

**Ana Paula Rebucci Lirani**

**ESTUDO COMPARATIVO DOS EFEITOS DO ULTRA-  
SOM E DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE NO  
REPARO ÓSSEO DE TÍBIA 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 obtenção do título de Mestre em Bioengenharia.**

**ORIENTADOR: Dr. Orivaldo Lopes da Silva**

**São Carlos – SP**

**2004**

Dedico este trabalho aos meus pais, alicerces de toda e cada etapa sonhada e cumprida em minha vida.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela graça da existência, por ser meu pai e meu pão; por me conduzir, guardar e iluminar com Sua infinita bondade e sabedoria.

Aos meus pais, João e Lurdinha, pelo amor incondicional, pela dedicação integral e pela calorosa generosidade.

Aos meus queridos irmãos, João Paulo e Heloisa, pela alegre companhia e amoroso apoio.

Ao Dr. Orivaldo Lopes da Silva, meu orientador, pela amizade, dedicação, disposição e inúmeras conversas esclarecedoras, que muito enriqueceram este trabalho.

À Profª Dra Vanda Jorgetti, da Faculdade de Medicina da USP, pela bondade e gentil doação ao me acolher em seu laboratório e me ensinar sobre a técnica de histomorfometria.

Ao Nelson, pela ajuda integral (incluindo finais de semana!) e por ser esta pessoa fantástica que tive a honra de conhecer.

Ao Odilon, pela admirável paciência, companhia e ajuda, e por intermediar meus desentendimentos com o computador.

À Cristina e ao Grupo de Óptica do IFSC pela gentileza de ceder o equipamento de laser.

À Profª Dra Keico do Laboratório de Neuroendocrinologia do Departamento de Fisiologia da UFSCar pelo empréstimo da máquina de ensaio e ao Charles pela atenção e ajuda na realização dos ensaios.

À Janete e à Melaine, pela atenção e paciente ajuda sempre que precisei.

Ao Prof. Dr. Nivaldo Parizotto, que me recebeu com muita boa vontade em uma de suas disciplinas de pós-graduação na UFSCar.

À Tatiana Malosso, que muito me ajudou com entusiasmo e carinho sempre.

Ao Todinho, pela paciência e disposição para me ensinar a “desvendar” o Autocad.

À minha querida prima Raquel, pelo auxílio na digitalização das imagens e pela carinhosa amizade.

Aos professores da Bioengenharia pelo conhecimento transmitido, e aos funcionários, colegas e alunos da Bioengenharia pela agradável companhia.

Aos meus professores de graduação da Universidade Estadual de Londrina, pela minha formação, especialmente aos professores Cláudia Patrícia Siqueira, Jefferson Cardoso, Fábio Pitta e Suhaila Smaili Santos pelo entusiasmo contagiante da arte de pesquisar e ensinar que tanto me estimulou a fazer ciência.

À Marilisa, grande amiga e irmã, pelo carinho e apoio mesmo à distância.

À Leandra, grande amiga e companheira, por tantos momentos enriquecedores que passamos juntas.

Aos colegas e amigos da Associação Desportiva e Cultural Cativoiro Capoeira, sem o auxílio dos quais eu não manteria meu bem estar físico e psíquico durante estes dois anos, especialmente ao Kalango, fiel amigo e companheiro como poucos.

À CAPES pela bolsa concedida de junho a novembro/2003.

À minha família e amigos que, muitas vezes sem saber, me ajudaram neste processo, por todas aquelas coisas que se diz quando se quer exprimir em palavras um grande e redondo obrigado!

“Uma falsa ciência faz tornar ateus,  
mas uma verdadeira ciência  
prosterna o homem diante da  
divindade”.

(Voltaire)

## RESUMO

LIRANI, A. P. R. (2004). Estudo Comparativo dos Efeitos do Ultra-som e do Laser de Baixa Intensidade no Reparo Ósseo de Tíbia de Rato. Dissertação de Mestrado – Escola de Engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.

