VANESSA LIRA LEITE

**ESTUDO COMPARATIVO DO EFEITO DO ULTRA-SOM DE 1 MHz COM
FREQUÊNCIA DE REPETIÇÃO DE PULSO A 100 Hz E 16 Hz NO
TRATAMENTO DE FRATURA DE FÍBULA DE RATO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Bioengenharia.

Orientador: Dr. Orivaldo Lopes da Silva

SÃO CARLOS

2005

**Este trabalho é dedicado ao meu filho
João Pedro, razão da minha vida, fonte
de amor eterno e esperança de um
mundo bem melhor.**

AGRADECIMENTOS

Em especial à minha família: minha mãe **Graça**, meu pai **Wanderley**, minha irmã **Viviane** e meu irmão **Vander**, que nos momentos mais difíceis de minha trajetória sempre estiveram por perto, representando meu porto seguro. Pelo amor e apoio incondicional em todos os momentos permitindo a concretização dos meus ideais.

Ao professor **Nivaldo**, querido orientador, pela confiança concedida desde o primeiro momento e pela oportunidade de trabalho.

Ao professor **Orivaldo**, pela disponibilidade, atenção e conhecimento transmitido durante momentos importantes para a conclusão deste trabalho.

Ao professor **Wagner**, pela paciência e atenção dedicada durante o ensino da técnica cirúrgica de fratura de fíbula e participação na análise dos exames radiológicos.

Ao professor **Pereira**, coordenador do programa da Bioengenharia, pela atenção, paciência e boa vontade durante todo meu curso na pós-graduação.

Aos **professores** do Departamento Interunidades em Bioengenharia de São Carlos pelos ensinamentos nesta nova área de atuação na minha carreira.

A todos os **amigos e amigas** que cursaram comigo as disciplinas do Programa de pós-graduação em Bioengenharia pelo compartilhamento de esperanças e vitórias e pelos momentos de descontração.

À **Janete** e a **Melaine** pela paciente ajuda sempre que foi necessária.

A **todos** que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Professora **Cibele**, minha co-orientadora neste trabalho, mas verdadeira Mestra em minha vida, que me iniciou na carreira científica e sempre me motivou a seguir em frente. Agradeço pela dedicação, disponibilidade, paciência e alegria que esteve presente em nossos encontros onde sempre acontecia um novo aprendizado.

À **Estela Sant'Anna Vieira Douat**, companheira de viagens e estudos, seu otimismo, sensatez e paciência foram alavancas para meu progresso nos momentos mais delicados. Você é uma verdadeira amiga, que colaborou definitivamente na condução deste trabalho e continua me estimulando para futuros projetos, a você meus sinceros agradecimentos.

“O aprendizado é uma atividade criativa. Somos levados a aprender pela promessa de prazer, que é atingida quando aprendemos algo... Com prazer, a vida é uma aventura criativa; sem ele é uma luta pela sobrevivência”.

Alexander Lowen

RESUMO

LEITE, V. L. **Estudo comparativo do efeito do ultra-som de 1MHz com frequência de repetição de pulso de 100 Hz e 16 Hz no tratamento de fratura de fibula de rato.** 2005. 75f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da aplicação do ultra-som (US) de 1 MHz comparando as frequências de repetição de pulso de 100 Hz e 16 Hz na recuperação da fratura de fibula, por análise morfológica e bioquímica, entre animais tratados e não-tratados. Foram utilizados 60 ratos machos albinos Wistar divididos em 4 grupos experimentais: referência, controle, tratados com US com frequência de repetição de pulso de 16 Hz ou 100 Hz. Os animais dos grupos tratado e controle foram submetidos a uma fratura com perda óssea da fibula direita. O tratamento teve início 24 h após a fratura, durante 5 dias por semana, com intensidade de $0,5 \text{ W/cm}^2$, modo pulsado 1/5, frequência de repetição de pulso a 100 Hz ou 16 Hz, por 3 min/dia. No 7º, 14º e 21º dia após a indução da fratura foi realizada coleta do sangue através de punção cardíaca para quantificação dos níveis de fosfatase alcalina e cálcio sérico e em seguida os animais foram submetidos à eutanásia e a fibula foi removida para análise histológica. Foram determinadas a densidade de matriz óssea, condrócitos e fibroblastos. Os níveis de fosfatase alcalina e cálcio foram significativamente ($P < 10^{-7}$) diferentes nos grupos experimentais. A densidade de matriz óssea, condrócitos e fibroblastos também foram significativamente diferentes entre os grupos experimentais. O tratamento com US acelerou a regeneração óssea e modulou os níveis sanguíneos de fosfatase alcalina e cálcio, sendo que, o US pulsado com

freqüência de repetição de pulso a 100 Hz e freqüência de base da 1 MHz demonstrou ser mais eficaz.

Palavras chave: ultra-som; regeneração óssea; cálcio sérico, fosfatase alcalina, histomorfometria.

ABSTRACT

LEITE, V. L. **Comparative study of the effect of 100 Hz and 16 Hz pulse repetition frequency 1MHz ultrasound rat fibula fracture treatment.** 2005. 75f. Dissertation (Master) – Escola de Engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

The aim of this work was to evaluate the effect of 1 MHz ultrasound application, comparing the 100 Hz and 16 Hz pulse repetition frequency in the recovering of fibula fracture, using morphological and biochemical analysis, between treated and non-treated animals. We used 60 male albino Wistar rats divided into 4 experimental groups: reference; control; treated with 100 Hz or 16 Hz pulse repetition frequency ultrasound. The treatment began 24 h after fracturing, lasted for 5 days per week, with 0.5 W/cm², pulsed mode 1/5, pulse repetition frequency of 100 Hz or 16Hz, for 3 min a day. In the 7th, 14th and 21st after fracture induction, blood was collected through cardiac puncture to alkaline phosphatase and calcium levels quantification and following that, the animals were euthanised and the fibula was removed to histological analysis. The bone matrix, condrocytes and fibroblasts densities were determined. The levels of alkaline phosphatase and calcium were significantly ($P < 10^{-7}$) different among the experimental group. The bone matrix, condrocytes and fibroblasts densities were significantly different among experimental groups. The US treatment accelerated the bone regeneration and modulated the alkaline phosphatase and calcium blood levels, being the pulsed US with 100 Hz pulse repetition frequency and base current 1 MHz the most efficient.

Keywords: ultrasound, bone regeneration, alkaline phosphatase, calcium blood levels, histomorphometry.

LISTA DE ABREVIACÕES

US	Ultra-som
ERA	Área efetiva de radiação
SATA	<i>Spatial average temporal average</i> – média espacial, média temporal
SATP	<i>Spatial average temporal peak</i> – média espacial, pico temporal
Hz	Hertz - unidade de medida de frequência
MHz	Mega Hertz
kHz	Kilohertz
W/cm ²	Watt por centímetro quadrado
mW/cm ²	Miliwatt por centímetro quadrado
PZT	Titanato zirconato de chumbo
kV	Kilovolts
Nm	Nanômetro
mA	Miliampere
mm ²	Milímetro quadrado
U/L	Unidades por litro
p/v	Peso por volume
TGF β1	Fator de crescimento transformador beta 1
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
FGFβ	Fator de crescimento de fibroblastos beta

VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
RNA _m	Acido ribonucléico mensageiro
IGF 1	Fator de crescimento como insulina 1
IL 8	Interleucina 8
COX 2	Cicloxigenase 2
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> – Reação em cadeia da polimerase
SGP	Potenciais gerados por tensão

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Radiografia da fíbula de ratos submetidos a fratura. **A**, sete dias e **B**, vinte e um dias após a fratura induzida: **controle** não tratado com US; **US100**, tratado com ultra-som de 1 MHz com frequência de repetição de pulso de 100 Hz e **US16**, tratado com ultra-som de 1 MHz com frequência de repetição de pulso de 16 Hz. 46

Figura 2: Fotomicrografia de corte longitudinal da fíbula direita de rato do grupo controle submetido à fratura com perda óssea e não tratado com US, corado com hematoxilina-eosina. **A**, controle, sete dias após a fratura, mostrando o tecido de granulação chamado calo transitório (CT) que invade o coágulo sanguíneo (CS) formando uma ponte entre os fragmentos da fratura (F); **B**, controle, quatorze dias após a fratura, onde é possível observar o calo externo (CE) que se forma em torno dos extremos opostos dos fragmentos ósseos, o calo interno (CI) que se forma entre o CE e o osso imaturo (OI) inicialmente formado na consolidação de fraturas; **C**, controle, vinte e um dias após a fratura, mostrando o osso imaturo (OI) avançando para a cartilagem localizada no calo externo (CE) e no calo interno (CI). Aumento de 50x. 49

Figura 3: Fotomicrografia de corte no local da fratura com perda óssea de fíbula de rato do grupo controle, não tratado com US, corado com hematoxilina-eosina. **A**, sete dias após a fratura, mostrando capilares sangüíneos (VS), fibroblastos (Fb), que formam o tecido de granulação e condrócitos (Cd) formando a cartilagem que se desenvolve no calo; **B**, quatorze dias após a fratura, observam-se condrócitos (Cd) que se tornam hipertróficos e em seguida geram espaços na cartilagem calcificada fragmentada (Ccf); **C**, vinte e um dias após a fratura mostrando área de cartilagem calcificada fragmentada (Ccf) circundada por osteoblastos, que depositam ao seu redor matriz óssea (MO). Aumento de 400x.

50

Figura 4: Fotomicrografia de corte longitudinal de fíbula direita de rato do grupo US100, submetido à fratura com perda óssea e tratamento com US de 1 MHz com frequência de repetição de pulso de 100 Hz, corado com hematoxilina-eosina. **A**, sete dias após a fratura, nota-se a intensa formação de osso imaturo (OI) no calo externo (CE) e no calo interno (CI), observa-se também o restabelecimento da medula óssea (M); **B**, quatorze dias após a fratura, onde podem ser observadas a formação de osso maduro (OM) e a reabsorção gradual das trabéculas na periferia do calo externo (CE); **C**, vinte e um dias após a fratura, observa-se que o formato do osso é de tal modo restabelecido, que o local da fratura não pode mais ser identificado como espessamento ósseo. Aumento de 50x.

53

Figura 5: Fotomicrografia de corte no local da fratura de fibula de rato do grupo US100 tratado com ultra-som de 1 MHz com frequência de repetição de pulso de 100 Hz, corado com hematoxilina-eosina. **A**, sete dias após a fratura, observam-se trabéculas, matriz óssea (MO), osteoblastos (Ob) e fibroblastos (Fb); **B**, quatorze dias após a fratura, nota-se maior área de matriz óssea (MO), diminuição do tamanho das trabéculas e maior área de osso imaturo (OI); **C**, vinte e um dias após a fratura, mostrando grande conteúdo de matriz óssea, osteócitos (Ot) e poucas células, características do osso maduro (OM). Aumento de 400x.

54

Figura 6: Fotomicrografia de corte longitudinal de fibula direita de rato do grupo US16, submetido à fratura com perda óssea e tratado com US de 1 MHz com frequência de repetição de pulso de 16 Hz, corado com hematoxilina-eosina. **A**, sete dias após a fratura, observa-se formação de tecido de granulação (CT) e os fragmentos ósseos (F); **B**, quatorze dias após a fratura, onde pode ser observada a intensa formação de osso imaturo (OI), porém, não é muito evidente a diferenciação entre calo externo (CE) e calo interno (CI); **C**, vinte e um dias após a fratura, observe-se que a formação de osso maduro (OM) vai se estendendo sobre o osso imaturo (OI). Aumento de 50x.

