as alterações histológicas provocadas pela aloxana resultam em necrose e completo desaparecimento das células beta das ilhotas pancreáticas.

O diabetes aloxânico tem mostrado os sinais clássicos do diabetes humano:

- Glicosúria - excreção urinária de glicose em quantidades aumentadas;
- Polifagia - excesso de consumo de alimentos;
- Polidipsia - ingestão frequente de líquidos em virtude de sede extrema;
- Poliúria - excessiva excreção de urina;
- Hiperglicemia - alta concentração anormal de glicose no sangue;
- Hiperlipemia - alta concentração de lipídeos no sangue;
- Cetonúria - aumento da excreção urinária de corpos cetônicos;
- Acidose - redução de alcali dos líquidos corporais em proporção ao conteúdo de ácido;
- Perda de peso corpóreo a despeito da polifagia (RERUP, 1970).

A aloxana pode produzir diabetes em coelhos, ratos, cães, ovelhas, macacos, tartarugas, pombos e camundongos .

Após a administração da dose diabetogênica de aloxana os animais apresentam três fases características:

- uma hiperglicemia inicial entre 2 e 4 horas após a injeção.
- um período marcado de hipoglicemia que pode induzir convulsões entre 6 e 12 horas após a injeção.
- uma hiperglicemia crônica de longa duração que caracteriza o diabetes aloxânico, 24 horas após a injeção (DULIN e SORET, 1977).

Alterações histológicas têm sido constatadas nas Ilhotas de Langerhans cinco minutos após a administração da droga aloxana. Uma hora depois ocorre picnose nuclear (condensação e redução do núcleo), desintegração do citoplasma e

membranas que fazem parte do processo de necrotização, que completa-se em 24 horas.

A severidade do diabetes aloxânico depende do grau em que as células beta das ilhotas de Langerhans foram destruídas. Por outro lado, a duração da condição diabética depende da severidade. A insulina geralmente é administrada para manter os animais vivos por longos períodos (RERUP, 1970). A recuperação espontânea pode acontecer em consequência da multiplicação das células beta que sobreviveram ao ataque da aloxana ou a uma nova formação de células beta, a partir do epitélio do ducto da porção exócrina do pâncreas (BUNNAG et al, 1967). Portanto a condição diabética que se segue após o ataque da aloxana é devida a falta de insulina.

SCHNEIDER et al (1974) constataram uma menor absorção duodenal de cálcio em ratos diabéticos aloxânicos, comparada com a estimulação que ocorre em outros processos de transporte de nutrientes. Este efeito é importante uma vez que a diminuição na absorção de cálcio pode significar um acentuamento da osteoporose.

DIXIT e EKSTROM (1980) após estudarem a resistência mecânica de ossos de ratos diabéticos aloxânicos comparados com ossos de ratos normais e ratos tratados com insulina concluíram que: os ossos de ratos diabéticos são mais frágeis de que os dos animais normais; o tratamento com insulina é benéfico, mas não restaura totalmente a espessura cortical do osso e nem aumenta a resistência mecânica a fraturas dos ratos diabéticos a níveis normais; a porcentagem de cinzas ósseas não é alterada nos diabéticos.

Os autores acima citados publicaram posteriormente a comprovação do retardo na consolidação de fraturas em ratos diabéticos aloxânicos . O reparo ósseo foi quantitativamente determinado pela área do osso novo depositado dentro do sítio da fratura e pela incorporação de cálcio ao redor da região lesada. Em 21 dias 80% da falha óssea estava preenchida nos ratos controles, enquanto que somente 40% da falha óssea dos ratos diabéticos não tratados estava preenchida (DIXIT e EKSTROM, 1987).

Os resultados obtidos nestes estudos nos levaram a optar pelo uso da aloxana, na produção do diabetes, que além de ter sua ação diabetogênica bem referenciada é de fácil administração e administrada em dose única.

2.6.4 - Diabetes e Consolidação óssea

A primeira referência encontrada relacionando diabetes e fraturas data de 1934. ROOT et al (1934) associaram fraturas clínicas com anormalidades na deposição de cálcio em diabetes Melito. Estes autores constataram que: a falta de vitamina D ou a acidose prolongada provocam anormalidades na deposição de cálcio; os sais de cálcio não incorporados corretamente são depositados em outras regiões como artérias, rins e cristalino ocular, que acarretam danos severos.

HAMLIN et al (1975) associaram o diabetes Melito ao envelhecimento acelerado da molécula de colágeno humano. Através deste experimento os autores concluíram que embora o diabetes Melito não acelere o envelhecimento geral de todos os órgãos e tecidos, as fibras de colágeno diabéticas apresentam-se mais envelhecidas quando comparadas com as fibras do grupo controle.

Com o objetivo de avaliar a influência do diabetes Melito sobre o metabolismo ósseo, LEVIN et al (1976) mediram a massa esquelética em antebraços de pacientes com diabetes Melito tipo I e tipo II e compararam os resultados com controles equivalentes em idade e sexo. Os resultados mostram uma perda significativa da massa óssea em ambos os tipos de diabetes. Os autores concluem também que a perda de massa óssea independe do tempo de duração do estado diabético e que esta perda é maior em pacientes que recebem agentes hipoglicêmicos orais.

DIXIT e EKSTROM (1987) atribuíram a perda de massa óssea causada pelo diabetes à diminuição na deposição de cálcio no osso, que ocorre tanto no processo de formação e remodelagem óssea quanto na formação do sistema haversiano. O reparo ósseo precisa de uma constante disposição de cálcio, obtido através da absorção duodenal, que é prejudicada no diabetes. Estes achados sugerem que no diabetes a formação óssea sofre interferência dos seguintes fatores: a) diminuição na disponibilidade de vitamina D b) diminuição na absorção e retenção de cálcio c) diminuição na formação de colágeno d) diminuição na síntese de

glicosaminoglicanas e e) diminuição na síntese de glicoproteínas. E por fim os autores comprovaram que o processo de consolidação de fraturas é severamente retardado em diabetes e o tratamento com insulina melhora esta condição, mas vagarosamente.

Muitas das complicações crônicas do diabetes Mellito envolvem defeitos nos tecidos conectivos tais como cicatrização pobre, diminuição na formação óssea e diminuição no crescimento linear. O maior componente proteico destes tecidos é o colágeno. Por essa razão, SPANHEIMER et al (1988) analisaram a produção de colágeno em ossos de ratos diabéticos e constataram uma menor produção de colágeno tanto no osso quanto nas cartilagens, em uma redução de 52% e 51% respectivamente, quando comparadas ao grupo controle.

MATSUMOTO et al (1991) após induzirem diabetes em coelhos através da ingestão de altas quantidades de açúcar e analisarem radiografias destes animais concluíram que ocorrem alterações qualitativas (perda da estrutura típica dos canais Haversianos) nos ossos destes animais com o desenvolvimento de osteopenia no estado diabético.

BOUILLON (1992) estudou a influência da insulina sobre o plasma e a homeostase mineral óssea em ratos diabéticos e constatou que a ingestão de insulina normaliza as concentrações do fator de crescimento IGF-I e calcitonina que estão diminuídas nos ratos diabéticos, mas não estimula a mineralização óssea.