Vários estudos têm avaliado os efeitos do ultra-som e da radiação laser de baixa intensidade separadamente no reparo ósseo. No entanto, são escassas as comparações entre estas duas modalidades terapêuticas. Este estudo teve por objetivo avaliar e comparar, através de análise histomorfométrica e ensaio mecânico de flexão em três pontos, as conseqüências que estes agentes físicos podem trazer ao reparo do tecido ósseo em osteotomias transversais experimentais em tíbias de ratos. Foram utilizados 48 ratos com fratura cirúrgica unilateral parcial do terço superior de tíbia. Os animais foram divididos em três grupos de 16 animais. Em um grupo, o membro fraturado foi tratado com ultra-som pulsado de baixa intensidade (frequência de 1,5 MHz, ciclo de trabalho 1:4, intensidade SATA 30 mW/cm<sup>2</sup>) em sessões de 20 minutos, 5 vezes por semana, em 12 dias de tratamento. Em um segundo grupo, o membro fraturado foi tratado com laser As-Ga-Al (112,5 J/cm<sup>2</sup>, 780 nm, 30 mW) em sessões de 2,5 minutos, 5 vezes por semana, em 12 dias de tratamento. O terceiro grupo serviu de controle, sendo submetido à mesma cirurgia na tíbia direita mas não recebeu qualquer tratamento. No ensaio mecânico, a carga no limite máximo suportada pelo grupo tratado com laser foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) que os grupos tratados com ultra-som e controle. Na análise histomorfométrica, o grupo tratado com laser apresentou significância estatística quanto ao número e superfície de osteoblastos e volume e superfície de osteóide e o grupo ultra-som obteve significância para as superfícies de reabsorção e de osteoclastos. Pode-se concluir que o ultra-som acelerou o reparo ósseo (em relação ao grupo controle) por viabilizar mais rapidamente a fase de reabsorção, enquanto que a terapia laser foi capaz de acelerar ainda mais este processo por já promover predomínio de formação óssea no 19<sup>o</sup> dia pós-cirúrgico no modelo experimental utilizado neste estudo.

Palavras-chave: reparo ósseo, terapia laser de baixa intensidade (LILT), ultra-som de baixa intensidade, ensaio mecânico, histomorfometria.

## **ABSTRACT**

LIRANI, A. P. R. (2004). Comparative Study of Ultra-sound and Low Intensity Laser Therapy Effects on Bone Healing in Rats Tibia. M.Sc. Dissertation – Escola de Engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.

Many studies have assessed the effects of ultra-sound and low intensity laser therapy separately in bone repair. However, the comparison between these two therapeutic modalities is rare. The objective of this study was to verify and compare, through histomorphometrical analysis and a three-point bending test, the consequences of these physical agents on bone healing in animals. 48 male Wistar rats were used with tibial bone partial osteotomy, divided into 3 groups of 16. In one group, rats had their fractured limb treated with GaAlAs laser (780 nm, 30 mW, 112,5 J/cm<sup>2</sup>) in 12 five times-a-week sessions. In another group, rats were treated with low intensity pulsed ultra-sound (1,5 MHz, 30 mW/cm<sup>2</sup>) in 12 five times-a-week sessions too. In a third group, animals were taken as control, being submitted to the same osteotomy but receiving no treatment. After 19 days the tibias were extracted and half of them were submitted to a three-point bending test and the other half to histomorphometric analysis. During the bending test, the maximum load at failure of the tibia in the laser group was significantly higher ( $p < 0.05$ ). Histomorphometry showed statistical significance in osteoblasts number and surface and osteoid volume and surface for the laser group, and eroded and osteoclasts surfaces for the ultra-sound group. Ultra-sound was able to enhance bone healing (compared to control group) by speeding up the reabsorption phase, while low intensity laser therapy could accelerate this process even more by promoting mostly new bone formation 19 days after osteotomy in this experimental model.