57

Figura 7: Fotomicrografia de corte no local da fratura de fibula de rato do grupo US16, tratado com ultra-som de 1 MHz com frequência de repetição de pulso de 16 Hz, corado com hematoxilina-eosina. **A**, sete dias após a fratura, observa-se a intensa proliferação de condrócitos (Cd) e fibroblastos (Fb) de modo desorganizado; **B**, quatorze dias após a fratura, nota-se formação de matriz óssea (MO) mas ainda a presença de fibroblastos (Fb); **C**, vinte e um dias após a fratura, mostrando matriz óssea, porém, ainda um grande número de condrócitos (Cd) indicando a formação de tecido ósseo imaturo. Aumento de 400x.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dosagem sérica da enzima fosfatase alcalina de ratos, aos 7, 14 e 21 dias após a fratura de fíbula (média $\pm$ desvio padrão).	41
Tabela 2: Dosagem de cálcio sérico de ratos, aos 7, 14 e 21 dias após a fratura de fíbula (média $\pm$ desvio padrão).	42
Tabela 3: Densidade de condrócitos no local da fratura de fíbula de ratos dos grupos controle e tratados com ultra-som (média $\pm$ erro padrão).	59
Tabela 4: Densidade de fibroblasto no local da fratura de fíbula de ratos dos grupos controle e tratados com ultra-som (média $\pm$ erro padrão).	60
Tabela 5: Densidade de matriz óssea no local da fratura de fíbula de ratos dos grupos controle e tratados com ultra-som (média $\pm$ erro padrão).	62
Tabela 6 : Densidade de estruturas (0,0625 mm ²) determinada em 14 campos aleatórios (média $\pm$ erro padrão da média).	63

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ABREVIACÕES

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1 Tecido Ósseo	23
2.2 Reparo de Fraturas Ósseas	26
2.3 Ultra-Som	29
2.4 Ultra-Som e Recuperação de Fraturas	31
3 MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1 Modelo Experimental	35
3.2 Grupos Experimentais	36
3.3 Estabelecimento da Fratura	36
3.4 Tratamento com Ultra-som	37
3.5 Análise Bioquímica	37
3.6 Análise Radiológica	38
3.7 Análise Morfológica	38
3.8 Análise Estatística	39
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40

4.1 Análise Bioquímica	40
4.2 Análise Radiológica	44
4.3 Análise Morfológica	47
4.3.1 Análise Histológica	47
4.3.2 Análise Morfométrica	59
5 CONCLUSÃO	64
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

1 INTRODUÇÃO

O tecido ósseo é um dos mais rígidos e resistentes do corpo humano. Contudo, é freqüentemente lesado, ocorrendo fraturas que podem ser completas ou incompletas. A regeneração do tecido ósseo é determinada pela proliferação celular e deposição de sais de cálcio, que restabelecerão a arquitetura e funcionalidade deste tecido. A regeneração depende do estado nutricional do osso, da imobilização, de fatores bioquímicos e imunológicos.

Encontra-se em desenvolvimento um novo e estimulante campo de pesquisa para compreender melhor os mecanismos de fratura, o desenvolvimento e regeneração do tecido ósseo. A engenharia de materiais é uma área que vem se expandindo rapidamente e tem criado uma lista de produtos com a finalidade de promover a regeneração óssea em fraturas ou deformações ósseas. Em geral são materiais osteocondutivos em conjunto com várias proteínas osteoindutivas e preparado de células osteogênicas. Apesar disso, poucos produtos têm ação comprovada por estudos clínicos (HING, 2004; CORNEL, 2004).

Assim, terapias alternativas, que possam auxiliar na recuperação da fratura são muito importantes, pois minimizam o tempo e custo do tratamento, garantindo o retorno mais rápido às atividades de vida diárias. Este é o caso do ultra-som. As ações biológicas do tratamento

com ultra-som (US) têm sido investigadas desde a introdução deste recurso terapêutico há mais de 50 anos e tem sido amplamente utilizado com a finalidade de acelerar os processos de reparo ósseo (DYSON; BROKES, 1983; DUARTE, 1983; DYSON, 1987), lesão muscular (GOUVEA; VIEIRA; AMARAL, 1998) e de tendão (CUNHA; PARIZOTTO; VIDAL, 2001).

Atualmente há disponível no mercado e fabricados pela indústria brasileira, equipamentos de US operando na frequência 1 MHz e opções de frequência de repetição de pulso de 16 Hz e 100 Hz. Contudo, ainda não há relatos na literatura comparando a eficácia de ambas as modulações no reparo de fraturas.

Este trabalho teve como objetivo comparar o efeito da aplicação do US com frequência de 1MHz e frequência de repetição de pulso de 16 Hz e 100 Hz na recuperação de fratura de fíbula de ratos. Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- 1.1. Medir o nível de cálcio sérico e fosfatase alcalina no plasma sanguíneo dos animais.
- 1.2. Avaliar o efeito do ultra-som através de análise radiográfica.
- 1.3. Determinar a extensão da regeneração e/ou reparo por análise histológica quantitativa e qualitativa.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Tecido ósseo

O tecido ósseo é um dos mais resistentes e rígidos do corpo humano. Constituinte principal do esqueleto tem como funções proteger órgãos vitais e alojar a medula óssea, formadora das células do sangue. Também proporciona apoio aos músculos esqueléticos, transformando suas contrações em movimentos úteis e constitui um sistema de alavancas que amplia as forças geradas pela contração muscular. Ainda funciona como depósito de cálcio, fosfato e outros íons, armazenando-os ou liberando-os de maneira controlada, para manter constante a concentração desses importantes íons nos líquidos corporais (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1990; GARDNER; GRAY; RAHILLY, 1998).

O tecido ósseo tem muitas propriedades, essencialmente devidas à composição de sua estrutura, composta de hidroxapatita, colágeno, proteoglicana, proteínas não-colágenas e água. Componentes inorgânicos são responsáveis pela manutenção da rigidez e resistência a

compressão, enquanto os componentes orgânicos fornecem as propriedades correspondentes à tensão (WEINER; WAGNER, 1998).

Do ponto de vista macroscópico, o osso apresenta-se não homogêneo, poroso e anisotrópico. Entretanto, a porosidade pode ser variável, o que determina a existência de dois tipos de osso. O primeiro é o osso esponjoso, com 50-95% de porosidade, encontrado em ossos curtos e nas terminações dos ossos longos. Os poros são interconectados e preenchidos com medula óssea, enquanto que a matriz óssea tem a forma de tábuas e essa estrutura é chamada de trabéculas, com densidade de aproximadamente 200 μm e arranjadas de formas variadas. O segundo tipo é o osso cortical, com 5-10% de porosidade e diferentes tipos de poros. A diáfise dos ossos longos é quase totalmente compacta. Os poros vasculares são os mais largos (50 μm de diâmetro) formados pelos canais de Havers (alinhados ao longo do eixo do osso) e os canais de Volkmann (canais transversais conectando os canais de Havers) com capilares e nervos. Outros poros são associados com lacunas (cavidades conectadas através de pequenos canais conhecidos como canalículos) e com o espaço entre colágeno e hidroxiapatita (por volta de 10nm). O osso cortical consiste de estruturas cilíndricas conhecidas como ósteon ou sistema de Havers, com diâmetro em torno de 200 μm , formado por lamelas cilíndricas ao redor do canal de Havers. O limite entre o ósteon e o osso ao redor é conhecido como linha cimentante (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1990; DOBLARÉ; GARCÍA; GOMES, 2004).

A combinação de osso trabecular e cortical forma a estrutura “tipo-sanduíche”, bem conhecida na engenharia por sua ótima propriedade estrutural. Durante sua vida útil, ambos os tipos de ossos são formados por dois diferentes tipos de tecido: osso imaturo e osso maduro ou lamelar. O osso inicialmente formado no desenvolvimento embrionário, consiste de osso imaturo, que será posteriormente modificado em osso lamelar. Normalmente não existe osso imaturo no esqueleto após quatro ou cinco anos, mas ele pode reaparecer durante o processo

de recuperação após fratura. Os dois tipos de ossos têm muitas diferenças na composição, organização, crescimento e propriedades mecânicas. O osso imaturo é rapidamente formado e pobremente organizado, com fibras colágenas e cristais minerais em um arranjo mais ou menos sem sentido. O osso lamelar é lentamente formado, altamente organizado, com camadas paralelas e lamelas que fazem esse mais forte do que o osso imaturo (HAM, 1972; DOBLARÉ; GARCÍA; GOMES, 2004).

O osso pode crescer, modificar sua forma, reparar-se quando fraturado e renovar-se continuamente, pela remodelação interna. Todos esses processos são conduzidos por modelos mecânicos, hormonais e fisiológicos. Existem quatro tipos de células ósseas, que podem ser classificadas de acordo com suas funções. Os osteoblastos são células mesenquimais diferenciadas que produzem matriz orgânica. Originam-se do periósteo ou do estroma da medula óssea. Os osteoclastos removem tecido ósseo, secretam ácido, colagenase e outras enzimas que atacam a matriz e liberam cálcio. Derivam dos monócitos do sangue circulante. As células-fonte da linhagem óssea cobrem e revestem todas as superfícies do osso em repouso e podem ser ativadas em resposta a estímulos químicos e/ou mecânicos. Os osteócitos são os osteoblastos que se encontram cercados pela matriz óssea, ocupando as lacunas das quais partem canaliculos que permite a comunicação com as células vizinhas. Muitos autores sugerem que os osteócitos são as células que controlam a remodelação óssea, mas isso ainda não foi comprovado. Entretanto, é totalmente razoável, assumir que os osteócitos, as únicas células incrustadas na matriz óssea, são afetados pelos danos nesta matriz. Rompendo-se a matriz, deve-se esperar a lesão direta de osteócitos, interrompendo sua comunicação através dos canaliculos ou alterando sua troca metabólica (HAM, 1972; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1990; LANYON, 1993).

O colágeno é o principal componente ósseo responsável pela piezoelectricidade, podendo gerar sinais elétricos ao receber tensão mecânica, contribuindo para reparação óssea

(BASSET; BACKER, 1962). Charman (1990) investigou que potenciais de tensão são gerados no osso e tecidos adjacentes quando estes são deformados, por forças de compressão, distração, flexão e de rotação axial e que as deformações produzidas pelo cristal piezoelétrico geram um potencial elétrico que orienta o crescimento (carga negativa) e a absorção (carga positiva) óssea. Em sua revisão de literatura, Buckwalter e Cruess (1993) citaram que campos elétricos podem influenciar a remodelação da fratura e que evidências circunstanciais indicam que as regiões de eletropositividade associam-se com atividade osteoclástica e as regiões de eletronegatividade com atividade osteoblástica.

A descrição da piezoeletricidade óssea por Fukada e Yasuda (1957) estimulou muitos pesquisadores a investigarem, nos anos posteriores, diversos 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 (DUARTE, 1983).

2.2 Reparo de fraturas ósseas

O tecido ósseo é um material vivo que está, invariavelmente, exposto em um ambiente mecânico, que concorre com a integridade de sua estrutura. Existe uma série de causas para fraturas ósseas. Mas o osso pode regenerar e formar novo tecido ósseo, onde ele esteja danificado ou foi perdido (McKIBBIN, 1978; DOBLARÉ; GARCÍA; GOMES, 2004).

O reparo ósseo é um processo natural que pode reconstituir o tecido lesado e recompor sua forma e função originais. É um processo complexo que envolve a harmonizada

contribuição de migração, diferenciação e proliferação de células inflamatórias, angioblastos, fibroblastos, condroblastos e osteoblastos que sintetizam e liberam as substâncias dos componentes da matriz extracelular (CORNEL; LANE, 1992; DOBLARÉ; GARCÍA; GOMES, 2004).