TOPPING et al (1994) baseados em estudos que mostram uma diminuição na resistência mecânica e quantidade total de colágeno na reparação de fraturas em ratos diabéticos padronizaram um modelo de fratura para investigar alterações na matriz extracelular durante a consolidação de fraturas em ratos normais e diabéticos. Segundo os autores, três tipos de colágeno são sintetizados. O tipo I e II são sintetizados pelo osso e células cartilaginosas, respectivamente, enquanto o tipo X é sintetizado pelos condrócitos hipertróficos na ossificação endocondral. Os autores observaram uma redução de 16% na produção deste tipo de colágeno em ratos diabéticos quando comparados com o grupo controle. A diminuição na produção do colágeno tipo X desempenharia um papel importante no retardo da consolidação de fraturas em diabéticos.

De acordo com os resultados publicados até o presente momento podemos dizer que a pobre formação óssea e retardo em consolidação de fraturas em

diabetes experimentais têm sido atribuída a diminuição na absorção duodenal de cálcio e a diminuição na formação de colágeno.

Estudos clínicos têm sido publicados com o objetivo de melhor entender e explicar as alterações ósseas a que estão sujeitos os pacientes diabéticos. Através de uma revisão na literatura apresentamos a seguir, seguindo uma ordem cronológica, resultados de pesquisas clínicas que, se não associam diretamente o diabetes a fraturas e retardos em processos de consolidação, colocam o diabetes Melito como um fator de risco diretamente ligado a estas alterações.

KATHOL et al (1991) estudaram radiografias e relatos clínicos de 61 pacientes com fraturas de calcâneo. Dentre estes, 21 pacientes eram diabéticos e 18 não tinham história de trauma significativa. O padrão de fratura encontrado é similar a fratura típica produzida por estresse.

ZIEGLER (1992) relata ter encontrado perda de massa óssea no diabetes tipo I, e que as complicações do diabetes podem influenciar o evento de fratura independente. Por outro lado, o diabetes melito tipo II parece fornecer alguma proteção contra a perda óssea: o aumento do tecido adiposo em conjunto com o excesso de peso parece ativar metabolicamente os hormônios esteróides.

MILGRAM (1993) descreve como complicação comum do diabetes Melito a osteomielite em pés e tornozelos.

O caso de uma paciente com diabetes Melito não-compensado associado a fraturas patológicas, ocorridas em um curto espaço de tempo e causadas pela osteoporose diabética é descrito por GLUSZEK (1993).

HORDON e WRIGHT (1994) sugerem que pode haver uma desordem endócrina (tireóide) precedente à perda de massa óssea. Embora não haja nenhum aumento na ocorrência de fratura em hiperparatiroidismo primário, o diabetes é associado a osteopenia que ocorre em pacientes com doenças na tireóide.

LOW e TAN (1995) relatam o resultado do atendimento com intervenção cirúrgica de 93 pacientes com fraturas de tornozelo. Entre estes pacientes, 10 eram diabéticos e 83 eram não diabéticos. Ocorreu infecção em 5 dos pacientes diabéticos. A infecção foi resistente em 2 pacientes que tiveram que amputar a perna, abaixo do joelho, e 3 pacientes curaram-se da infecção com

tratamento, embora um destes 3 tenha desenvolvido neuropatia na articulação do tornozelo e os outros 2 não tiveram suas fraturas consolidadas.

Dados cumulativos dos casos estudados indicam que o risco de fratura está aumentado no diabetes Melito, bem como ocorre um retardo na consolidação óssea de pacientes diabéticos.

3.0 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1- DESCRIÇÃO GERAL DO PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

O modelo animal escolhido foi o rato da raça Wistar, pelas seguintes razões: sua ampla utilização em pesquisas médicas e biomédicas; facilidade de manutenção, manuseio e padrão estabelecido das características que o animal apresenta no diabetes induzido pela aloxana.

A amostra foi composta de 40 animais machos, cujos pesos corpóreos variavam entre 200 e 300 gramas, mantidos no biotério do Laboratório de Bioengenharia da EESC/USP com fotoperíodo de 12 horas (12 horas com luz e 12 horas no escuro), ficando sob observação por um período mínimo de 2 dias, antes da utilização dos mesmos no experimento. Os animais foram alimentados antes e durante todo o experimento com ração sólida (PURINA) e água a vontade. Os níveis de glicemia e variações de peso corpóreo foram monitorados ao longo de todas as etapas do experimento.

Após o período de observação convencionado (2 dias), o diabetes Melito foi induzido em todos os animais, mediante a injeção de aloxana. Os animais comprovadamente diabéticos sofreram, em uma etapa posterior, osteotomia bilateral do terço médio da fíbula.

Vinte e quatro horas após a cirurgia iniciou-se a aplicação do ultra-som de baixa intensidade, por 10 dias consecutivos, em uma das fíbulas osteotomizadas, servindo a contralateral de controle.

Ao final do tratamento convencionado os animais foram sacrificados e os resultados foram avaliados mediante o emprego de técnicas radiológicas e histológicas.

3.2 - EQUIPAMENTO DE ULTRA-SOM

O aparelho utilizado foi um estimulador ultra-sônico de regeneração óssea cujo circuito eletrônico e transdutor ultra-sônico foram projetados e montados no grupo de Bioengenharia da EESC - USP, operando com os seguintes parâmetros:

- ultra-som pulsado
- Largura do pulso : 200 μ s
- Amplitude - 25V (pico a pico)
- Intensidade - 19,5 mW/cm² (SATA)
- Área do transdutor - 3,8 cm²
- Frequência de repetição do pulso - 1KHz
- Frequência do transdutor - 1.5 MHz

O equipamento de ultra-som foi calibrado periodicamente durante o período de duração dos experimentos a fim de que seus parâmetros continuassem sempre os mesmos. Estes parâmetros foram os mesmos utilizados em trabalhos experimentais realizados anteriormente por DUARTE (1977) E PILLA (1990).

3.3 - INDUÇÃO DO DIABETES ALOXÂNICO

Os animais ficaram em jejum prévio por 24 horas, pois nestas condições tornavam-se mais susceptíveis ao diabetes (RERUP,1970).

Após anestesia por inalação de éter etílico, os animais eram contidos em decúbito ventral, para receber uma injeção intra venosa (veia dorsal do pênis) de Aloxana (2,4,5,6 - Tetraoxypyrimidina; 5,6- Dioxyuracila) - SIGMA.

De uma solução estoque de 50 mg de Aloxana e 0.8ml de soro fisiológico (preparada no momento da sua utilização), aplicava-se 0.1 ml de solução a cada 100 gramas de peso corporal, resultando como dose final a relação de 62.5mg de Aloxana/ Kg de peso corpóreo.

Decorridas 6 horas após a injeção, os animais foram tratados com glicose adicionada à água (125g de açúcar /500ml de água) para evitar convulsões e morte, comuns na fase hipoglicêmica característica deste processo. Após 24 horas o açúcar era retirado da água (RERUP,1970) (DULIN e SORET, 1977).

Para constataremos o diabetes utilizamos o seguinte padrão de monitoramento glicêmico:

- glicemia 1 - verificação da glicemia antes da indução do diabetes.

- glicemia 2 - verificação da glicemia 72 horas após a indução do diabetes. Os animais que na glicemia 2 não apresentaram valores iguais ou superiores a 250 miligramas de açúcar por decilitro de sangue (mg/dl), foram descartados do experimento.
- glicemia 3 - verificação da glicemia no quinto dia do tratamento para confirmação da permanência do diabetes.
- glicemia 4 - verificação do diabetes no dia do sacrifício para avaliar qualquer processo de reversão do diabetes que pudesse ter se instalado.