*Key words:* bone healing, low intensity laser therapy (LILT), low-intensity ultra-sound, bending test, histomorphometry.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Representação dos dois componentes da macroestrutura óssea.....	06
FIGURA 2 - Representação dos quatro componentes da microestrutura óssea.....	10
FIGURA 3 - O espectro eletromagnético.....	25
FIGURA 4 - Fotos da cirurgia.....	41
FIGURA 5 - Tratamento com ultra-som da tíbia fraturada.....	42
FIGURA 6 - Tratamento com laser da tíbia fraturada.....	42
FIGURA 7 - Máquina de ensaio e detalhamento da posição da tíbia.....	47
FIGURA 8 - Desenho do suporte metálico para apoio das tíbias. ....	47
FIGURA 9 - Suporte metálico.....	48
FIGURA10 - Detalhamento da secção transversal da tíbia no suporte metálico.....	48
FIGURA 11 - Forças e momentos atuantes na tíbia ensaiada.....	49
FIGURA 12 - Momentos de inércia da tíbia ensaiada.....	50
FIGURA 13 - Gráfico carga <i>versus</i> deformação.....	52
FIGURA 14 - Média da carga no limite máximo.....	53
FIGURA 15 - Média das flechas.....	54
FIGURA 16 - Média das tensões.....	55
FIGURA 17 - Média da área de tecido e média de volume ósseo.....	56



FIGURA 18 - Média da separação trabecular e média do número de trabéculas ósseas.....	57
FIGURA 19 - Média do volume de osteóide/ volume ósseo e superfície de osteóide/ superfície óssea.....	58
FIGURA 20 - Média da superfície de osteoblastos e média do número de osteoblastos.....	59
FIGURA 21 - Média da superfície de reabsorção.....	59
FIGURA 22 - Média da superfície de osteoclastos e média do número de osteoclastos.....	60
FIGURA 23 – Média da espessura trabecular.....	61

## **LISTA DE TABELAS**

TABELA 1 - Médias e desvios padrão da área e do momento de inércia.....	54
-------------------------------------------------------------------------	----

## LISTA DE SIGLAS

As-Ga-Al	Arseneto de Gálio-Alumínio
ATP	Adenosina trifosfato
BSU	Basic Structural Unit (Unidade Estrutural Básica)
BRU	Basic Remodelling Unit (Unidade Básica de Remodelamento)
BV/TV	Bone Volume / Tissue Volume (Volume Ósseo/ Volume Tecidual)
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
EMF	Electrical Magnetic Field (Campo Eletromagnético)
E(t)	Campo Elétrico em função do Tempo
ES/BS	Eroded Surface / Bone Surface (Superfície Erodida / Superfície Óssea)
FDA	Food and Drug Administration (Administração de alimentos e Drogas)
He-Ne	Hélio-Neônio
LILT	Low Intensity Laser Therapy (Terapia Laser de Baixa Intensidade)
LLLT	Low Level Laser Therapy (Terapia Laser de Baixa Potência)
N.Ob/T.Ar	Osteoblast Volume Density (Densidade de Volume de Osteoblastos)
N.Oc/T.Ar	Osteoclast Volume Density (Densidade de Volume de Osteoclastos)
Ob.S/BS	Osteoblast Surface / Bone Surface (Superfície de Osteoblastos/ Superfície Óssea)
Oc.S/BS	Osteoclast Surface / Bone Surface (Superfície de Osteoclastos/ Superfície Óssea)
OS/BS	Osteoid Surface / Bone Surface (Superfície Osteóide/ Superfície Óssea)
OV/BV	Osteoid Volume / Bone Volume (Volume Osteóide/ Volume Ósseo)

SATA	Space Average Time Average (Média Espacial e Média Temporal)
SGP	Strain Generating Potentials (Potenciais Gerados à partir de Deformação)
T.Ar	Tissue Area (Área do Tecido)
Tb.N	Trabecular Number (Número de Trabéculas)
Tb.Sp	Trabecular Separation (Separação Trabecular)
Tb.Th	Trabecular Thickness (Espessura Trabecular)
US	Ultra-som