Pode-se diferenciar o reparo ósseo em primário e secundário. O primário acontece nos casos de extrema estabilidade e desconsiderado tamanho de fenda entre os fragmentos, envolvendo a tentativa do osso de se formar diretamente. Nestes casos, o reparo é reposta do periósteo e tecidos moles externos, que formam um calo externo, o qual reduz o movimento inicial pelo aumento de rigidez. A maioria das fraturas é recuperada pelo reparo secundário, que tem uma série de estágios sequenciais, os quais podem se sobrepor em certa extensão, incluindo inflamação, diferenciação do calo, ossificação e remodelação (AUGAT et al., 1998; EINHORN, 1998).

O primeiro estágio começa logo após a fratura. Como resultado do traumatismo, rompem-se os vasos sangüíneos que atravessam a linha de fratura e o sangue extravasado, rapidamente, completa o espaço de intervalo entre os fragmentos. Macrófagos removem o tecido morto e inicia-se a formação de tecido de granulação pela migração de células mesenquimais indiferenciadas, originando uma estabilização inicial do calo. Essas células se proliferam e migram dos tecidos moles que circundam a fratura (HAM, 1972; EINHORN, 1998).

No próximo estágio, as células mesenquimais se diferenciam em condrócitos, osteoblastos ou fibroblastos, dependendo das condições mecânicas e biológicas. (AUGAT et al., 1998, DOBLARÉ; GARCÍA; GOMES, 2004). A invasão do coágulo sangüíneo por brotamento de novos capilares recém-formados e fibroblastos (tecido de granulação) é uma etapa importante responsável pela formação do calo transitório. Quarenta e oito horas após a fratura, ou mesmo antes, as células osteogênicas da camada profunda do periósteo, as células

do endósteo da cavidade medular e as células indiferenciadas da medula óssea estão se dividindo ativamente (HAM, 1972, JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1990). Essa atividade é vista primeiramente (início em 8 h e pico máximo em 24 h) no periósteo e tecidos imediatamente adjacentes à fratura e se estende por todo o comprimento do osso lesado. Entretanto, com poucos dias essa atividade generalizada declina e finalmente fica confinada na área imediatamente adjacente a fratura, onde permanecerá acima dos níveis normais durante várias semanas (McKIBBIN, 1978).

As células das camadas mais profundas do periósteo são as que apresentam maior atividade metabólica. Proliferam-se com rapidez e logo formam um colar distinto em torno de cada fragmento. Essas células começam a mostrar sinais de diferenciação. As células situadas mais profundamente neste colar (as mais próximas do osso) diferenciam-se na presença de vasos sangüíneos, tornando-se osteoblastos, os quais formam trabéculas que se desenvolvem e se fixam à matriz óssea do fragmento. As células osteogênicas situadas na superfície do colar parecem crescer tão rapidamente, que os capilares do periósteo não podem as acompanhar, diferenciando-se em um meio avascular. Desse modo tendem a diferenciar-se em condroblastos e condrócitos, desenvolvendo cartilagem (HAM, 1972).

Uma vez formado o calo (principalmente por cartilagem), a ossificação endocondral começa, seguindo uma seqüência de eventos celulares complexa, que incluem maturação e degradação da cartilagem, vascularização e osteogênese. A ossificação continua até que, toda a cartilagem tenha sido modificada em osso do tipo esponjoso e a ponte óssea no intervalo da fratura, adquiere rigidez suficiente para estabilizar o calo. Assim, a remodelação do local da fratura começa gradualmente, com finalidade de restaurar a forma e estrutura originais do tecido ósseo. A última fase é muito mais longa do que as anteriores, podendo ocorrer por até dois anos, dependendo da espécie animal (ONI, 1997; DOBLARÉ; GARCÍA; GOMES, 2004).

2.3 Ultra-som

Os materiais piezoelétricos, como cristais de quartzo e certos materiais policristalinos como o titanato zirconato de chumbo (PZT) e o titanato de bário, após sofrerem pressão produzem alterações elétricas em sua superfície externa. O efeito piezoelétrico é reversível. Assim, quando esses materiais são expostos a uma tensão elétrica alternada, produzem mudanças contínuas em sua forma dependendo da frequência da corrente elétrica e se converte em uma fonte de vibrações mecânicas (HOOGLAND, 1986; WILLIAMS, 1987; KANH, 1991).

A habilidade do ultra-som interagir com tecidos e produzir mudanças biológicas é conhecida há muito tempo. Dois tipos de mecanismos são comumente citados para explicar os efeitos biológicos produzidos pelo ultra-som. Eles são classificados em efeitos térmicos e não-térmicos. Segundo Baker, Robertson e Duck (2000) os dois efeitos não estão separados, e na realidade, é melhor assumir que efeitos não-térmicos serão sempre acompanhados por algum aquecimento, porque a interação entre o ultra-som e os tecidos é simultaneamente térmica e mecânica.

A energia transportada pelo feixe ultra-sônico é atenuada conforme sua passagem através dos tecidos. A energia é perdida devido ao espalhamento do feixe e de sua absorção. Assumindo que toda energia atenuada é oportunamente absorvida, a razão de quanto calor é depositado é dado pelo produto do coeficiente de atenuação e a intensidade (KITCHEN; PARTRIDGE, 1990; ter HAAR, 1999).

Um alto coeficiente de absorção tem relação com abundantes moléculas protéicas, isso significa que, tecidos colágenos devem ser aquecidos preferencialmente, e são a maior parte dos tecidos tratados pelos fisioterapeutas. Efeitos benéficos alcançados através do efeito térmico do ultra-som incluem um aumento na extensibilidade de estruturas colágenas como tendões e tecidos cicatriciais, diminuição na rigidez das articulações, alívio da dor, aumento do fluxo sanguíneo, diminuição de espasmo muscular e em altas intensidades, destrói um tecido selecionado como realizado nas cirurgias com ultra-som focalizado (ter HAAR, 1999). Contudo, a produção excessiva de calor local devido a altas doses de ultra-som pode lesar o tecido (DYSON, 1987).

O primeiro efeito que se produz nos tecidos corporais em consequência das ondas ultra-sônicas é de natureza mecânica. As vibrações ultra-sônicas requerem um meio deformável elástico para sua propagação o que causa compressão e expansão no tecido, na mesma frequência que o ultra-som, conduzindo pressões variáveis produzindo micro massagem (SUMMER; PATRICK, 1964; DYSON; SUCKLING, 1978; HOOGLAND, 1986). Têm sido demonstradas, mudanças induzida pelo ultra-som, na permeabilidade da membrana das células para o cálcio e outros íons, aumento na permeabilidade vascular, aumento da angiogênese e desgranulação de mastócitos (CHAPMMAN; MACNALLY; TUCKER, 1979; DYSON, 1987; KITCHEN; PARTRIDGE, 1990).

Baker, Robertson e Duck (2000) indicam que não existem evidências razoáveis dos mecanismos de ação que produzem os efeitos biológicos produzidos pelo tratamento com ultra-som. Muitos trabalhos concluem que organismos tendem a expressar alterações elétricas quando perturbados, e, inversamente, tentam ir em direção ao equilíbrio, através de correntes endógenas de reparo ou a aplicação de correntes externas equivalentes. Este campo eletromagnético, deve fornecer as bases de um novo paradigma na biologia e medicina. Uma

vez que o organismo é descrito como uma entidade eletromagnética, isto sugere fortemente, a razão da eficácia de várias terapias eletromagnéticas, inclusive o ultra-som (LIBOFF, 2004).

2.4 Ultra-som e recuperação de fraturas

As propriedades elétricas do tecido ósseo, particularmente a piezoeletricidade, despertaram o interesse dos pesquisadores em desenvolver técnicas que estimulassem o metabolismo ósseo quando, este por alguma razão biológica, não ocorresse no tempo esperado ou acelerassem este metabolismo em fraturas recentes. A tecnologia do ultra-som de baixa intensidade (1,5 MHz, 30 mW/cm², pulsos de 200 ms) resultou de um trabalho experimental com coelhos, realizado por Duarte (1977) que comprovou uma redução de 50% no tempo de consolidação de fraturas em osteotomias experimentais.

Experimentos utilizando cultura de células têm demonstrado alguns efeitos biológicos do ultra-som. Utilizando cultura de fibroblasto de pele humana, Harvey et al. (1975) encontram um aumento na síntese de proteínas colágenas e não-colágenas que foi dependente da intensidade. Fibroblastos expostos ao ultra-som contínuo (0,5 W/cm² SATA) mostraram aumento de 20% na secreção de colágeno, enquanto o aumento foi de 30% quando exposto ao ultra-som pulsado (0,5 W/cm² SATA). Ryaby et al. (1989) descreveram um aumento na incorporação do cálcio pelo uso do ultra-som em cultura de células ósseas. Contudo, Naruse et al. (2003), não encontraram evidências da absorção de cálcio pelas células expostas ao ultra-som. No entanto, os osteoblastos jovens responderam com um aumento transitório dos níveis de osteocalcina e fator de crescimento como insulina I (IGF-I).

Reher et al. (1999) identificaram citocinas e fatores angiogênicos induzidos pelo ultra-som de 1 MHz e de 45 kHz, em osteoblastos de mandíbula humana, fibroblastos e monócitos. As citocinas relacionadas com a angiogênese, a interleucina 8 (IL -8) e o fator de crescimento de fibroblasto (FGF β) foram significativamente estimulados nos osteoblastos e o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) foi estimulado em todos os tipos celulares investigados. Os resultados foram similares em ambas as frequências, porém, as intensidades ótimas foram de 0,1 e 0,4 W/cm² (SATA) com a frequência de 1 MHz e 15 e 30 mW/cm² (SATA) com ultra-som de 45 kHz.

Sun et al. (2001), utilizaram cultura de células ósseas para investigar o efeito do ultra-som de 1 MHz e intensidade de 0,068 W/cm² durante 20 min por dia. As análises de citocinas, parâmetros bioquímicos e contagem de células, foram realizadas do dia 4 até o dia 10 após a aplicação do ultra-som. Os níveis de fosfatase alcalina e TNF α (fator alfa de necrose tumoral) foram significativamente altos no 7º dia após a aplicação do US. A contagem de osteoblastos demonstrou aumento significativo após a aplicação do US, enquanto o número de osteoclastos diminuiu.

Trabalhos *in vivo* também têm demonstrado que o ultra-som é eficiente na promoção da regeneração óssea. Dyson e Brookes (1983) avaliaram o tratamento de fraturas de ratas com US, durante as fases de calo mole, calo duro e remodelação, bem como o tempo ótimo de estimulação. Os resultados indicaram que o tratamento com o US é mais efetivo durante as duas primeiras semanas após a osteotomia, ou seja, durante as fases inflamatória e proliferativa do processo de reparação. Porém, Pilla et al. (1990) observaram que o efeito do US em fratura de fíbula de coelhos é de acelerar a reparação óssea e que os resultados são mais significativos entre 14 e 21 dias pós-operatório.

Azuma et al. (2001) investigaram o efeito dependendo do tempo de início e duração de tratamento com US. Os resultados indicaram que o tratamento com ultra-som em tempo

parcial foi suficiente para acelerar o reparo ósseo, mas o tratamento mais longo (24 dias) foi mais efetivo. Os autores sugerem que o ultra-som atua em algumas reações celulares envolvidas em cada fase do processo de reparo, incluindo a reação inflamatória, angiogênica, condrogênica, ossificação intramembranosa, endocondral e de remodelagem óssea.