O nível de glicemia dos ratos diabéticos foi em média 340mg/dl (ratos normais apresentam glicemia média de 56-76 mg/dl) .

O monitoramento da glicemia foi feito retirando-se sangue da veia da cauda, sendo colocada uma gota sobre fitas reagentes (da marca DEXTROSTIX) e a leitura feita em um GLUCOMETER (da marca AMES), no qual o resultado é fornecido em concentração de açúcar em miligramas por decilitro de sangue.

3.4 - PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

O osso escolhido para a realização da osteotomia foi a fibula, para minimizar os problemas de locomoção pós cirúrgica do animal. A osteotomia constou de corte transversal com a lâmina do bisturi no terço médio da fibula. As práticas cirúrgicas foram realizadas sob anestesia geral, por inalação de éter etílico.

A cirurgia foi realizada no terceiro dia após a indução do diabetes , quando o quadro de diabetes instalado era confirmado pela glicemia 2.

O procedimento cirúrgico obedecia à seguinte sequência:

- a) anestesia por inalação de éter etílico.
- b) tricotomia bilateral do membro inferior do animal (parte externa, região a ser osteotomizada).
- c) lavagem e limpeza de todo o membro.
- d) assepsia da área com mertiolate.
- e) administração de anestésico intra-muscular (cloridrato de trilocaína) próximo ao local a ser osteotomizado - CITOCAÍNA 3%(Lab. Cristália)

- f) acesso cirúrgico mediante incisão da pele, executada com bisturi montado com lâmina nº 15, na extensão de aproximadamente 1,5 cm, no sentido longitudinal e afastamento de tecido subcutâneo e músculos até se atingir o osso.
- g) exposição do osso e subsequente afastamento de todos os planos com afastador mantenedor.
- h) corte transversal do terço médio da fíbula com o bisturi.
- i) confirmada a separação completa dos cotos ósseos, tomou-se o cuidado de manter os fragmentos ósseos distal e proximal justapostos, sem a interposição de tecidos moles.
- j) sutura da pele com agulha odontológica e fio de seda trançada.
- k) desinfecção posterior da área com agente bactericida .

Todos os passos até aqui descritos foram repetidos bilateralmente. Após o procedimento cirúrgico radiografias foram tiradas para avaliações posteriores.

Durante as cirurgias e também no período pós-operatório foram tomadas todas as precauções de rotina para a prevenção de infecções ou complicações que pudessem influir na avaliação dos resultados. Ainda que os animais não apresentassem nenhum sinal de infecção, as mesmas medidas preventivas de limpeza da área antes e durante as aplicações do ultra-som foram tomadas.

Antibióticos não foram utilizados, uma vez que tais medicamentos poderiam vir a interferir no processo de síntese óssea alterando o resultado a ser obtido com o uso do ultra-som.

No decorrer do experimento os animais foram mantidos em gaiolas adequadas, em boas condições de higiene, uma vez que trocávamos a serragem, que servia de depósito de excrementos, todos os dias. Os animais permaneceram durante todo o experimento no Biotério do Laboratório de Bioengenharia - EESC/USP.

3.5 - TRATAMENTO (APLICAÇÃO DO ULTRA-SOM PULSÁTIL)

O tratamento iniciou-se 24 horas após a cirurgia, com aplicações diárias de ultra-som no sítio da osteotomia, por via transcutânea, com o transdutor estacionado. Para tal aplicação, o transdutor foi posicionado sobre a pele com auxílio de um gel hidrossolúvel (GEL CONTACT) como meio acoplante do transdutor.

Somente a osteotomia esquerda foi estimulada, ficando a osteotomia direita servindo como controle, isto é, passou pelos mesmos procedimentos, exceto o estímulo ultra-sônico.

As aplicações de ultra-som sobre as osteotomias tiveram duração de 20 minutos, conforme o proposto por DUARTE (1977), durante 10 dias consecutivos, tendo por finalidade avaliar os efeitos da energia ultra-sônica na fase precoce (inflamatória) e início da fase proliferativa da reparação óssea, consequentemente, durante a formação do “soft callus”(DYSON e BROOKES, 1983).

3.6 - COLETA DO MATERIAL

No dia seguinte ao término do tratamento (12^o dia após a osteotomia) os animais foram sacrificados por inalação excessiva de éter e imediatamente foram feitas novas radiografias.

Após o sacrifício as fíbula osteotomizadas foram separadas de suas partes moles, e com o auxílio de um bisturi foram retiradas e acondicionadas de acordo com a técnica a ser descrita, para posterior análise histológica.

3.7 - TÉCNICAS DE AVALIAÇÃO

3.7.1 - Técnica radiológica

Todos os animais foram radiografados ao final das cirurgias para avaliarmos o aspecto das osteotomias realizadas. Após o tratamento e sacrifício dos animais novas radiografias foram feitas para avaliarmos se houve ou não a formação do calo ósseo.

As radiografias foram feitas com um aparelho de raio X odontológico, com as seguintes especificações:

- voltagem - 115 volts - 60 Hz
- voltagem no tubo - 50 Kvp
- filtro - 2mm (al)
- foco de emissão - 0,8x0,8 mm

O filme de raio X utilizado foi o KODAK DENTAL FILM Size 4 EO - 41 oclusal.

3.7.2 - Técnica histológica

A análise histológica do material experimental foi obtido seguindo as seguintes etapas:

- 1) fixação das fibulas retiradas em solução de Bouin por 30 horas.
- 2) descalcificação da peça histológica usando solução de ácido tricloracético (TCA- 0,3 molar). O processo foi otimizado submetendo as peças em banho de TCA sob uma corrente AC de 50 mA, durante 7 dias.
- 3) neutralização das peças com solução de sulfato de sódio a 5%, por 24 horas.
- 4) pré-diafanização ou desidratação do material através de baterias crescentes de álcoois.
- 5) diafanização ou substituição do álcool presente na peça histológica pelo xilol.
- 6) inclusão em parafina.
- 7) realização de microtomia através de cortes longitudinais de 0,7 micra nas peças histológicas fixadas em suportes, na forma de blocos lapidados.
- 8) montagem dos cortes em lâminas.
- 9) desparafinização e rehidratação dos cortes das peças.
- 10) coloração com o uso dos corantes hematoxilina e eosina.
- 11) desidratação para montagem final das lâminas.
- 12) montagem definitiva utilizando uma pequena gota de bálsamo do Canadá ou "Permout" para o acoplamento de lâmina e lamínula.
- 13) etiquetagem e arquivamento.

4.0 - RESULTADOS

4.1 - AVALIAÇÃO RADIOLÓGICA

As radiografias dos animais foram divididas em grupo de fíbulas tratadas (fíbula esquerda) e grupo das fíbulas não tratadas (fíbula direita), ambas na mesma radiografia. Para um mesmo animal tivemos para análise uma radiografia após cirurgia e outra após o tratamento, conforme descrito anteriormente.

Após análise visual de todas as radiografias obtivemos o seguinte resultado:

As figuras 4.1.1 e 4.1.3 mostram ambas as fíbulas de dois animais após a realização das osteotomias. As figuras 4.1.2 e 4.1.4 mostram as radiografias das fíbulas dos mesmos animais, após o tratamento com ultra-som de baixa intensidade, realizado somente na fíbula esquerda. Como pode ser observado pela comparação dos pares formados por duas figuras, a fíbula estimulada exibe formação de calo ósseo como uma resposta positiva ao estímulo ultra-sônico, enquanto que as fíbulas dos animais diabéticos não tratadas, não mostram nenhum sinal de formação do calo ósseo.