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	ii
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	iii
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	v
<b>LISTA DE SIGLAS</b> .....	vi
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	01
1.1 Aspectos Gerais .....	01
1.2 Objetivos .....	04
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	05
2.1 Tecido Ósseo.....	05
2.1.1 Células Ósseas.....	09
2.1.2 Remodelamento Ósseo.....	10
2.1.3 Fratura e Reparo Ósseo.....	12
2.2 O Ultra-som.....	13
2.2.1 O Ultra-Som de Baixa Intensidade no Reparo Ósseo.....	14
2.3 O Laser.....	20
2.3.1 A Física do Laser.....	24
2.3.2 O Laser de Baixa Intensidade no Reparo Ósseo.....	26
2.4 Similaridades entre as Diferentes Modalidades Terapêuticas.....	32

2.5	Histomorfometria Óssea.....	33
2.6	Biomecânica do Osso e Ensaio de Flexão.....	35
<b>3.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>40</b>
3.1	Cirurgia e Tratamento.....	40
3.2	Análise Histomorfométrica.....	44
3.3	Ensaio Mecânico.....	46
3.4	Análise Estatística.....	51
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>52</b>
4.1	Resultados do Ensaio Mecânico.....	52
4.1.1	Carga Máxima.....	52
4.1.2	Flecha.....	53
4.1.3	Área da Secção Transversal do Calo e Momento de Inércia.....	54
4.1.4	Tensão Máxima.....	55
4.2	Resultados da Histomorfometria Óssea.....	55
4.2.1	Área de Tecido e Volume Ósseo.....	56
4.2.2	Separação Trabecular e Número de Trabéculas.....	56
4.2.3	Volume e Superfície Osteóide.....	57
4.2.4	Superfície de Osteoblastos e Densidade de Volume de Osteoblastos.....	58
4.2.5	Superfície Erodida.....	59
4.2.6	Superfície de Osteoclastos e Densidade de Volume de Osteoclastos.....	60
4.2.7	Espessura Trabecular.....	60
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>62</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>72</b>

<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	73
<b>APÊNDICE A</b> - Dados Relativos ao Ensaio Mecânico.....	78
<b>APÊNDICE B</b> - Dados Relativos à Análise Histomorfométrica.....	80
<b>APÊNDICE C</b> - Dados Estatísticos Relativos ao Ensaio Mecânico.....	82
<b>APÊNDICE D</b> - Dados Estatísticos Relativos à Análise Histomorfométrica.....	85
<b>ANEXO A</b> - Protocolo para Histologia de Tecido Ósseo Calcificado.....	93

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Aspectos Gerais

O osso é o elemento estrutural primário do corpo humano. Ele serve para proteger órgãos internos vitais e dar suporte aos músculos que permitem movimentos do esqueleto. O osso difere de materiais estruturais de engenharia pois ele é auto-reparador e pode alterar suas propriedades e geometria em resposta a mudanças na demanda mecânica (KAPLAN *et al.*, 1994).

Só nos Estados Unidos, estima-se que ocorram 5,6 milhões de fraturas por ano, sendo que 5 a 10% evoluem para retardo de consolidação ou pseudartrose (EINHORN, 1995).

A tíbia, sendo o osso longo mais comumente fraturado, é associado com uma alta incidência de retardo de consolidação e não-união óssea. Os gastos com tratamento de fraturas de tíbia são raramente estudados mas estes incluem cirurgias, pós-operatório, custos do paciente e licença do trabalho. Com o uso do ultra-som de baixa intensidade durante o tratamento conservador de um estudo com 1000 pacientes, economizou-se mais de 15000 dólares (40%) por caso, por diminuir gastos com procedimentos secundários e custos de compensação dos trabalhadores. Uma economia similar de 13000 dólares por caso é obtida quando o uso do ultra-som é associado ao tratamento cirúrgico (HECKMAN; SARASOHN-KAHN, 1997).