Heckman et al. (1994) demonstraram uma aceleração similar no tratamento de fraturas de tíbia em humanos. Para o tratamento de osso, parece que enquanto baixas intensidades ($0,03 - 0,5 \text{ W/cm}^2$ SATA) podem produzir efeitos benéficos, intensidades mais altas ($>0,5 \text{ W/cm}^2$ SATA) podem ser deletérias (TSAI et al., 1992; REHER et al., 1997). Faganello e Carvalho (1999) avaliaram os efeitos do US contínuo e pulsado sobre fraturas em ratas osteopênicas e concluíram que o tratamento com o regime contínuo produziu um bloqueio da reparação óssea em ratas osteomizadas, já em regime pulsado houve a formação de calo proeminente no animal tratado.

Wang, Lewallen e Bolander (1994), utilizando um modelo de fratura de fêmur de rato, observaram aceleração do reparo da fratura. O tratamento consistiu de 10 sessões de 15 min nas duas primeiras semanas após a fratura, com intensidade de 30 mW/cm^2 e frequência de 1,5 ou 0,5 MHz. A rigidez óssea do grupo tratado foi maior do que as fraturas controle, mas as diferenças foram significativas somente no grupo de 1,5 MHz. Empregando um modelo de fratura similar, Yang et al. (1996) avaliaram parâmetros mecânicos, bioquímicos e genéticos. Após 3 semanas de tratamento com ultra-som, 0,5 MHz com 50 ou 100 mW/cm^2 (SATA) a medida do torque máximo foi maior do que o controle, apenas no grupo de 50 mW/cm^2 . As análises bioquímicas não demonstraram diferenças significativas no conteúdo de colágeno e cálcio. Entretanto eles notaram aumento na expressão de genes associados à formação de cartilagem, significativamente alto no sétimo dia após a fratura, e significativamente baixo no vigésimo primeiro dia.

Na distração osteogênica o US induziu a formação óssea endocondral mais cedo nos grupos tratados durante a fase de alongamento e na primeira semana após a distração do que os grupos sem a estimulação do US e tratados uma semana antes da distração. Esses resultados sugerem que o efeito do US é mediado pela via endocondral e que a estimulação de formação óssea pelo ultra-som é mais efetiva durante a fase de alongamento (Sakurakichi et al., 2004).

Chang et al. (2002) compararam o efeito do US e do microondas em um modelo de fratura de fíbula de coelhos. Após a aplicação do ultra-som a formação óssea no local da osteotomia foi acelerada em 23,1-35,8% e o ensaio mecânico de torção demonstrou maior resistência (44,4-80%) quando comparada ao controle. A diferença encontrada no tratamento com microondas não foi significativa, sugerindo que o efeito do ultra-som não é mediado pela via térmica.

Pilla (2002) comparou o efeito de sinais de campos eletromagnéticos e ultra-som no reparo de fratura de fíbula de coelhos. Os estímulos eletromagnético e o mecânico aceleraram a resistência à torção. Este trabalho sugere que as modulações eletromagnéticas e mecânicas compartilham etapas comuns na indução do reparo e crescimento de tecido ósseo, apesar das diferenças em transmitir a primeira mensagem para as células-alvo. O trabalho indica que os potenciais gerados por tensão (SGP) endógenos e os sinais exógenos do ultra-som unem-se adequadamente as células-alvo, mais eficientemente do que os sinais eletromagnéticos que têm frequências de ondas mais baixas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Modelo experimental

Foram utilizados 60 ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus*) com idade média de 70 dias e peso corporal de 270 ± 20 g. Os animais provenientes do Biotério da Efoa/Ceufe (Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas/Centro Universitário Federal) foram mantidos em caixas de polietileno (cinco animais por caixa), em ambiente higienizado, com água e ração comercial à vontade e iluminação com ciclos de 12 h (12 h com luz e 12 h no escuro).

3.2 Grupos experimentais

Os animais foram aleatoriamente divididos em 4 grupos experimentais, com cinco animais cada: Referência, os animais não sofreram lesão nem tratamento com US; Controle, os animais sofreram lesão óssea e não foram tratados com US; US100 sofreram lesão óssea e foram tratados com US com frequência de repetição de pulso de 100 Hz; US16 sofreram lesão óssea e foram tratados com US com frequência de repetição de pulso de 16 Hz.

3.3 Estabelecimento da fratura

Os animais dos grupos US100, US16 e controle foram submetidos à fratura com perda óssea de fíbula direita. Os animais foram anestesiados com xilazina (6,7 mg/kg) e cetamina (16,7 mg/kg), por via intraperitoneal. A pele sobre a região ântero-lateral do membro posterior direito foi tricotomizada. Após assepsia local, foi realizada uma incisão sobre a pele entre os músculos tibial anterior e gastrocnêmio. Os músculos foram afastados para acessar a fíbula. Com auxílio de um alicate cirúrgico foi removido um segmento de 3,0 mm, no terço médio da diáfise da fíbula direita. A seguir a pele foi suturada com fio não-absorvível e feita à limpeza local, não havendo posteriormente nenhum tipo de imobilização do segmento. Não foram utilizados antibióticos.

3.4 Tratamento com ultra-som

Antes do início do tratamento o equipamento de US foi aferido no Departamento de Bioengenharia da Universidade de São Paulo (USP) - Campus de São Carlos. O tratamento com ultra-som teve início 24 h após a indução da lesão óssea. Foi utilizado aparelho de ultra-som BIOSET, modelo Sonacel, com frequência de 1 MHz, intensidade de $0,5 \text{ W/cm}^2$ (SATA), ciclo de trabalho de 20%, ERA de $0,5 \text{ cm}^2$ e frequência de repetição de pulso de 100 e 16 Hz. O tratamento foi realizado durante 3 minutos, uma vez ao dia, durante 5 dias consecutivos e dois de intervalo, simulando o tratamento clínico. Os animais foram submetidos à eutanásia aos 7, 14 e 21 dias após o início do tratamento. A fíbula foi removida e analisada por radiologia e em preparação histológica.

3.5 Análise bioquímica

Foram determinados os níveis de fosfatase alcalina e cálcio no sangue dos animais aos 7, 14 e 21 dias após o estabelecimento da fratura. Para isso foram coletados 300 µl de sangue por punção cardíaca. Depois da coagulação, o soro foi separado por centrifugação em tubos eppendorf a 1.000 g. A enzima fosfatase alcalina é um indicador bioquímico da síntese de matriz óssea. A dosagem sérica desta enzima foi realizada com kit laboratorial (Analisa) e a atividade enzimática estimada através da absorbância a 590 nm. O cálcio sérico, outro

indicador bioquímico da síntese de matriz óssea, foi dosado utilizando-se kit laboratorial (Analisa) e sua concentração estimada através da absorbância a 570 nm. Os dados foram comparados aos valores de referência.

3.6 Análise radiológica

A avaliação da lesão óssea foi realizada através de radiologia, com aparelho de raios-X odontológico, radioesfera intrabucal, SIEMENS de 60 kV/ 10mA.

3.7 Análise morfológica

A fíbula dos animais foi fixada por 48 h em formol: ácido acético: etanol 80% (1:2:8,5) e, então, transferida para solução descalcificante, contendo EDTA a 5% (p/v), que foi substituída a cada 2 dias. O osso permaneceu nesta solução por aproximadamente um mês. A seguir a fíbula foi processada tecnicamente com inclusão em parafina e microtomia da face medular, com 5 μ m de espessura. Os cortes foram corados com hematoxilina-eosina.

Foram determinados as densidades de matriz óssea, linfócitos, fibroblastos, condrócitos e vasos sangüíneos por morfometria, em área teste de 0,0625 mm². Utilizou-se um sistema de análise de imagem por vídeo-microscopia, com auxílio de microscópio ótico acoplado a uma

câmara de vídeo e a um monitor. Foram analisados 14 campos microscópicos aleatórios para cada grupo experimental.

3.8 Análise estatística

Foram determinadas as médias e desvios padrão e as diferenças entre os parâmetros analisados foram determinados pelo teste ANOVA, seguido do pós-teste de comparação múltipla de Tukey-Kramer, quando $P < 0,05$ (TIS, et al., 2002) com o software Graph Pad Instat V 2.04, 1993 (Radha Naik University of Sherbrooke).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise bioquímica

Na análise bioquímica foi possível avaliar dois marcadores para a remodelação óssea: a fosfatase alcalina sérica e o cálcio sérico.

A atividade de fosfatase alcalina ou ácida séricas indica, respectivamente, a atividade de osteoblastos e osteoclastos. A medida de componentes da matriz óssea liberados na circulação pode também ser utilizada para a determinação da formação ou reabsorção óssea, como a determinação dos níveis de osteocalcina, produto gênico específico dos osteoblastos (GARNERO; DELMAS, 1988). Embora a função da atividade da fosfatase alcalina no osso não seja completamente conhecida, estudos prévios têm mostrado que essa enzima é essencial na formação óssea normal (YOON; GOLUB; RODAN, 1989; FEDDE et al., 1999) e que a mensuração quantitativa de fosfatase alcalina sérica, pode ser um bom índice de formação óssea (LAUFFENBURGER et al., 1977; VAN STRAALLEN et al., 1991).

Os níveis de fosfatase alcalina, neste trabalho, foram significativamente ($P < 10^{-7}$) diferentes nos grupos experimentais. No grupo analisado aos sete dias após a indução da fratura, os animais tratados com ultra-som apresentaram níveis séricos desta enzima abaixo do valor de referência (Tabela 1). Este resultado pode representar a fase inicial de reparo da fratura, onde ocorre a reabsorção do tecido ósseo morto, evidenciando a ação da fosfatase ácida. A fosfatase ácida é expressa em altos níveis nos osteoclastos e também nos monócitos derivados de macrófagos (HENTHORN; MILLÁN; LEBOY, 1999).

Todos os grupos, analisados aos quatorze dias após a indução da lesão, apresentaram os maiores valores do nível sérico da fosfatase alcalina, revelando a maior atividade dos osteoblastos neste período, porém, os grupos tratados com ultra-som apresentaram valores abaixo do controle. A análise aos vinte e um dias após a indução da fratura, mostrou que os animais tratados com US com frequência de repetição de pulso de 100 Hz restabeleceram mais rapidamente os níveis basais desta enzima do que o grupo controle (Tabela 1).

Tabela 1 – Dosagem sérica da enzima fosfatase alcalina de ratos, aos 7, 14 e 21 dias após a fratura de fíbula (média $\pm$ desvio padrão).

GRUPOS	FOSFATASE ALCALINA (U/L)		
	7 dias	14 dias	21 dias
Referência	66,78 $\pm$ 7,97	66,78 $\pm$ 7,97	66,78 $\pm$ 7,97
Controle	58,78 $\pm$ 14,20	171,45 $\pm$ 3,28	90,92 $\pm$ 16,20
US100	37,68 $\pm$ 7,04	155,02 $\pm$ 14,50	77,50 $\pm$ 25,85
US16	47,84 $\pm$ 11,93	145,43 $\pm$ 18,10	61,80 $\pm$ 4,04

No presente trabalho, os níveis de cálcio sérico foram significativamente ($p < 10^{-7}$) diferentes nos grupos experimentais. No grupo analisado sete dias após a indução da fratura, os animais tratados com ultra-som apresentaram níveis de cálcio sérico abaixo do valor de referência, provavelmente pela maior deposição de cálcio no osso. No grupo analisado aos quatorze dias após a fratura, os animais do grupo controle apresentaram nível de cálcio sanguíneo abaixo do valor de referência evidenciando a deposição de cálcio, enquanto os animais tratados com ultra-som apresentaram níveis como o grupo referência. Já no grupo analisado vinte e um dias após a indução da lesão, os animais tratados apresentaram um valor de cálcio sérico sanguíneo menor que o valor de referência, podendo ser um indicio da remodelação do calo ósseo (tabela 2).