É importante salientar que esse resultado repetiu-se com os outros animais deste experimento.

Figura 4.1.1 - Radiografia das fibulas(d) e (e) de um animal após as osteotomias.

Figura 4.1.2 - Radiografia das fibulas (d-direita) e (e-esquerda) do mesmo animal da foto anterior, após o tratamento com o ultra-som de baixa intensidade.

Figura 4.1.3 - Radiografia das fíbulas (d) e (e) de um animal após as osteotomias.

Figura 4.1.4 - Radiografia das fíbulas (d-direita) e (e-esquerda) do mesmo animal da foto anterior, após o tratamento com o ultra-som de baixa intensidade.

4.2 - AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

A avaliação histopatológica foi feita observando-se 23 lâminas, cada uma contendo cortes histológicos seriados, sendo 14 lâminas pertencentes ao grupo de osteotomias estimuladas e 11 pertencentes ao grupo controle, que não recebia estímulo ultra-sônico.

Nos cortes que incluíam as **osteotomias estimuladas** pudemos constatar: O perióstio estava refeito e exibia exuberante calo periosteal que invadia a área central da osteotomia com numerosos osteoblastos de permeio a fibroblastos jovens. A região da osteotomia estava refeita a custa do calo primário (já na fase de cartilagem, exibindo condrócitos hipertrofiados) e do calo periosteal. (Fig. 4.2.2) Espaços medulares e osteoclastos não são identificáveis, ainda.

De um modo geral, os calos externo e interno estão bem colagenizados, quase não ocorrendo a persistência de sequestros e outros resíduos.

As figuras 4.2.1, 4.2.2, 4.2.5 e 4.2.6 apresentam em dois aumentos, duas lâminas histológicas das fíbula esquerdas de dois animais, que foram tratados com a aplicação do ultra-som de baixa intensidade. Em ambas foi verificada a presença de osteogênese. Este evento repetiu-se na análise das outras lâminas deste grupo.

As preparações histológicas do **grupo controle** exibiam as seguintes características:

O perióstio não estava ainda refeito (Fig. 4.2.3).

A osteotomia, não refeita (aparece na fig. como uma zona vazia), de um lado exhibe numerosos fibroblastos e de outro (parte mais inferior da fig.), condrócitos hipertrofiados e um menor número de osteoblastos.

A desorganização do "calo primário" e periosteal fica mais acentuada quando se comparam as figuras das fíbula estimuladas e controles do mesmo animal (Figs. 4.2.5 e 4.2.6 e Figs. 4.2.7 e 4.2.8, respectivamente).

As figuras das fíbula não tratadas (4.2.3, 4.2.4, 4.2.7 e 4.2.8) apresentam o calo primário desorganizado, em algumas áreas há ainda um infiltrado de células sanguíneas.

Restos de tecido ósseo e osteoclastos reabsorvendo-os.

Menor quantidade de fibroblastos e de condrócitos.

As figuras 4.2.5 e 4.2.6 de osteotomias estimuladas apresentam um calo primário rico em condrócitos, sendo invadido por osteoblastos do calo periostal, o que garante uma continuidade do osso, através do "calo recém-formado".

LEGENDA DAS FIGURAS:

- # p - perióstio
- # v - zona vazia
- # f - fibroblastos
- # o - osteoblastos
- # c - condrócitos

Figura 4.2.1 - Corte longitudinal da região osteotomizada da fibula esquerda (tratada) de um rato diabético aloxânico. Coloração H&E. (Aumento : 100x)

Figura 4.2.2 - Corte longitudinal da região osteotomizada da fibula esquerda (tratada) de um rato diabético aloxânico. Coloração H&E. (Aumento: 200x)

Figura 4.2.3 - Corte longitudinal da região osteotomizada da fibula direita (controle) do mesmo animal das duas figuras anteriores. Coloração H&E. (Aumento: 100x)

Figura 4.2.4 - Corte longitudinal da região osteotomizada da fibula direita (controle), do mesmo animal das 3 figuras anteriores. Coloração H&E. (Aumento: 200x)

Figura 4.2.5 - Corte longitudinal da região osteotomizada da fibula esquerda (tratada) de um rato diabético aloxânico. Coloração H&E. (Aumento:100x)

Figura 4.2.6 - Corte longitudinal da região osteotomizada da fibula esquerda (tratada) de um rato diabético aloxânico. Coloração H&E. (Aumento:200x)

Figura 4.2.7 - Corte longitudinal da região osteotomizada da fíbula direita (controle) do mesmo animal das duas figuras anteriores. Coloração H&E. (Aumento:100x)

Figura 4.2.8 - Corte longitudinal da região osteotomizada da fíbula direita (controle) do mesmo animal das três figuras anteriores. Coloração H&E. (Aumento:200x)

5.0 - DISCUSSÃO

5.1 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

O objetivo das osteotomias foi o de produzir falhas ósseas no terço médio das fíbula dos animais. Esse osso foi escolhido por possuir boa vascularização sanguínea, por propiciar bons cortes histológicos, por oferecer facilidade na aplicação do ultra-som e por minimizar os problemas de locomoção pós-cirúrgica do animal. Essas assertivas decorrem de experiências anteriores nas quais a fíbula foi utilizada.

A existência de um "engaste" entre a fíbula e o terço médio da tíbia faz com que a carga de esforços seja parcialmente transferida a este último, diminuindo as possíveis interferências na consolidação óssea por locomoção e movimento do animal.

A área de osteotomia escolhida foi o terço médio da fíbula porque: a) o terço distal encontra-se muito próximo da tíbia, que poderia ser lesada cirurgicamente e b) no terço proximal se encontra o nervo ciático-poplíteo, que poderia ser lesado no ato cirúrgico.

A disposição anatômica da fíbula também propicia uma osteotomia com cirurgia aberta, pois há apenas uma estreita camada de tecidos moles e músculos entre o osso e o meio exterior, fato que favorece o acesso cirúrgico e reduz a ocorrência de possíveis transtornos no período pós-operatório. Estando o osso sob visão direta, torna-se mais fácil a realização de osteotomias padronizadas em todos os animais.

Embora tivéssemos utilizado inicialmente uma amostra de 40 animais, 23 deles foram descartados durante o experimento. Deste total, 11 animais não ficaram diabéticos com a administração da droga; 8 animais foram à óbito em razão da severidade do diabetes Melito instalado (glicemia superior a 339 mg/dl), no prazo de 72 horas após a indução; 3 animais reverteram o quadro de diabetes instalado no decorrer do tratamento e foram desconsiderados; e somente um rato diabético morreu durante o tratamento, mas a causa mortis foi parada cardíaca por inalação excessiva de éter etílico.

Os ratos diabéticos sobreviventes, apesar de consumirem mais água e ração que os não diabéticos, apresentaram perda de peso corpóreo em média de 15% no final do experimento.