Com o objetivo de reduzir a substancial incapacidade associada à fratura e os custos sócio-econômicos, uma variedade de intervenções tem sido proposta, incluindo o uso do ultra-som pulsado e a terapia laser, ambos de baixa intensidade.



O ultra-som de baixa intensidade tem sido utilizado no mundo todo desde a década de 50 com o objetivo de reduzir dor e imobilidade articular (GAM; JOHANNSEN, 1995). No final desta mesma década, Fukada e Yasuda (1957) constataram a piezoelectricidade do osso, pois este material pode converter energia mecânica em energia elétrica. À partir desta descoberta, Duarte e Xavier (1983) preconizaram o uso do ultra-som pulsado para acelerar o reparo ósseo com base na semelhança do mesmo com o processo natural de cura de fraturas. Muitos trabalhos experimentais e clínicos tem sido publicados desde então e, atualmente, esta modalidade terapêutica é bem estabelecida e amplamente utilizada.

O laser de baixa intensidade foi primeiro utilizado como estímulo para a proliferação celular por Mester e colaboradores (1985) pois, até então, este tipo de laser só era utilizado como luz guia para lasers de alta potência em cirurgias. Seu efeito estimulante foi primeiramente utilizado na cura de feridas e, atualmente, este recurso terapêutico é investigado no reparo de diversos tecidos biológicos, incluindo o tecido ósseo, sendo este último o menos estabelecido e o mais raramente estudado.

Os efeitos da laserterapia descritos na literatura são principalmente na área de cicatrização de tecidos e condução nervosa. Kitchen e Partridge (1991) afirmam que é interessante notar as similaridades entre os efeitos fisiológicos do ultra-som e do laser.

É importante lembrar que, antes de uma nova tecnologia médica ser incorporada ao uso clínico, sua eficácia, segurança e custo-benefício devem ser demonstradas. Mesmo considerando que os estudos clínicos para tratamento de pseudartrose exijam que os investigadores demonstrem que uma fratura não curada possa ser estimulada para tal com segurança, fornecer evidências convincentes

sobre a acentuação do reparo ósseo de fraturas recentes é mais difícil. Quantificar o reparo ósseo ou mesmo mostrar que uma fratura possa ser curada por métodos não-invasivos pode ser uma tarefa desafiadora (EINHORN, 1995).

## 1.2 Objetivos

*Objetivo geral:* Analisar e comparar os efeitos do ultra-som e do laser de baixa intensidade no reparo ósseo em tíbias de ratos.

*Objetivo específico:* Analisar a influência da aplicação do ultra-som pulsado de baixa intensidade e da radiação laser de baixa intensidade nas propriedades mecânicas e nas características histológicas avaliadas por histomorfometria do tecido ósseo neoformado em osteotomias experimentais em tíbias de ratos.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