Tabela 2 – Dosagem de cálcio sérico de ratos, aos 7, 14 e 21 dias após a fratura de fíbula (média $\pm$ desvio padrão).

GRUPOS	CÁLCIO SÉRICO (mg/dL)		
	7 dias	14 dias	21 dias
Referência	9,80 $\pm$ 4,04	9,80 $\pm$ 4,04	9,80 $\pm$ 4,04
Controle	9,72 $\pm$ 1,72	7,29 $\pm$ 0,97	9,98 $\pm$ 0,97
US100	5,72 $\pm$ 1,44	8,61 $\pm$ 1,05	8,21 $\pm$ 0,93
US16	5,97 $\pm$ 1,23	9,97 $\pm$ 0,67	9,08 $\pm$ 0,82

Foi observado que no grupo controle os níveis de cálcio e fosfatase alcalina permaneceram equivalentes ao grupo de referência, quando analisados no sétimo dia após a fratura induzida. Quando analisado no décimo quarto dia após a lesão, o grupo controle apresentou valores de fosfatase alcalina elevados, enquanto os valores de cálcio estavam

abaixo do valor de referência. A fosfatase alcalina secretada indica maior atividade dos osteoblastos favorecendo maior deposição de cálcio no tecido ósseo, o que diminui sua concentração no plasma sanguíneo. No vigésimo primeiro dia após a fratura, os níveis de cálcio voltaram aos valores de referência e os de fosfatase alcalina permaneceram um pouco acima do valor de referência.

Nos grupos de animais tratados com ultra-som (US100 e US16) os níveis de fosfatase alcalina e de cálcio sérico foram, significativamente, diferentes quando comparados ao controle. Quando analisados no sétimo dia após a fratura induzida, os animais tratados com ultra-som apresentaram níveis de fosfatase alcalina e cálcio sérico abaixo do valor de referência. Isso pode ser explicado pelo fato de que quando os condrócitos se tornam suficientemente hipertróficos para produzir fosfatase alcalina, ocorre a calcificação da substância intercelular (HAM, 1972). Essa calcificação diminui os níveis de cálcio sérico no plasma, mas não aumenta tanto o nível plasmático da fosfatase alcalina, como quando ela é produzida pelos osteoblastos. No décimo quarto dia após a indução da fratura, os níveis de fosfatase alcalina estão acima do valor de referência, mas abaixo do valor médio do grupo controle e o cálcio próximo do valor de referência, revelando que esses grupos tratados com ultra-som (US100 e US16) voltaram aos níveis basais mais rapidamente do que o grupo controle. Isso sugere que o ultra-som modulou os níveis sanguíneos de fosfatase alcalina e cálcio sérico, acelerando o processo de consolidação óssea.

Sun et al. (2001) demonstraram aumento significativo de fosfatase alcalina em cultura de células ósseas, no sétimo dia após estímulo com ultra-som. Douat (2004) também observou no sétimo dia, níveis de fosfatase alcalina mais elevados no grupo tratado com US após osteotomia por escareação de tíbia de rato, quando comparado ao grupo controle. Esses resultados corroboram com os dados obtidos neste trabalho. Contudo, neste trabalho foi

utilizado modelo de fratura óssea diferente dos demais trabalhos, o que explica o pico de fosfatase alcalina no décimo quarto dia.

Chakkalakal et al. (1999) utilizando um modelo de fratura de fíbula de ratos, também demonstram um aumento significativo nos níveis de fosfatase alcalina no período da 5^a a 8^a semana e um decréscimo evidente durante a 4^a semana.

Masse et al. (2003) também utilizaram fosfatase alcalina e cálcio plasmático como marcadores bioquímicos para avaliar a perda de massa óssea em um modelo de osteoporose animal. Nordin e Morris (1989) fazem uma discussão sobre os níveis plasmáticos de cálcio e sua perda na urina como a possível causa da osteoporose. Singh et al. (2004) também utilizaram esses marcadores para relacionar fraturas de fêmur e deficiência de vitamina D em humanos. Apesar dos resultados, os autores mostraram que esses marcadores não podem detectar a insuficiência de vitamina D.

4.2 Análise radiológica

A análise radiológica permitiu acompanhar a evolução da consolidação óssea nos diferentes grupos. Aos sete dias após a fratura, o local da perda óssea mostrou-se nítido no grupo controle e US16. Já no grupo US100 nota-se a aceleração da consolidação. No grupo controle analisado aos vinte e um dias após a indução da fratura ainda é possível observar a descontinuidade óssea, enquanto nos grupos tratados com ultra-som observa-se a presença do calo ósseo (Fig. 1).

Leungh et al. (2004) avaliaram o efeito do ultra-som de baixa intensidade, em fratura complexa de tíbia em humanos através de análises radiográficas, bioquímicas e clínicas. Os autores também encontraram resultados de aceleração óssea no grupo tratado com ultra-som. Yang e Park (2001) também evidenciaram aceleração da consolidação óssea de fraturas experimentais em ulna de cães utilizando intensidade de 50 mW/cm^2 , através de estudo radiológico.

Contudo Schortinghuis et al. (2004a) utilizando US de 1,5 MHz com intensidade de 30 mW/cm^2 não encontraram diferenças estatisticamente significativas após análises microradiográficas em osteotomia experimental de mandíbula de rato. Em estudos complementares, Schortinghuis et al. (2004b) descrevem os mesmos resultados sem a utilização da membrana osteocondutora, desconsiderando então, a possibilidade do US ser efetivo na aceleração da regeneração de fraturas em ossos mandibulares. Entretanto deve ser considerado que o diâmetro da osteotomia utilizado por esses autores pode ser excessivamente grande (0,5 mm), retardando qualquer resposta de regeneração.

Contudo, Sakurakichi et al. (2004) avaliaram o efeito do ultra-som de baixa intensidade associado a distração osteogênica. Os resultados de densidade mineral óssea e tomografia computadorizada comprovam os resultados radiológicos de aceleração óssea encontrados nos grupos tratados com ultra-som e distração óssea. Azuma et al. (2001) também utilizaram recursos que comprovam os resultados radiológicos encontrados de aceleração no reparo ósseo em um modelo de fratura femoral de ratos tratados com ultra-som de baixa intensidade.

Figura 1. Radiografia da fíbula de ratos submetidos a fratura. **A**, sete dias e **B**, vinte e um dias após a fratura induzida: **controle** não tratado com US; **US100**, tratado com ultra-som de 1 MHz com frequência de repetição de pulso de 100 Hz e **US16**, tratado com ultra-som de 1 MHz com frequência de repetição de pulso de 16 Hz.

4.3 Análise morfológica

A análise morfológica das fíbula lesadas no período de sete, quatorze e vinte e um dias revelou tipos de ossos, com proporções diferentes de células. O osso imaturo possui relativamente mais células e as lacunas nas quais se situam os osteócitos não são tão achatadas. A substância intercelular se dispõe de modo irregular. A matriz do osso imaturo cora-se de modo irregular, porém freqüentemente mostra áreas de basofilia, de fácil identificação, conforme relatado por vários autores (HAM, 1972; NAGAMINE et al., 1998; DOBLARÉ; GARCÍA; GÓMES, 2004).

O osso maduro ou lamelar pode ser diferenciado porque se cora menos intensamente e de modo uniforme, apresenta conteúdo maior de substância cimentante e menor número de células, que estão dispostas de modo regular em lacunas mais estreitas, o que esta de acordo com outros trabalhos (HAM, 1972; NAGAMINE et al., 1998; DOBLARÉ; GARCÍA; GÓMES, 2004).

4.3.1. Análise histológica

Foi observada diferença do padrão histológico nos diferentes grupos experimentais. O grupo controle apresentou as seqüências de consolidação de fraturas já conhecidas e descritas pela literatura. A progressão histológica do reparo de fratura em uma osteotomia convencional de fíbula é essencialmente a mesma demonstrada em modelos de fratura de fêmur. O fato de

ambos serem ossos longos deve ser um fator determinante no processo biológico de reparo ósseo nestes ossos (CHAKKALAKAL et al., 1999).

É possível observar, em menor aumento (50x), no local de fratura os fragmentos ósseos e a formação do calo (Fig. 2). Em um maior aumento (400x) o grupo controle, analisado sete dias após a indução da lesão, apresenta a invasão do coágulo sanguíneo por novos capilares e fibroblastos formando tecido de granulação, o calo transitório. Observam-se trabéculas ósseas próximas a linha de fratura.

As células da camada mais profunda do periósteo são as que apresentam maior atividade. Além de proliferarem com rapidez também logo apresentam sinais de diferenciação. Essas células osteogênicas se proliferam tão rapidamente que os capilares do periósteo não podem acompanhar, por isso elas se diferenciam em um ambiente avascular, e assim tendem a diferenciar-se em condroblasto e condrócitos (HAM, 1972; McKIBBIN, 1978; DOBLARÉ; GARCIA; GÓMES, 2004). Neste trabalho foram observados vasos sanguíneos, fibroblastos formando o tecido de granulação e condrócitos que originam a cartilagem (Fig. 3).

No grupo controle analisado quatorze dias após a fratura induzida é possível observar em um menor aumento a formação de três camadas de crescimento e diferenciação das células. A camada mais próxima do fragmento consiste em trabéculas ósseas, cimentadas ao osso. A camada seguinte compõe-se de cartilagem que se continua nas porções externas das trabéculas ósseas. A terceira camada, mais externa consiste de células em proliferação. As células cartilaginosas próximas do osso recém-formado amadurecem e a substância em torno dela é calcificada, provocando sua morte. A região na qual ocorre esse fenômeno possui a forma de um V e é progressivamente substituída por osso (HAM, 1972; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1990). No grupo analisado vinte e um dias após a fratura o crescimento dessas camadas avançaram e logo os dois fragmentos uniram-se. A cartilagem substituída por osso fez com que o ângulo do V se tornasse cada vez mais agudo (Fig. 2 e 3).

Figura 2. Fotomicrografia de corte longitudinal da fíbula direita de rato do grupo controle submetido à fratura com perda óssea e não tratado com US, corado com hematoxilina-eosina. **A**, controle, sete dias após a fratura, mostrando o tecido de granulação chamado calo transitório (CT) que invade o coágulo sanguíneo (CS) formando uma ponte entre os fragmentos da fratura (F); **B**, controle, quatorze dias após a fratura, onde é possível observar o calo externo (CE) que se forma em torno dos extremos opostos dos fragmentos ósseos, o calo interno (CI) que se forma entre o CE e o osso imaturo (OI) inicialmente formado na consolidação de fraturas; **C**, controle, vinte e um dias após a fratura, mostrando o osso imaturo (OI) avançando para a cartilagem localizada no calo externo (CE) e no calo interno (CI). Aumento de 50x.

Figura 3. Fotomicrografia de corte no local da fratura com perda óssea de fíbula de rato do grupo controle, não tratado com US, corado com hematoxilina-eosina. **A**, sete dias após a fratura, mostrando capilares sangüíneos (VS), fibroblastos (Fb), que formam o tecido de granulação e condrócitos (Cd) formando a cartilagem que se desenvolve no calo; **B**, quatorze dias após a fratura, observam-se condrócitos (Cd) que se tornam hipertróficos e em seguida geram espaços na cartilagem calcificada fragmentada (Ccf); **C**, vinte e um dias após a fratura mostrando área de cartilagem calcificada fragmentada (Ccf) circundada por osteoblastos, que depositam ao seu redor matriz óssea (MO). Aumento de 400x.