Com relação às radiografias dos 17 animais destinados aos testes, faz-se necessário dizer que não foi possível analisar todas as osteotomias, o que daria uma amostragem de 68 osteotomias, divididas em 34 pós-cirúrgicas e 34 pós-tratamento. Em cada grupo teríamos 17 estimuladas (fibulas esquerdas) e 17 controles (fibulas direitas). A análise de todas as radiografias não foi possível porque, no momento em que algumas das radiografias foram obtidas, a superposição da tíbia sobre a fibula, determinada pela má posição do membro inferior do animal, impediu a visualização das osteotomias e dos possíveis efeitos do tratamento realizado.

No entanto, pudemos analisar 55 osteotomias, sendo 27 pós-cirúrgicas e 28 pós-tratamento. No primeiro grupo 13 eram de fibulas direitas e 14 de fibulas esquerdas e no segundo grupo, 15 eram de fibulas direitas e 13 eram esquerdas.

Com relação a avaliação histológica, podemos dizer que, das 34 lâminas esperadas, somente foi possível analisar 23, sendo 14 lâminas de fibulas tratadas e 9 do grupo controle. No entanto, foi possível analisar comparativamente as duas fibulas de um mesmo animal, conforme o propósito inicial deste trabalho.

5.2 - TRATAMENTO

A escolha do número de dias de tratamento (10 dias), período utilizado no presente trabalho, baseou-se nos experimentos de DYSON e BROOKES (1983) e DUARTE (1977), que demonstram serem os efeitos da energia ultra-sônica mais efetivos durante as primeiras duas semanas após a osteotomia, ou seja, durante as fases inflamatória e proliferativa iniciais do processo de reparação.

No decorrer do experimento nenhum animal foi a óbito entre a cirurgia e o sacrifício por complicações do diabetes aloxânico: ou eles morreram dentro das 72 horas iniciais após a indução do diabetes experimental, ou eles sobreviveram a todo o experimento (exceto o animal que morreu durante a anestesia, por inalação excessiva de éter etílico).

5.3 - RESULTADOS

O propósito inicial deste trabalho foi avaliar os efeitos da aplicação do ultra-som de baixa intensidade, após 10 dias de aplicação através da análise da qualidade do osso formado, mediante avaliações radiológicas e histológicas comparativas entre fíbulas tratadas e fíbulas não tratadas de um mesmo animal.

O fato de algumas radiografias não se prestarem para a análise radiológica, não interferiu na avaliação do experimento, tendo sido possível cumprir a proposta inicial de comparar dados de um mesmo animal, obtendo os resultados já mencionados.

Ainda com relação aos resultados radiológicos podemos dizer que , embora não fizesse parte da proposta inicial, a análise comparativa entre fíbulas de ratos diabéticos não tratadas com fíbulas de ratos normais, parece indicar um retardo no tempo de consolidação óssea no primeiro grupo, dado este que, se melhor estudado, pode se coadunar com resultados existentes na literatura, como os resultados obtidos por DIXIT e EKSTROM (1987).

Histologicamente, conforme a análise realizada, as lâminas das fíbulas tratadas apresentam características que indicam a ossificação endocondral que ocorre em ossos longos, onde há a substituição de um modelo cartilaginoso por matriz óssea (JUNQUEIRA et al, 1989).

Frente à revisão da literatura, os resultados aqui obtidos assemelham-se a outros trabalhos experimentais e clínicos onde se empregou terapeuticamente o ultra-som nos processos de reparação, dentro da metodologia proposta por DUARTE (1977).

HILÁRIO (1993) obteve resultados positivos utilizando tratamento semelhante na cicatrização de úlceras varicosas crônicas.

NOLASCO (1993) também chegou a resultados positivos com a aplicação de ultra-som de baixa intensidade sobre a cicatrização da pele de ratos diabéticos aloxânicos.

5.3.1 - Atuação do ultra-som na consolidação óssea

O ultra-som foi usado inicialmente como agente terapêutico primário na estimulação do reparo de tecidos moles (DYSON, 1970). O reparo do tecido ósseo tem muito em comum com o reparo dos tecidos moles. Ambos mostram fases similares no processo de reposição celular : fases de inflamação, proliferação e remodelagem. Células similares estão ativamente envolvidas nos estágios iniciais de ambos processos. Estas células incluem leucócitos polimorfonucleares, macrófagos, fibroblastos, células endoteliais e da matriz óssea.

Resultados científicos dos experimentos com energia ultra-sônica na consolidação óssea afirmam que o ultra-som é mais efetivo durante os primeiros 15 dias após a fratura (fases inflamatória e início da fase proliferativa), quando haveria componentes receptivos ao estímulo do ultra-som. As células encontradas nas fases iniciais dos processos de reparação contém uma variedade de mediadores químicos e agentes quimiotácteis, que são armazenados no interior das mesmas e poderiam ser liberados quando as ondas ultra-sônicas atingissem estas células. A liberação destes agentes provoca alterações nas membranas celulares e o envolvimento no transporte de íons para o interior das células (DYSON e BROOKES, 1983).

Possivelmente a perturbação na membrana celular, induzida pela energia ultra-sônica aumentaria também o transporte de íons cálcio na população celular formadora do calo ósseo.

A liberação de agentes químicos igualmente estimula a presença de fibroblastos e células endoteliais no sítio lesado. As células endoteliais são essenciais para a formação de novos capilares (vasos neoformados), que transportam os metabólitos para o tecido em reparação. Há evidências na literatura de que tanto a atividade fibroblástica como a angiogênese podem ser afetadas pelo ultra-som, de maneira a conduzir a aceleração do reparo do tecido (YOUNG, 1988).

Estes dados são de grande importância uma vez que o estado diabético apresenta deficiências em processos de reparação e regeneração.

Neste trabalho, constatamos que nos casos tratados houve clara influência positiva do ultra-som de baixa intensidade , ocasionando

intensificação do processo reparativo do tecido ósseo, durante o período observado, se comparado ao ocorrido no grupo de casos não tratados.

5.4.1 - Prováveis mecanismos responsáveis pelos resultados obtidos

As ondas ultra-sônicas quando atravessam os tecidos biológicos provocam alterações, algumas podendo ser positivas, provocando o reparo da pele, de tendões , assim como de fraturas ósseas. Outras alterações podem ser danosas, levando a destruição de células e tecidos. Quaisquer que sejam as modificações causadas , estas dependem dos parâmetros do aparelho de ultra-som, assim como sua forma de utilização .

Os resultados obtidos por este experimento são animadores e nos estimulam a estudar mecanismos através dos quais o ultra-som influencia a reparação de tecido ósseo.

A existência de cargas elétricas no osso é imprescindível ao seu desenvolvimento e à reparação de fraturas.

Segundo XAVIER e DUARTE (1983), quando se utiliza terapeuticamente o ultra-som na consolidação de fraturas, as cargas elétricas necessárias ao reparo ósseo, são produzidas no osso por meio do efeito piezoelétrico. O ultra-som pulsado atinge a superfície do osso por uma sucessão de impulsos, cada um deles resultando em um sinal elétrico como resposta do tecido. Daí por diante, o processo de crescimento do osso é regulado pelo campo elétrico assim formado, e o metabolismo ósseo é estimulado bioeletricamente. Em outras palavras, o osso converte energia mecânica em energia elétrica (BASSET et al, 1974).

SHAMOS et al (1963) afirmam que campos eletromagnéticos resultantes das cargas de superfície podem influenciar a orientação e deposição de íons ou moléculas polarizáveis. Acredita-se que o ultra-som possa atuar nesse mecanismo através das alterações das cargas de superfície provocadas pelo efeito piezoelétrico.