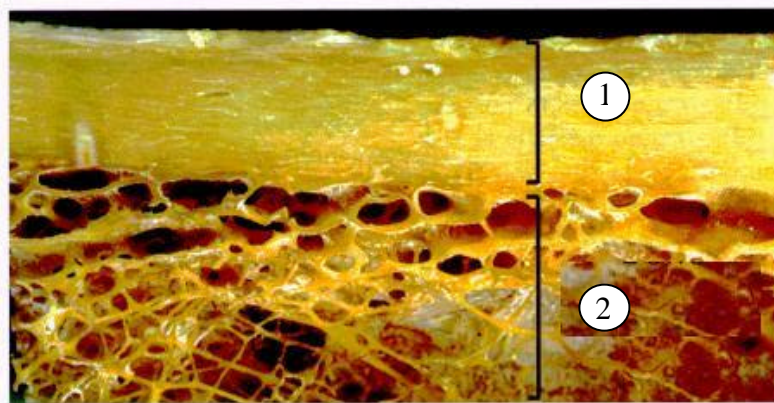
### 2.1. Tecido Ósseo

É de consenso geral que osso é um órgão individual do sistema esquelético mas o termo osso tem pelo menos três significados. O primeiro é matriz óssea mineralizada excluindo o osteóide; este uso se adequa rigorosamente à definição de osso como tecido duro. O osteóide é a matriz óssea que vai ser (mas ainda não é) mineralizada, e às vezes é chamada de pré-osso. O segundo significado de “osso”, e o por nós adotado, é matriz óssea mineralizada ou não, isto é, incluindo ambos osso mineralizado e osteóide. O terceiro significado de “osso” é um tecido incluindo medula óssea e outros tecidos moles, bem como osso definido previamente. Nos referimos à combinação de osso e tecido mole associados ou medula como “tecido ósseo”. “Tecido” é definido como “uma agregação de células similarmente especializadas unidas na execução de uma função específica”. Neste sentido, osso, medula óssea e os componentes dos canais osteonais certamente não são o mesmo tecido, mas, em um senso mais geral, a maioria dos livros de histologia reconhece apenas quatro tecidos fundamentais – epitélio, nervo, músculo e tecido conjuntivo, e este último inclui osso e todo o tecido não mineralizado que o acompanha (PARFITT *et al.*, 1987).

Rho e colaboradores (1998) sugeriram uma organização estrutural hierárquica para melhor compreensão das propriedades mecânicas do material ósseo, compreendendo: (a) macroestrutura: osso trabecular e cortical; (b) microestrutura (de 10 a 500  $\mu\text{m}$ ): sistemas de Havers, ósteons e trabéculas; (c) sub-microestrutura (1-10  $\mu\text{m}$ ): lamelas; (d) nanoestrutura (de alguns centos de nanômetros a 1  $\mu\text{m}$ ):

colágeno fibrilar e minerais embebidos; e (e) sub-nanoestrutura (menor que alguns centos de nanômetros): estrutura molecular dos elementos constituintes, como os minerais, colágeno e proteínas orgânicas não-colágenas.

(a) O esqueleto consiste de dois tipos de osso macroscopicamente diferentes: osso cortical, que predomina em ossos longos das extremidades, e osso trabecular, que predomina nas vértebras e na pelve (ERIKSEN, *et al.* 1994).



**FIGURA 1 – Representação dos dois componentes da macroestrutura óssea:**

1) Osso cortical: constitui 80% do esqueleto, duro e denso, forma a parte externa e o corpo de ossos longos.

2) Osso trabecular: constitui os 20% restantes, rede 3D de trabéculas, forma vértebras e extremidades de ossos longos.

**FONTE:** HOLLINGER, J.O.; BUCK, D.C.; BRUDER, S.P. (1999). *Biology of Bone Healing: Its Impact on Clinical Therapy*. In: LYNCH, S.E.; GENCO, R.J.; MARX, R.E. **Tissue Engineering**. Quintessence Publishing Co, Inc.

O osso *cortical* é compacto, denso, como visto no eixo de ossos longos e pode ser dividido em dois tipos anatômicos e funcionais: *periósteo* e *endósteo*. O *periósteo* é importante no crescimento aposicional e no reparo de fraturas. Ele provoca um desequilíbrio entre formação óssea e reabsorção para que ocorra com o tempo um aumento da rede óssea. O *endósteo* do osso cortical tem um nível mais elevado de atividade de remodelamento, resultando de mais deformação mecânica e/ou proximidade do espaço medular. Nas superfícies endosteais, a reabsorção

tende a exceder a formação, levando à expansão do espaço medular em ossos longos.