O grupo US100 apresentou diferenças no padrão histológico quando comparado ao controle. Sete dias após a fratura, observa-se a proliferação de células que começam a formar novas trabéculas e a deposição de matriz óssea pelos osteoblastos (Fig. 4 e 5).

Quatorze dias após a indução da fratura notou-se a maior densidade de matriz óssea, e a reabsorção gradual das trabéculas na periferia do calo que não são mais necessárias para reforçar o local da fratura. Aos vinte e um dias após a fratura nota-se a regularidade da direção da matriz óssea e maior conteúdo de matriz óssea e menor número de células, características do osso maduro. O formato do osso foi de tal modo restabelecido, que o local da fratura não pode mais ser identificado como espessamento ósseo (Fig. 4 e 5). Estes resultados sugerem que o tratamento com ultra-som com frequência de repetição de pulso de 100 Hz acelerou a consolidação óssea.

De acordo com resultados histológicos e de micro radiografia, encontrados por Dyson e Brookes (1983), em estudo comparativo de ultra-som de 1,5 MHz e 3,0 MHz com intensidade de $0,5 \text{ W/cm}^2$, aplicados em fraturas de fíbula de ratos, o tratamento com US é mais efetivo na frequência de 1,5 MHz e, se aplicado nas primeiras duas semanas após a lesão. A recuperação envolve a ossificação direta, com pouca produção de cartilagem quando utilizado na fase inflamatória e início da fase proliferativa.

Entretanto, Azuma et al. (2001) avaliou o efeito do ultra-som com intensidade de 30 mW/cm^2 em fêmur de ratos divididos em grupos de acordo com o tempo e duração de tratamento (de 1 a 8 dias, de 9 a 16 dias, de 17 a 24 dias e de 1 a 24 dias). Os resultados histológicos e de reconstrução em 3 dimensões da tomografia computadorizada sugerem que o ultra-som atua em algumas reações celulares envolvidas em cada fase do processo de recuperação óssea e ainda, sugeriu que todos os tratamentos parciais aceleraram o reparo ósseo, mas o tratamento ao longo do tempo foi o mais efetivo.

Estudos utilizando cultura de células reforçam os resultados encontrados *in vivo*. Li et al. (2003) encontraram aumento na atividade mitocondrial dos osteoblastos, aumento na secreção de TGF β 1 e diminuição de citocinas, que ativam os osteoclastos ao utilizarem o US 1 MHz pulsado a 20% com modulação de pulso a 100 Hz na intensidade de $0,6 \text{ W/cm}^2$ (SATP) para estimular a atividade osteoblástica em cultura de células ósseas da calvária de ratos. Observaram ainda um aumento no número de osteoblastos e uma diminuição de osteoclastos. A citocina TGF β 1 estimula a diferenciação de fibroblastos e osteoblastos.

Reher et al. (1997) encontraram aumentos significativos de síntese de proteínas da matriz óssea (colágenas e não-colagenosas) ao estimularem cultura de células da calvária de ratos com intensidades entre $0,1$ e $0,5 \text{ W/cm}^2$ e US de 3 MHz. Complementando esses resultados, Reher et al. (1999) utilizando a mesma metodologia encontraram aumento significativo na síntese de citocinas IL-8, FGF β e VEGF, indicativos de diferenciação e proliferação celular.

Warden et al. (2001) aplicando US de 1,5 MHz e intensidade de 30 mW/cm^2 em células ósseas *in vitro*, encontrou após quantificação em PCR de RNAm, que o ultra-som estimula a expressão de genes mediadores de resposta inflamatória imediata (c-fos e COX-2) e aumenta a expressão de proteínas estimuladoras de matriz óssea (fosfatase alcalina e osteocalcina).

Figura 4. Fotomicrografia de corte longitudinal de fíbula direita de rato do grupo US100, submetido à fratura com perda óssea e tratamento com US de 1 MHz com frequência de repetição de pulso de 100 Hz, corado com hematoxilina-eosina. **A**, sete dias após a fratura, nota-se a intensa formação de osso imaturo (OI) no calo externo (CE) e no calo interno (CI), observa-se também o restabelecimento da medula óssea (M); **B**, quatorze dias após a fratura, onde podem ser observadas a formação de osso maduro (OM) e a reabsorção gradual das trabéculas na periferia do calo externo (CE); **C**, vinte e um dias após a fratura, observa-se que o formato do osso é de tal modo restabelecido, que o local da fratura não pode mais ser identificado como espessamento ósseo. Aumento de 50x.

Figura 5. Fotomicrografia de corte no local da fratura de fibula de rato do grupo US100 tratado com ultra-som de 1 MHz com frequência de repetição de pulso de 100 Hz, corado com hematoxilina-eosina. **A**, sete dias após a fratura, observam-se trabéculas, matriz óssea (MO), osteoblastos (Ob) e fibroblastos (Fb); **B**, quatorze dias após a fratura, nota-se maior área de matriz óssea (MO), diminuição do tamanho das trabéculas e maior área de osso imaturo (OI); **C**, vinte e um dias após a fratura, mostrando grande conteúdo de matriz óssea, osteócitos (Ot) e poucas células, características do osso maduro (OM). Aumento de 400x.

O grupo US16 apresentou padrão histológico diferente do controle e do US100. Observou-se, sete dias após a fratura, intensa proliferação de condrócitos e fibroblastos de modo desorganizado formando tecido de granulação. Nota-se também a infiltração de células musculares no sítio de lesão (Fig. 6).

No grupo US16, analisado quatorze dias após a fratura, observaram-se a presença de fibroblastos e a deposição de matriz óssea formando osso imaturo unindo os fragmentos ósseos, porém, não é muito evidente a diferenciação entre calo externo e calo interno. Aos vinte e um dias, após a fratura, foi possível observar maior formação de matriz óssea, porém, ainda há muitos condrócitos indicando a formação de tecido ósseo imaturo (Fig. 6 e 7).

Douat (2004) também encontrou no grupo tratado com frequência de repetição de pulso de 16 Hz, desorganização tecidual, grande densidade de fibroblastos. Zhang et al. (2002) encontraram aumentos significativos de colágeno tipo II, X e agrecanas após estimulação ultra-sônica em cultura de células do esterno de embriões de galinhas utilizando 30mW/cm^2 e 1,5 MHz, por 6 dias consecutivos.

As células osteogênicas que revestem a superfície óssea representam uma família celular especial originária do mesênquima, que têm capacidade inata para formar tecidos do tipo ósseo ou cartilaginoso no processo de reparo de fraturas. Contudo, alguns investigadores não parecem pensar que essas células sejam diferentes dos fibroblastos, mas que elas sejam distintas unicamente devido às influências do meio, e que se os fibroblastos forem colocados sobre um osso poderão tornar-se capazes de formar osso (HAM, 1972).

Os fibroblastos produzem uma variedade de substâncias essenciais para o processo de reparo e regeneração do tecido fraturado, que consistem principalmente em colágeno e glicanimoglicanas. Este rápido influxo de fibroblastos acontece em média 3 a 5 dias após a lesão óssea. A permanência e grande quantidade de fibroblastos são associadas à inflamação

crônica visto que estes secretam colágeno e collagenase, precedem a formação de fibrose tecidual e a presença de alta proporção de cartilagem, é característico de instabilidade do foco de fraturas ou imaturidade do tecido de reparo (CARANO; FILVAROROFF, 2003; DOBLARÉ; GARCÍA; GOMÉZ, 2004).

Figura 6. Fotomicrografia de corte longitudinal de fibula direita de rato do grupo US16, submetido à fratura com perda óssea e tratado com US de 1 MHz com frequência de repetição de pulso de 16 Hz, corado com hematoxilina-eosina. **A**, sete dias após a fratura, observa-se formação de tecido de granulação (CT) e os fragmentos ósseos (F); **B**, quatorze dias após a fratura, onde pode ser observada a intensa formação de osso imaturo (OI), porém, não é muito evidente a diferenciação entre calo externo (CE) e calo interno (CI); **C**, vinte e um dias após a fratura, observe-se que a formação de osso maduro (OM) vai se estendendo sobre o osso imaturo (OI). Aumento de 50x.

Figura 7. Fotomicrografia de corte no local da fratura de fibula de rato do grupo US16, tratado com ultra-som de 1 MHz com frequência de repetição de pulso de 16 Hz, corado com hematoxilina-eosina. **A**, sete dias após a fratura, observa-se a intensa proliferação de condrócitos (Cd) e fibroblastos (Fb) de modo desorganizado; **B**, quatorze dias após a fratura, nota-se formação de matriz óssea (MO) mas ainda a presença de fibroblastos (Fb); **C**, vinte e um dias após a fratura, mostrando matriz óssea, porém, ainda um grande número de condrócitos (Cd) indicando a formação de tecido ósseo imaturo. Aumento de 400x.

4.3.2 Análise morfométrica

A análise morfométrica mostrou diferenças significativas entre os grupos experimentais. A densidade de condrócitos foi maior no grupo US16 quando analisada aos sete dias após a indução da fratura. Este valor foi significativamente diferente quando comparado aos quatorze e vinte e um dias após a fratura no mesmo grupo, mostrando um evidente estímulo na proliferação de condrócitos na primeira semana de tratamento com ultra-som. A proliferação de condrócitos diminuiu significativamente nas semanas seguintes (Tabela 3). No grupo US100 analisado aos vinte e um dias após a fratura observou-se menor densidade de condrócitos e maior densidade de matriz óssea (tabela 3 e 5).

Tabela 3 – Densidade de condrócitos no local da fratura de fibula de ratos dos grupos controle e tratados com ultra-som (média $\pm$ erro padrão).

GRUPOS	TEMPO DE ANÁLISE		
	7 dias	14 dias	21 dias
Controle	36,68 $\pm$ 7,61	30,62 $\pm$ 5,54	32,75 $\pm$ 7,19
US100	30,50 $\pm$ 4,18	21,18 $\pm$ 4,72	13,06 $\pm$ 2,69
US16	44,68 $\pm$ 7,20	16,00 $\pm$ 3,24	16,43 $\pm$ 3,50

O grupo US16 aos quatorze dias após a fratura, apresentou maior densidade de fibroblasto, significativamente diferente quando comparado com o grupo US100, analisado no mesmo período ($P<0,01$). Notou-se também que o grupo US16 analisado quatorze dias após a fratura apresentou maior densidade de fibroblastos quando comparado com os grupos controle e US100 analisados vinte e um dias após a fratura ($P<0,001$) e com controle, US100 e US16 quando analisados aos sete dias após a fratura ($P<0,05$). Estes resultados indicam que grupo controle e US100 analisados vinte e um dias após a fratura apresentam uma densidade muito menor de fibroblastos e que o grupo US16 não apresentou diminuição significativa de fibroblastos aos vinte e um dias após a fratura quando comparado o período de quatorze dias com vinte e um dias neste mesmo grupo (tabela 4). Também se deve considerar o tratamento com US e frequência de modulação de pulso de 16 Hz interferindo na proliferação de fibroblastos a partir da segunda semana de tratamento.

Tabela 4 – Densidade de fibroblasto no local da fratura de fíbula de ratos dos grupos controle e tratados com ultra-som (média $\pm$ erro padrão).