BASSET et al (1962) sugerem que fatores mecânicos podem direcionar o padrão de deposição e remodelagem óssea. No caso do nosso trabalho, o fator mecânico é o ultra-som.

A intensidade do ultra-som utilizada no presente experimento esteve abaixo do limiar de 100mW/cm^2 , preconizado por HILL (1972), para que não ocorresse cavitação, que poderia interferir tanto no líquido intersticial, quanto no equilíbrio hídrico celular, agindo como fator negativo para a desaceleração de processo de reparo ósseo.

A absorção de energia depende da frequência. A intensidade da onda acústica diminui com a profundidade dos tecidos, que serão atravessados pelo feixe ultra-sônico (WELLS, 1977).

DUARTE (1977) (1983), trabalhando com fraturas em coelhos encontrou resultados similares variando a frequência entre 1,65 e 10 Mhz. Os resultados que foram obtidos nessa pesquisa utilizaram frequência de repetição de 1MHz.

O autor acima citado afirma também que a variação de temperatura, devido a absorção de energia pelos tecidos, é desprezível e insuficiente para criar potenciais piroelétricos. Portanto, o maior efeito elétrico do ultra-som não é causado por mecanismo térmico.

JOHNSON et al (1980) têm postulado que os efeitos eletromecânicos no osso, em condições de umidade, não são devido apenas à piezoelectricidade, mas que algum outro mecanismo estaria envolvido neste processo, tendo-se observado maior amplitude do sinal elétrico em tecidos vivos.

Dentro deste enfoque, a hipótese mais aceita aponta o microfluxo acústico como o principal responsável pelos sinais elétricos derivados do estresse mecânico do osso. Microfluxo acústico são movimentos unidirecionais produzidos pela pressão de radiação, quando um feixe ultra-sônico move-se em um meio compressível, tais como suspensões celulares ou tecidos (FERRARI, 1987).

Segundo DUARTE (1983), o sinal elétrico detectado como proveniente do tecido ósseo, na verdade pode ser a somatória dos potenciais elétricos gerados pelo osso, músculo, tendões, pele e outros tecidos constituídos de colágeno.

De acordo com SILVA (1987), os eventuais potenciais piezoelétricos gerados pelas células do tegumento são de curto alcance e não atuam sobre as células osteogênicas envolvidas no processo de reparo. Estas são afetadas somente pelos potenciais piezoelétricos provenientes do colágeno ósseo junto ao traço de fratura.

É possível portanto que, os mecanismos piezoelétrico ou de microfluxo acústico, ou ambos, atuando de forma sinérgica, tenham contribuído para que as osteotomias estimuladas pelo ultra-som de baixa intensidade, se apresentassem em um estágio mais adiantado de regeneração do que as osteotomias controles, como ficou evidenciado tanto no aspecto radiológico quanto no histológico.

6.0 - CONCLUSÕES

O presente trabalho teve como propósito inicial investigar uma possível ação estimulatória do ultra-som pulsado, de baixa intensidade, na consolidação óssea de osteotomias praticadas em ratos diabéticos aloxânicos, nas fases inflamatória e proliferativa do processo de reparação óssea.

Nossos resultados se coadunam com as seguintes conclusões:

- 1 - O calo periosteal formou-se mais rapidamente nas osteotomias tratadas que nas controles.
- 2 - Os ossos estimulados apresentaram, no tempo, uma evolução mais acentuada da consolidação da osteotomia.
- 3 - Sob microscopia óptica não constatamos quaisquer tipos de lesões que pudessem ser atribuídas à energia ultra-sônica, nos padrões utilizados.
- 4 - Os resultados radiológicos são compatíveis com os achados histopatológicos, no sentido de confirmar uma regeneração óssea mais acentuada nos animais tratados.

O conjunto de resultados nos permite concluir que o ultra-som pulsado de baixa intensidade, mesmo na decorrência do diabetes Melito induzido pela aloxana, estimula o reparo ósseo das osteotomias experimentais.

6.1 - CONSIDERAÇÕES E SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS

Os resultados obtidos no presente trabalho revelaram a possibilidade de novas investigações :

Em experimento semelhante conduzir a investigação dos efeitos do ultra-som de baixa intensidade numa fase tardia do diabetes instalado.

Outro experimento seria um estudo semelhante, empregando técnicas de eletroforese, para a identificação dos tipos de colágeno sintetizado e a reação mecânica dos ossos tratados.

Dos resultados aqui obtidos e daqueles obtidos em outros tecidos achamos, selecionar eventuais patologias ósseas de diabéticos (pseudoartrose, fraturas de extremidades) para aplicação clínica da energia ultra-sônica pulsada.

7.0 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ATHENSTAEDT, H. Permanent Longitudinal Electric Polarization and Piezoelectric Behavior of Collagenous Structures and Nervous Tissue in Man and other Vertebrates. London, **Nature**, v. 28, n.228, p.830-834, Nov,1970.

BAKER, J. L & HAUGH, C.G. Mechanical Properties of Bone: a review. **Transaction of ASAE**, p.678-687, 1979.

BASSET, C.A.L.; PAWLUK, R.J.; PILLA, A.A.. The Acceleration of Fracture Repair by Eletromagnetic Fields : a surgically non-invasive method . **Annals**. New York Academy of. Sciences, Nova York, v. 238, p. 242-261, 1974.

----- Biophysical Principles Affecting Bone Structure. In: **Biochemistry and Physiology of Bone**, 2ed. New York, Academic Press, 1971. p.1-69.

BASSET, C.A.L. Beneficial Effects of Electromagnetic Fields. **J. Cell Biochem.**, v.51, n.4, p.387-93, Apr 1993.

BASSET, C.A.L et al. Effects of Electric Currents on Bone In Vivo. **Nature**, London, v. 204, p.643-644, 1964.

BASSET, C.A.L. Segmentation of Bone Repair by Inductive Coupled Electromagnetic Fields. **Science**, v.184, n.3, p. 575-577, May ,1974.

BASSET,C.A.L.; BECKER, R.O. Generation of Eletric Potentials by Bone in Response to Mechanical Stress. **Science**, v.137,p.1063-1064, Sep.,1962.

- BOUILLON, R. Diabetic Bone Disease: low turnover osteoporosis related to decreased IGF-I production. Belgium, **Ver. K. Acad. Geneesk.**, v.54, n.4, p. 365-91, 1992.
- BRIGHTON, C.T. et al. Treatment of Nonunion with Constant Direct Current. **Clinical Orthop.**, v.124, p.106-123, May, 1977.
- BROWNSB, S.A.; BEE, M.B.M. Ultrasonic Assesment of Early Callus Formation. **Biomedical Engineering**, v.136, p.124-127, April, 1976.
- BUNNAG, S.C. et al. Effect of Alloxan on the Mouse Pancreas During and After Recovery from Diabetes. **Diabetes**, v.16, p.83, 1967.
- CAMPOS, D.P.R. Diabetes Melito: considerações, diagnósticos, classificação e controle. **LAES/HAES**, p. 20-48, dez 91-jan 92.
- CARDOSO, A.C.; DUARTE, L.R.; FERRARI, I. Effects Induced by Ultrasound at the Chromosome Level. (aguardando publicação). 10p.
- COHEN, K. Can Collagen Metabolism Be Controlled: theoretical considerations. **Journal of Trauma**, v. 25, n.5, p. 410-412, May, 1985.
- COLOMBO, S. J. M. Efeitos da variação da intensidade acústica na consolidação ultra-sônica de fraturas experimentais. São Carlos, 1993, 57p. **Dissertação** (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos/Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
- CZECH, M. P. Insulin Action . **The American Journal of Medicine**, v. 70, p. 142-150, January, 1981.
- DAMASK, A.C. **Medical Physics**. New York, Academic Press, 1978. Cap.5, p.121-145.