O osso *trabecular* consiste de finas placas ou espículas com espessuras variando de 50 a 400  $\mu\text{m}$ . Essas trabéculas são interconectadas num padrão de cacho de abelhas, oferecendo, assim, grande resistência mecânica. Em áreas submetidas a tensões mecânicas, o padrão trabecular desenvolve uma estrutura que garante adaptação máxima para o padrão de tensão dado. Por exemplo, a arquitetura trabecular do cólo do fêmur espelha as linhas de tensão desenvolvidas durante o carregamento mecânico produzido pelas cargas funcionais.

O osso cortical perfaz 80% da massa do esqueleto, com o osso trabecular constituindo os 20% restantes. No entanto, como o osso trabecular é metabolicamente mais ativo por unidade de volume, o metabolismo do esqueleto é quase que igualmente distribuído entre os dois tipos de osso (ERIKSEN, *et al.* 1994).

(b) O *sistema de Havers* é formado por canais vasculares circunferencialmente rodeados por osso lamelar e compõe o mais complexo tipo de osso cortical. Este arranjo complexo do osso ao redor do canal vascular é chamado *ósteon*. O *ósteon* é um cilindro irregular e ramificado com anastomoses composto por um canal neurovascular centralmente disposto rodeado por camadas permeadas por células da matriz óssea (KAPLAN *et al.*, 1994).

(c) As *lamelas* são fibras colágenas mineralizadas planarmente arranjadas. Quando estas fibras estão dispostas em camadas concêntricas ao redor de um canal central, forma-se um *ósteon* ou canal de Havers (RHO *et al.*, 1998).

No osso cortical e trabecular, as fibras colágenas são arranjadas numa orientação alternada que dá um claro padrão lamelar quando visto sob luz polarizada; esta orientação ortogonal aumenta a resistência óssea. No osso imaturo

(*woven bone*), que pode ser formado como osso primário ou em estados de grandes modificações (*turnover*) ósseas, as fibras colágenas são arranjadas de maneira desorganizada, o que compromete a resistência óssea (ERIKSEN, *et al.* 1994).

(d) O osso é um material compósito poroso de duas fases, sendo estas primariamente compostas por colágeno e matriz mineral, que juntas são responsáveis por suas propriedades mecânicas (BURR, 2002). De uma maneira simplificada, pode-se dizer que as fibrilas de colágeno resistem à forças de tração e a matriz mineral resiste à compressão (ALBERTS *et al.*, 1989).

(e) A *fase inorgânica* ou mineral é composta basicamente por fosfato de cálcio análogo a hidroxiapatita de cálcio cristalino. A *fase orgânica* da matriz extracelular cumpre vários papéis, determinando propriedades estruturais, mecânicas e bioquímicas do osso. Aproximadamente 90% da matriz orgânica é composta por colágeno tipo I; o restante consiste em proteínas não-colágenas, outros tipos de colágeno, lipídeos e outras macromoléculas. A interação dos hormônios e fatores de crescimento, presentes no tecido ósseo, com os receptores celulares regula o fluxo de íons cálcio na célula, evento este que pode ser a chave do controle da mineralização da matriz (KAPLAN *et al.*, 1994).

A contribuição da fase mineral para as propriedades mecânicas do osso tem dominado o pensamento científico. O papel desempenhado pelo colágeno tem sido subestimado e não muito bem estudado. No entanto, há evidências que mudanças na composição ou nas ligações cruzadas inter e intrafibrilares do colágeno possam reduzir a energia necessária para causar falência óssea e aumentar o risco de fratura. Apesar do colágeno poder ter menos efeito na resistência e na dureza que a matriz mineral, ele pode ter um efeito profundo na fragilidade óssea (BURR, 2002).