GRUPOS	TEMPO DE ANÁLISE		
	7 dias	14 dias	21 dias
Controle	26,75 $\pm$ 6,57	19,62 $\pm$ 6,47	5,25 $\pm$ 1,49
US100	12,37 $\pm$ 2,18	8,18 $\pm$ 2,42	5,06 $\pm$ 1,18
US16	10,87 $\pm$ 2,64	31,43 $\pm$ 4,73	18,93 $\pm$ 3,60

A densidade de matriz óssea foi significativamente diferente nos grupos analisados. O grupo US100 analisado aos sete dias após a osteotomia apresentou maior densidade de matriz

óssea quando comparado com controle no mesmo período e também com controle analisado quatorze dias após a fratura induzida ($P<0,05$).

Quando analisado aos quatorze dias após a indução da lesão, o grupo US100 apresentou significativo aumento de densidade de matriz óssea quando comparado com o grupo controle ($P<0,001$) e US16 ($P<0,05$) no mesmo período. Esse aumento também foi maior quando comparado com controle e US16 analisados aos sete dias após a fratura e, ainda, quando comparado com o grupo controle analisado aos vinte e um dias após a fratura ($P<0,001$). Esses resultados indicam que o tratamento com a frequência de repetição de pulso de 100 Hz até o décimo quarto dia acelerou a deposição de matriz óssea.

Quando analisado aos vinte e um dias após a indução da fratura, o grupo US100 mostrou maior densidade quando comparado com o grupo controle e US16 ($P<0,001$) no mesmo período. Também apresentou aumento significativo quando comparado no mesmo grupo (US100) em períodos anteriores: sete dias e quatorze dias após a fratura ($P<0,001$) e ainda quando comparado com os grupos controle e US16 analisados aos sete dias e quatorze dias após a fratura induzida ($P<0,001$). Esses resultados mostram que o grupo US100 após vinte e um dias, apresentou a maior densidade de matriz encontrada neste estudo e que o ultra-som com frequência de repetição de pulso de 100 Hz pode atuar na fase final da consolidação óssea.

O grupo US16 também apresentou aumento significativo de matriz óssea quando analisado aos vinte e um dias após a fratura induzida e comparado com o grupo controle analisado no mesmo período e ainda, quando comparado no mesmo grupo, mas nos períodos anteriores de sete e quatorze dias após a fratura. Estes resultados indicam que o tratamento com frequência de repetição de pulso de 16 Hz acelerou a deposição de matriz óssea somente quando analisado no vigésimo primeiro dia.

Os resultados também indicam que os grupos de animais tratados com ultra-som apresentaram maior área de matriz óssea, porém os maiores valores de densidade foram encontrados no grupo de animais tratados com US de 1 MHz e frequência de repetição de pulso de 100 Hz. Ainda neste grupo (US100) a deposição de matriz óssea aconteceu mais rapidamente do que no grupo de animais tratados com US e frequência de repetição de pulso de 16 Hz. Deve-se considerar ainda, que o tratamento com ultra-som e frequência de repetição de pulso de 100 Hz acelera a deposição de matriz óssea, favorecendo a regeneração óssea.

Tabela 5 – Densidade de matriz óssea no local da fratura de fíbula de ratos dos grupos controle e tratados com ultra-som (média $\pm$ erro padrão).

GRUPOS	TEMPO DE ANÁLISE		
	7 dias	14 dias	21 dias
Controle	18,62 $\pm$ 3,43	15,50 $\pm$ 3,08	21,31 $\pm$ 2,95
US100	40,75 $\pm$ 2,81	48,43 $\pm$ 3,92	88,18 $\pm$ 6,24
US16	23,37 $\pm$ 3,74	27,12 $\pm$ 4,96	57,68 $\pm$ 6,58

Na tabela 6 é possível observar os grupos analisados nos diferentes tempos e todas as densidades determinadas pela morfometria. Note o predomínio de diferentes estruturas em determinados períodos. No grupo US16 analisado no sétimo dia apresentou maior densidade de condrócitos, enquanto no décimo quarto dia a maior densidade foi de fibroblastos. O grupo US100 apresentou os maiores valores de densidade de matriz óssea indicando que as outras estruturas analisadas estavam sempre abaixo do valor encontrado nos outros grupos.

Tabela 6 - Densidade de estruturas (0,0625 mm²) determinada em 14 campos aleatórios (média ± erro padrão da média).

Estrutura	Controle			US100			US16		
	7d	14d	21d	7d	14d	21d	7d	14d	21d
Condrócitos	36,68±7,6	30,62±5,5	32,75±7,2	30,50±4,2	21,18±4,7	13,06±2,7	44,68±7,2	16,00±3,2	16,43±3,5
Fibroblasto	26,75±6,5	19,62±6,4	5,25±1,2	12,37±2,2	8,18±2,4	5,06±1,2	10,87±2,6	31,43±4,7	18,93±3,5
Matriz óssea	18,62±3,4	15,50±3,1	21,31±2,9	40,75±2,7	48,43±3,8	88,18±6,2	23,37±3,7	27,12±4,9	57,68±6,6

Também foram analisadas as densidades de linfócitos e vasos sangüíneos, porém não foram encontradas diferenças estatisticamente significativa. Esse resultado deve-se ao modelo de fratura, com perda óssea, e análise a partir do sétimo dia após a fratura onde não foi possível visualizar a fase inflamatória.

Histologicamente, o processo neste modelo de reparo ósseo consiste na fase inflamatória, de restauração, remodelagem e modelagem, como na recuperação de fraturas em humanos. Nos primeiros dias após a fratura há evidências histológicas de uma reação inflamatória aguda, onde estão presentes inicialmente neutrófilos em abundância e, posteriormente, linfócitos e macrófagos (CHAKKALAKAL, et al.1999).

Kostjens et al. (2003) fizeram uma análise morfométrica *in vitro* da estimulação do ultrassom (1,5 MHz, 30 mW/cm²) na diferenciação de células ósseas. Seus resultados sugerem que, o tratamento com US, produz na ossificação endocondral, matriz calcificada e diferenciação em células ósseas, mas não altera a proliferação celular. Atualmente a discussão da importância de estudos *in vivo* ou *in vitro* é fundamental para comprovar o efeito do US nos tecidos biológicos.

No presente trabalho foi evidenciado que a frequência de repetição de pulso de 100 Hz estimulou a ossificação, mas não a proliferação celular. Já a frequência de repetição de pulso de 16 Hz estimulou a proliferação celular e ossificação, sendo a frequência de 100 Hz mais eficiente na promoção da ossificação.

Estudos experimentais utilizam uma grande variedade de frequências (1 a 3 MHz) e intensidades de US, que variam entre 0,03 a 0,5 W/cm² (DYSON; BROOKES, 1983; DUARTE, 1983; TER HAR, 1999, BUSSE et al., 2002). Alguns trabalhos demonstram que intensidades acima de 0,5 W/ cm² têm efeitos deletérios no processo de reparo (TSAI; CHANG; LIU, 1992; REHER et al., 1997; ter HAAR, 1999; HARLE et al., 2001). No

presente trabalho ficou demonstrado que o US na intensidade de $0,5 \text{ W/cm}^2$ apresentou efeito benéfico sobre a regeneração óssea. Resultados semelhantes foram obtidos por Douat (2004)

Contudo, ainda é necessário um maior número de estudos para entender e comprovar os mecanismos de ação do ultra-som. Trabalhos com técnicas específicas de identificação celular, detecção de fatores de crescimento e expressão gênica e análises mecânicas podem trazer resultados esclarecedores no processo de reparo e/ou regeneração dos diferentes tecidos tratados com ultra-som.

5 CONCLUSÃO

Os resultados encontrados no presente trabalho sugerem que o tratamento com US 1 MHz acelerou a regeneração óssea e modulou os níveis sanguíneos de fosfatase alcalina e cálcio sendo que, a frequência de repetição de pulso de 100 Hz demonstrou ser mais eficaz que a frequência 16 Hz.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AUGAT, P. MARGEVICIUS, K. SIMON, J. WOLF, S. SUGER, G. CLAES, L. Local tissue properties in bone healing: influence of size and stability of osteotomy gap. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 16, p. 475-481, 1998.

AZUMA, Y. ITO, M. HARADA, Y. TAKAGI, H. OHTA, T. JINGUSHI, S. Low-intensity pulsed ultrasound accelerates rat femoral fracture healing by acting on various cellular reactions in the fracture callus. **Journal of Bone and Mineral Research** v.16, n. 4, p. 671-80, 2001.

BAKER, K.G.; ROBERTSON, V. J.; DUCK, F.A. A review of therapeutic Ultrasound: Biophysical effects. **Physical Therapy**, v 81, n 7, p 1351-58, 2000.

BASSET, C. A. L.; BECKER, R. O. Generation of electric potentials by bone in response to mechanical stress. **Science**, v. 137, p. 1063-64, 1962.

BUCKWALTER, J. A.; CRUESS, R. L. A cura dos tecidos musculoesqueléticos. In: ROCKWOOD JÚNIOR, C. A.; GREEN, D. P.; BUCHOLZ, R. W. **Fraturas em Adultos**, vol. 01, 3ª ed. São Paulo: Manole, p. 179-219 1993.

BUSSE, W.J.; BHANDARARI, M.; KULKARNI, A. V.; TUNKS, E. The effect of low-intensity on time to fracture healing: a meta-analysis. **Journal Association Medical Canadian**, v. 166 n. 4, p. 437-441, 2002.

CARANO, R. A.D.; FILVAROFF, E. H. Angiogenesis and bone repair. **Drug Discovery Today** v. 8, n. 21, p. 980-989, 2003.

CHAKKALAKAL, D. A.; STRATES, B. S.; MASHOOF, A. A.; GARVIN, K. L.; NOVAK, J. R.; FRITZ, E. D.; MOLLNER, T. J.; McGUIRE, M. H. Repair of segmental bone defects in the rat: an experimental model of human fracture healing. **Bone**, v. 25, n. 3, p. 321-332, 1999.

CHANG, W.H. SUN, J.S. CHANG, S.P. LIN, J.C. Study of thermal effects of ultrasound stimulation on fracture healing. **Bioelectromagnetics**, v. 23, n. 4, p. 256-63, 2002.

CHAPMAN, I.V. MACNALLY, N.A. TUCKER, S. Ultrasound induced changes in the rates of influx and efflux of potassium ions in rat thymocytes in vitro. **Ultrasound in Medicine and Biology**, v. 6, p. 47-58, 1979.

CHARMAN, R. A. Strain Generated Potentials in Bone and Connective Tissue. **Physiotherapy**, 75(11): 725-730. 1990.

CORNEL, C. N. Osteobiologics. **Bull Hosp Jt Dis.** v. 62 p. 7-13, 2004

CORNEL, C. N. LANE, J. M. Newest factors in fracture healing. **Clinical Orthopaethic** v. 277, p. 297-311, 1992.

CUNHA, A. PARIZOTTO, N. A.; VIDAL, B. C. The effect of therapeutic ultrasound on repair of the achiles tendon (tendo calcaneus) of the rat. **Ultrasound in Medicine and Biology**, v. 27, n. 12, p. 1691-1696, 2001.

DOBLARÉ, M.; GARCÍA, J. M.; GÓMEZ, M. J. Modelling bone tissue fracture and healing: a review. **Engineering Fracture Mechanics**, v. 71, p.1809–1840, 2004.

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

DUARTE, L.R. **Estimulação Ultra-sônica do Calo Ósseo**, Tese de Livre Docência, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 1977.

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

DYSON, M. Mechanisms involved in therapeutic ultrasound. **Physiotherapy**, v. 73, n. 3, p. 116-120, 1987.

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

DYSON M.; SUCKLING, J., Simulation of repair by ultrasound: a survey the mechanism involved. **Physiotherapy**, v. 64, n. 4, p. 105-108, 1978.