DIXIT, P.K.; EKSTROM, R.A. Decreased Breaking Strength of Diabetic Rat Bone and its Improvement by Insulin Treatment. **Calcified Tissue International**, v.32, p.195-199, 1990.

----- Retardation of Bone Fracture Healing in Experimental Diabetes. **Indian Journal of Medical Research**, p. 426-435, April, 1987.

DULIN, W.E.; SORET, M.G. Chemically and Hormonally Induced Diabetes. In: VOLK, B.W.; WELMANN, K.F., eds **The Diabetic Pancreas** New York, Plenum Press, 1977.

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.

DUARTE, L.R. The Stimulation of Bone Growth by Ultrasound. New York, **Archives of Orthopaedic and Traumatic Surgery**, v. 101, p. 153-159, 1983.

DYSON, M. Mechanisms Involved in Therapeutic Ultrasound. London, **Physioterapy**, v.73, n.3, p.116-120, Mar, 1987.

DYSON, M. Role of Ultrasound in Wound Healing . In: KLOTH, L.C. et al., eds. **Alternatives in Wound Management**. Philadelphia, F.A. Davis, 1990.p.259-284.

DYSON, M. ; BROOKES, M. Stimulation of Bone Repair by Ultrasound. Oxford, **Ultrasound in Medicine and Biology**, n.2, p. 61-66, 1983.

DYSON , M. et al. Stimulation of Tissue Regeneration by Pulsed Plane-Wave Ultrasound. **IEEE Transaction on Sonics and Ultrasonics**, v.17, p. 133-140, 1970.

FUKADA, E. ; YASUDA, I. On Piezoelectric Effect of Bone. **Journal of Physical Society of Japan**, v.12, n.10, p.1152-1162, Oct., 1957.

----- Piezoelectric Effects in Collagen. Tokyo, **Japanese Journal of Applied Physics**, v.3, n.2, p.117-121, Feb, 1964.

FERRARI, A. L. Estudos dos mecanismos de cavitação em meio biológico. São Carlos, 1987, 133p. **Dissertação (Mestrado)** - Escola de Engenharia de São Carlos/Faculdade de Medicina Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

GANONG, W.F. **Fisiologia Médica**. 4 ed. São Paulo, Ateneu, 1983. 655p.

GEPTS, W. & LECOMPTE, M.P. The Pancreatic Islets in Diabetes. **The American Journal of Medicine**, v. 70, p. 105-115, Jan., 1981.

GLUSZEK, J.; KOSICKA, T.; RASZEJA, WANIC, B. Osteoporosis in Insulin Dependent Diabetes. **Pol. Tyg. Lek**, v.48, n.1-2, p.36-8, Jan., 1993.

GOMORI, G. & GOLDNER M. G. Production of Diabetes Mellitus in Rats with Alloxana. **Proc. Soc. Expl. Biol.**, v. 54, p. 287-290, 1943.

GOODSON, W.H. III, HUNT, T. K. Studies of Bone Healing in Experimental Diabetes Mellitus. **Journal of Surgical Research**, v. 22, p.221-227, 1977.

GRODSKY, G. M. ; ANDERSON, C. E. et al. Metabolic and Underlying Causes of Diabetes Mellitus. **Diabetes**, v. 31, Suplemento 1, 1982.

HAAR, G.T. Physic of Therapeutic Ultrasound. London, **Physiotherapy**, v. 73, n.3, Mar, 1987.

HAMLIN, C.R et al. Apparent Accelerated Aging of Human Collagen in Diabetes Mellitus. **Diabetes**, v.24, n.10, p.902-904, Oct., 1975.

HILÁRIO, M.L. Radiação ultra-sônica de baixa intensidade na reparação tecidual de úlceras tróficas de perna. São Carlos, 1993, 153p. **Dissertação (Mestrado)** - Escola de Engenharia de Carlos/Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

HILL, C.R. Ultrasonic Exposure Threshold for Changes in Cell and Tissues. **The Journal of the Acoustical Society of America**, v.52, p.667-672, 1972.

HORDON, L.D.; WRIGHT, V. Endocrine Disorders. **Curr. Opin. Rheumatol.**, v.6,n.1, p.95-100, Jan., 1994.

ISHIBASHI, F. et al. Alloxan Action on Glucose Metabolism in Cultured Fibroblasts. I. Stimulation and Inhibition of Glucose Utilization. **American Journal Physiol.** 240 (Endocrinol.. Metab.3): E640-E644, 1981.

JANSSON, L. ; SANDLER, S. Alloxan-Induced Diabetes in the Mouse: time course of pancreatic B -cell destruction as reflected in an increased islet vascular permeability. **Virchows Arch A [Pathol Anat.]**, v. 410, p 17-21, 1986.

JOHNSON, M.W. et al. Comparison of the Electromechanical Effects in Wet and Dry Bone. **J. Biomech.**, v.13, p.437-442, 1980.

JUNQUEIRA, L. C. ; CARNEIRO, J.; KELLEY, R.O. **Basic Histology**. 6ed. Connecticut, Prentice-Hael, 1989. 514p.

----- **Histologia básica** . 3 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1974. 482p.

KATHOL, M.H. ; EL KHOURY, G.Y.; MOORE, T.E; MARSH, J.L. Calcaneal Insufficiency Avulsion Fractures in Patients with Diabetes Mellitus. **Radiology**, v.180, n.3, p.725-9, Sept., 1991.

KEEN, H. **Complications of Diabetes.** London, Edward Arnold, 1975.

KOBERLE, G. Estudos físicos e biológicos em tecido ósseo. Ribeirão Preto, 1974, 144p. **Tese** (Livre Docência) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

KOHN, R. R. ; SCHINIDER, S. L. Glucosylation of Human Collagen. **Diabetes**, v. 31, n.3, p.47-51, June., 1982.

KÜNEL, W. **Atlas de citologia: histologia e anatomia microscópica para teoria e prática.** Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1991. 409p.

LEME, J. G., et al. Influence of Diabetes Upon the Inflammatory Response of the Rat.: a pharmacological analisis. **Journal of Pharmacology**, v. 23,p. 74-81, 1973.

LEVIN, M.E. et al. Effects of Diabetes Mellitus on Bone Mas in Juvenile and Adult -Onset Diabetes. **The New England Journal f Medicine**, v.294, n.5, p.241-245, Jan., 1976.

LOW, C.K; TAN, S.K. Infection in Diabetic Patients with Ankle Fractures. Singapore, **Ann. Academ. Med.**, v.24, n.3, p.353-5, May, 1995.

MANSFORD, K. R. L. ; OPIE, L. Comparison of Metabolic Abnormalities in Diabetes Mellitus Induced by Streptozotocin or by Alloxan. **The Lancet**, 1968.

MASON, W. P. Piezoelectricity, its History and Applications. **Journal Acoust. Soc Am.** v. 70, p. 1561-1566, 1981.

MATSUMOTO, M. ; GORIYA,Y. ; SEKIMOTO, H. Osteopenic Changes in High Sugar Diet-Induced Diabetic Rabbits (HSDD-R). **Diabetes Res.** ,v.18, n.3, p.115-22, Nov., 1991.

McMURRY, J. F. Wound Healing with Diabetes Mellitus. **Surgical Clinics of North America**, v. 64, n. 4, Aug., 1984.

MELLER, et al. Parathyroid Hormone, Calcitonin, and Vitamina D Metabolites During Normal Fracture Healing in Humans. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, n.183, Mar, 1984.

MILGRAM, J.W. Osteomyelitis in the Foot and Ankle Associated with Diabetes Mellitus. **Clin. Orthop.**, n.296, p.50-7, Nov., 1993.

MOHAN, S.; BAYLINK, D.J. Bone Growth Factors. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, n.263, p.30-48, 1991.

MOHANAM, S.; BOSE, S. M. Influence of Streptozotocin- and Alloxan-Induced Diabetes in the Rat on Collagenase and Certain Lysosomal Enzymes in Relation to the Degradation of Connective Tissue Proteins. **Diabetologia**, v.25, p.66-70, 1983.

MORTIMER, A. I.; DYSON, M. The Effect of Therapeutic Ultrasound on Calcium Uptake in Fibroblasts. **Ultrasound in Med. & Biol.** v.14, p.499-506, 1988.

MUMMERY, 1978 apud YOUNG, S.R.; DYSON,M. Macrophage Responsiveness to Therapeutic Ultrasound. **Ultrasound in Medicine and Biology**, v.16, n.8, p.809-816, 1990.

NOLASCO, M. A. Efeitos da estimulação ultra-sônica sobre a cicatrização da pele de ratos diabéticos. São Carlos, 1 993, 62p. **Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos/Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo..**

OKUNO, E.; CALDAS, I.L. CHOW, C. . **Física para Ciências Biológicas e Biomédicas.** São Paulo: Harbra,1986.

OKUNO, E. ;CALDAS, I.L. ;CHOW, C. O Ultra-som aplicado à medicina. In: **Física para ciências biológicas e biomédicas**. São Paulo, Harper Row do Brasil, p. 238-250 , 1982.

PÁDUA, J.M. Efeito do Ultra-som no processo de reparo de fraturas do osso zigomático de ratos: avaliação histomorfológica. Porto Alegre, 1990, 78p. **Dissertação (Mestrado)** - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

PERES, E. **Diagnóstico de Diabetes Mellitus**. Apartado, Lisboa , Roche Farmacêutica Química, Serviço de Informação Científica, 1975.

PILLA, A.A. et. al. Acceleration of Bone Repair by Pulsed Line Wave Ultrasound: Animal, Clinical and Mechanistic Studies. In: BRIGHTON, C.T.; POLLACK, S.R. eds. **Electromagnetics in Medicine and Biology**. San Francisco, San Francisco Press, Jun 1991. p.331-341.

PILLA, A.A. et al. Non-Invasive Low Intensity Pulsed Ultrasound Accelerates Bone Healing in the Rabbit. New York , **Journal of Orthopaedic Trauma**, v.4, n.3, p. 246-253, 1990.

RERUP, C. C. Drugs Producing Diabetes through Damage of the Insulin Secreting Cells. **Pharmacology Review**, v.22 , p. 485-518, 1970.

ROBBINS, S. T. et al . **Patologia estrutural e funcional**. 3 ed. Rio de Janeiro, Interamericana , 1986. 1403p.

ROOT, H.F. et al. Abnormalities of Calcium Deposition in Diabetes Mellitus. **Archives of Internal Medicine**, v.53, p.46-53, 1934.

RYABY, J.T. et al. Low Intensity Pulsed Ultrasound Increases Calcium Incorporation in Both Differentiating Cartilage and Bone Cell Cultures. **Thirty-Fifth Annual Meeting Orthopaedic Research Society**, Vegas, Nevada, Feb. 1989.

SARVAZYAN, A. P. Some General Problems of Biological Action of Ultrasound. **IEEE Transactions on Sonics and Ultrasonics**, v.30, n.1, p. 2-12, Jan. 1983.

SCHNEIDER, L.E. et al. Effects of Alloxan Diabetes on Duodenal Calcium-Binding Protein in the Rat. **American Journal of Physiology**, v.227, n.4, Oct., 1974.

SHAMOS, M.H.; LAVINE, L.S. Piezoelectricity as a Fundamental Property of Biological Tissues. **Nature**, v. 213, p.267-269, 1967.

----- Piezoelectric effect in bone. **Nature**, London, v.197, p.81, 1963.

SILVA, O. L. Estudo do mecanismo de ação do ultra-som na estimulação do crescimento ósseo. São Carlos, 1987, 209p. **Dissertação (Mestrado)** - Escola de Engenharia de São Carlos /Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. 215p.

SPANHEIMER, R.G. et al. Decreased Collagen Production in Diabetic Rats. **Diabetes**, v.37, p. 371-376, April ,1988.

TOLLINGER, C. D. ; CHRISMAN, C. L. ; DOOLITTLE, D. P. Alloxan-Induced Aneuploidy in Mice. **The Journal of Heredity**, v. 65 p. 345-348, 1974.

TOPPING, R.E.; BOLANDER, M.E.; BALIAN, G. Type X Collagen in Fracture Callus and the Effects of Experimental Diabetes. **Clin. Orthop.**, n.308, p.220-8, Nov., 1994.

- WANG, S. J. et al. Low Intensity Ultrasound Treatment Increases Strength in a Rat Femoral Fracture Model. **Journal Bone and Joint Surgery**, v.12, p.40-47, 1994.
- WELLS, P.N.T. **Biomedical ultrasonics**. London, Academic press, 1977, 635p.
- WILLIAMS, R. Production and Transmission of Ultrasound. London, **Physiotherapy**, v.73, n.3, p.113-116, 1987.
- WOLFF, J. **Das Gesetz der Transformation der Knochen**. Berlin, A. Hirschwald, 1892.
- XAVIER, C. M. A. & DUARTE, L. R. Estimulação Ultra-Sônica do Calo Ósseo. **Revista Brasileira Ortopédica**, v. 18 , n. 3, p. 73-80, 1983.
- XAVIER, C. M. A. & DUARTE, L. R. Treatment of Non-Unions by Ultra-Sonic Stimulation. In : 54th Annual Meeting of American Academy of Orthopaedic Surgeons. **Anais**. San Francisco, 1987.
- YASUDA, I. Electrical Callus and Formation by Electret. **Clin. Orthop.**, v.124, p.53-56, May ,1977.
- YOUNG, S.R.; DYSON, M. Macrophage Responsiveness to Therapeutic Ultrasound. **Ultrasound in Medicine and Biology**, v.16, n.8, p.808-816, 1990.
- YOUNG, S.R. The effect of therapeutic ultrasound on the biological mechanisms involved in dermal repair. **PhD thesis**, University of London, 1988. 412p.
- ZIEGLER, R. Diabetes Mellitus and Bone Metabolism. **Horm. Metab. Res.**, Supl.1, v.26, p. 90-94, 1992.

ZHAO, Z. H.; WATSCHINGER, B. ; BROWN, C. D. ; BEYER, M. M. ;
FRIEDMAN, E. Variations of Susceptibility to Alloxan Induced Diabetes in the
Rabbits. **Horm. Metabol. Res.** , v. 19, p. 534-537, 1987.