EINHORN, T.A. The cell and molecular biology of fracture healing. **Clin Orthop Rel Res**, v. 355, p. S7-S21, 1998.

FAGANELO, F.R.; CARVALHO, D.C.L. **Ação do ultra-som sobre fraturas de ratas osteopênicas**. Trabalho de Graduação. Curso de Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos, 1999.

FEDDE, K.N.; BLAIR, L.; SILVERSTEIN, J.; COBURN, S.P.; RYAN, L.M.; WEINSTEIN, R.S.; WAYMIRE, K.S.; NARISAWA, S.; MILAN, J.L.; MacGREGOR, G.R. WHYTE, M.P. Alkaline phosphatase knock-out mice recapitulate the metabolic and skeletal defects of infantile hypophosphatasia. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 14, p. 2015-2026, 1999.

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

GARDNER, E.; GRAY, D. J; RAHILLY, R. O.; **Anatomia**, 4^aed: Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1988

GARNERO, P.; DELMAS, P. D. Biochemical markers of bone turnover: Applications for osteoporosis. **Endocrinol. Metab. Clin. N. Am.**, v. 27, p. 303-323, 1988.

GOUVEA, C. M. C. P.; VIEIRA, P. M. N., AMARAL, A. C. Efeito do ultra-som na recuperação de músculo tibial anterior de rato lesado. **Revista da Universidade de Alfenas**, v.4, p. 165-173, 1998.

HAM, A.W. **Histologia**. 6ª ed., Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 1972. Cap. 18.

HARLE, J.; SALIH, V.; MAYIA, F.; KNOWLES, J. C.; OLSEN, I. Effects of ultrasound on the growth and function of bone and periodondal ligament cells *in vitro*. **Ultrasound in Medicine and Biology**, v. 27, n. 4 p. 579-586, 2001.

HARVEY, W.; DYSON, M.; POND, J.B.; GRAHAME, R. The stimulation of protein synthesis in human fibroblasts by therapeutic ultrasound. **Rheumatology and Rehabilitation**, v. 14 p. 237, 1975

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

HENTHORN, P. S; MILLÁN, J. L; LEBOY, P. in SEIBEL, M. J.; ROBINS, S. P.; BILEZIKIAN, J. P. **Dynamics of Bone and Cartilagens Metabolism**. USA: Academic Press, cap 9, p 127, 1999.

HING, K. A. Bone repair in the twenty-firt century: biology, chemistry or engineering? **Philos Transact Ser A Math Phys Eng Sci**. v. 362, n. 1825, p. 2821-50, 2004.

HOOGLAND, R. **Terapia ultrasónica**. Enraf nonius, 1986.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO J. S. F. **Histologia Básica**. 7^a.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1990.

KANH, J. **Ultrasound in Principles and Practice of Electrotherapy**, 2^a ed. Nova York: Churchill Livingstone, Cap. 4, p. 51-70, 1991.

KITCHEN S. S.; PARTRIDGE C. J. A review of therapeutic ultrasound. Part 1: Background and physiological effects. **Phisiotherapy**, v. 76, n. 10, p. 593-600, 1990.

KORSTJENS, C.M.; NOLTE, P.A.; BURGER, E.H.; ALBERS, G.H.R.; SEMEINS, C.M.; AARTMAN, I.H.A.; GOEI, S.W.; KLEIN-NULEND, J. Stimulation of bone cell differentiation by low-intensity ultrasound- a histomorphometric in vitro study. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 10, n. 16 p. 1-6, 2003.

LANYON, L.E. Osteocytes, strain detection and bone modeling and remodeling. **Calcified Tiss Int**, v. 53, p. 102-7, 1993.

LAUFFENBURGER, T.; OLAH, A.J.; DAMBACHER, J.; GUNCAGA, J.; LENTNER, C.; HAAS, H. Bone remodeling and calcium metabolism: a correlated histomorphometric, calcium kinetic, and biochemical study in patients with osteoporosis and Paget's disease. **Metabolism** v. 26, p. 589-597, 1977.

LEUNGH, K.S.; LEE, W.S.; TSUI, H.F.; LIU, P.P.; CHEUNG, W.H.; Complex tibial fractures outcomes following treatment with low intensity pulsed ultrasound. **Ultrasound in Medicine and Biology** v. 30, n. 3, p. 389-395, 2004.

LI, J. K; CHANGA, W. H.; LIN, J. C, RUAAN, R. C.; LIUC, H. C.; SUN, J. S. Cytokine release from osteoblasts in response to ultrasound stimulation. **Biomaterials**, v. 24, p. 2379–2380, 2003.

LIBOFF, A.R. Toward an electromagnetic paradigm for biology and medicine. **Journal Altern Complement Medicine**, v. 10, n. 1, p. 41-47, 2004.

MASSE, P.G.; BOSKEY, A.L.; ZIV, I.; HAUSCHKA, P.; DONOVAN, S.M.; HOWELL, D.S.; COLE, D.E. Chemical and biomechanical characterization of hyperhomocysteinemic bone disease in an animal model. **BMC Musculoskelet Disord**, v. 20, n. 4, p.2, 2003.

McKIBBIN, B. The biology of fracture healing in long bones. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 60-B, n.2, p. 150-161, 1978.

NAGAMINE, T.; IMAMURA, T.; ISHIDOU, Y.; KATO, M.; MURATA, F.; ten DIJKE, P.; SAKOU, T. Immunohistochemical detection of activin A, follistatin, and activin receptors during fracture healing in the rat. **Journal of Orthopaedic Research**, v.16, n.3, p. 314-321, 1998.

NARUSE, K.; MIYAUCHI, A.; ITOMAN, M.; MIKUNI-TAKAGAKI, Y. Distinct anabolic response of osteoblast to low-intensity pulsed ultrasound. **J Bone Miner Res**, v. 18 p. 360-369, 2003.

NORDIN, B.; MORRIS, H. The calcium deficiency model for osteoporosis. **Nutr Rev**, v. 47, n. 3, p. 65-72, 1989.

ONI, O. A. The bony callus, **Injury**, v. 28 n. 9-10, p. 629-631, 1997.

PILLA, A. Low-intensity electromagnetic and mechanical modulation of bone growth and repair: are they equivalent? **Journal Orthopaedic Science**, v.7, p.420–428, 2002.

PILLA, AA.; MONT, M.A.; NASSER, P.R.; KHAN, S.A.; FIGUEIREDO, M.; KAUFMAN, J.J.; SIFFERT, R.S. Non-invasive low-intensity pulsed ultrasound accelerates bone healing in the rabbit. **Journal of Orthopedic Trauma**, v. 4, n. 3, p. 246-253, 1990.

REHER, P.; DOAN, N.; BRADNOCK, B.; MEGHJI, S.; HARRIS, M. Effect of ultrasound the production of IL-8, basic FGF and VEGF. **Cytokine**, v. 11, n.6, p 146-423, 1999.

REHER, P.; EL-NOOR, I. ELBESHIR; HERVEY, W.; MEGHJI, S.; HARRIS, M. The stimulation of bone formation *in vitro* by therapeutic ultrasound. **Ultrasound in Medicine and Biology**, v. 23, n. 8 p. 1251-1258; 1997

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

SCHORTINGHUIS, J.; RUBEN, J. L; RAGHOEBAR, G. M.; STEGENGA, B. Therapeutic ultrasound to stimulate osteoconduction: A placebo controlled single blind study using e-PTFE membranes in rats, **Archives of Oral Biology** v. 49, p. 413-420, 2004a.

SCHORTINGHUIS, J.; RUBEN, J. L; RAGHOEBAR, G. M.; STEGENGA, B. Ultrasound to stimulate mandibular bone defect healing: a placebo-controlled single-blind study in rats, **Journal Oral Maxillofacial Surgery**, v.62, p.194-201, 2004b.

SAKURAKICHI, K.; TSUCHIYA, H.; UEHARA, K.; YAMASHIRO, T.; TOMITA, K.; AZUMA, Y. Effects of timing of low-intensity pulsed ultrasound on distraction osteogenesis. **Journal of Orthopedic Research**, v. 22, n. 2, p. 395-403, 2004.

SINGH, S.K.; MANJURE, S.; STOTT, P.; SHETTY, A.; IVERSEN, S.A.; WIKKIAMS, C.R. **Journal of Orthopaedic Surgery**, v. 12, n.1, p. 31-34, 2004.

SUMMER, W. PATRICK, M.K. **Ultrasound Therapy – a Textbook for Physiotherapists**. London: Elsevier, 1964.

SUN, J.S.; HONG, R. C.; CHANG, W. H.; CHEN, L. T.; LIN, F. H.; LIU, H. C., In vitro effects of low-intensity ultrasound stimulation on the bone cells, **Journal of Biomedical and Material Research**; v.57, p.449-456, dec 5, 2001.

ter HAAR, G. Therapeutic ultrasound. **European Journal of Ultrasound**, v. 9, p. 3-9, 1999.

TIS, J.E; MEFFERT, R.H.; INOUE, N.; MCCARTHY, E.F.; MACHEN, M.S.; McHALE, K.A.; CHAO, E.Y. The effect of low intensity pulsed ultrasound applied to rabbit tibiae during the consolidation phase of distraction osteogenesis. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 20, p. 793-800, 2002.

TSAI, C.L.; CHANG, W.H.; LIU, T.K. Preliminary studies of duration and intensity of ultrasonic treatments on fracture repair. **Chin J. Physiol**, v. 35, p. 21-26, 1992.

Van STRAALLEN, J.P.; SANDERS, E.; PRUMMEL, M.F.; SANDERS, G.T.B. Bone-alkaline phosphatase as indicator of bone formation. **Clin Chim Acta**, v. 201, p. 27-34, 1991.

WANG, S.J.; LEWALLEN, D.G.; BOLANDER, M.E. Low intensity ultra-sound treatment increases strength in a rat femoral fracture model. **J. Orthop Res.**, v. 12, p. 40-47, 1994.

WARDEN, S. J.; FAVALORO J. M.; BENNELL, K. L.; MCMEEKEN, J. M; NG, KONG-WAH; ZAJAC, J D; WARK, J D. Low-intensity pulsed ultrasound stimulates a bone-forming response in UMR-106. **Cells Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 286, p. 443–450, 2001.

WEINER, S.; WAGNER, H.D. The material bone: structure-mechanical function relations. **Ann Rev Mater Sci**, v.28, p. 271-98, 1998.

WILLIAMS, R. Production and transmission of ultrasound. **Phisiotherapy**, v. 73, p.113-116, 1987.

YANG, K.; PARK, S. Stimulation of fracture healing in a canine ulna full-defect model by low-intensity pulsed ultrasound. **Yonsei Medical Journal**, v.42, n. 5, p. 503-508, 2001.

YANG, K.H.; PARVIZI, J.; WANG, S.J.; LEWALLEN, D.G.; KINNICK, R.R.; GREENLEAF, J.F.; BOLANDER, M.E. Exposure to low-intensity ultrasound increases aggrecan gene expression in a rat femur fracture model. **J Orthop Res**, v. 14, p.802-809, 1996.

YOON, K.; GOLUB, E.; RODAN, G.A. Alkaline phosphatase cDNA transfected cells promote calcium and phosphorous deposition. **Connect Tissue Res.**, v. 22, p. 17-25, 1989.

ZHANG, Z.; HUCKLE, J.; FRANCOMANO, C. A.; SPENCER, R. G. S. The influence of pulsed low-intensity ultrasound on matrix production of chondrocytes at different stages of differentiation: An explant study. **Ultrasound in Medicine and Biology**, v. 28, n. 11/12, p.1547- 1553, 2002.