A associação de hidroxiapatita com fibras colágenas é responsável pela dureza e resistência do tecido ósseo. Após a remoção do cálcio, os ossos mantêm sua forma intacta, porém tornam-se tão flexíveis quanto os tendões. A destruição da parte orgânica, que é principalmente colágeno, pode ser realizada por incineração, e também deixa o osso com sua forma intacta, porém tão quebradiço que dificilmente pode ser manipulado sem se partir (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

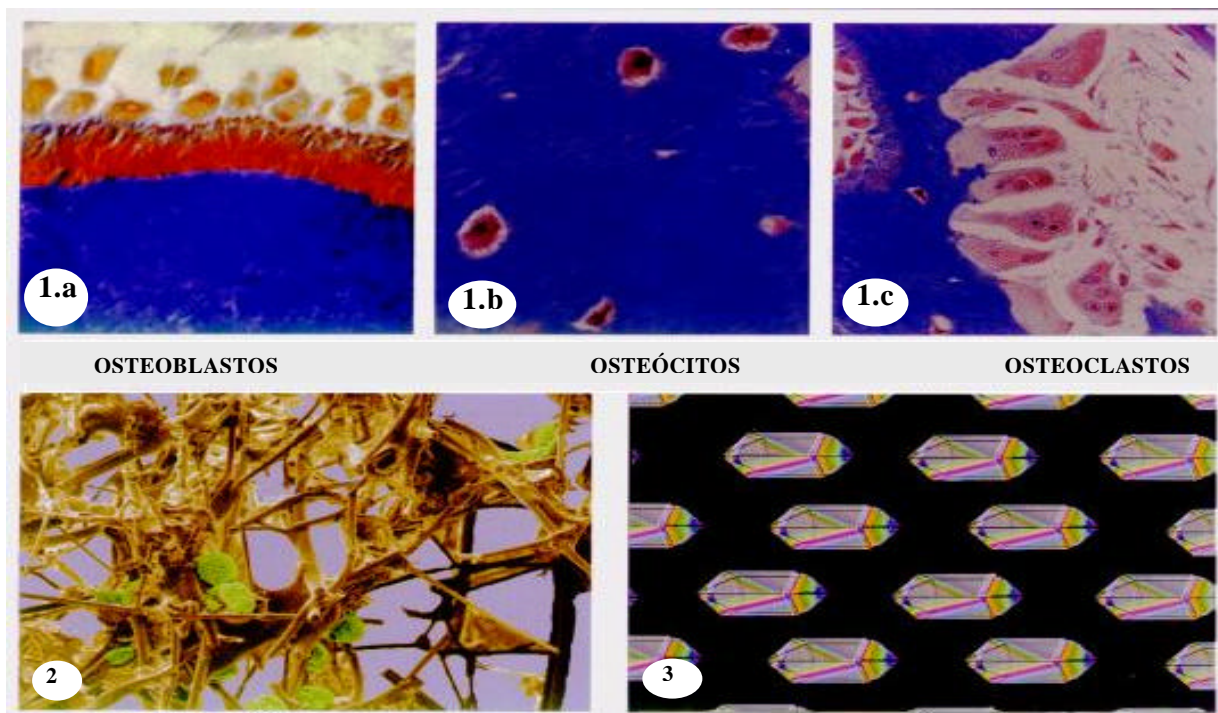
### **2.1.1 Células Ósseas**

Os tipos principais de células ósseas são osteoblastos, osteoclastos e osteócitos. As células formadoras de osso são os osteoblastos e os osteócitos; a principal diferença entre estas células é sua localização. Os osteoblastos se alinham na superfície óssea; já os osteócitos são osteoblastos maduros inseridos na matriz mineralizada. Células próximas ao osteoblasto, mas longe da superfície óssea, são às vezes chamadas de pré-osteoblastos.

Todas essas células são derivadas da mesma linha de células osteoprogenitoras. Os fatores que induzem o processo de diferenciação de células ósseas estão sob constante investigação, incluindo proteínas ósseas morfogenéticas, fatores de crescimento e citocinas (KAPLAN *et al.*, 1994).

Os osteoblastos produzem matriz óssea, que é predominantemente formada por colágeno tipo I. Os osteócitos são, pois, osteoblastos maduros na matriz óssea e provavelmente participam da sua manutenção, isto é, sua síntese e reabsorção numa extensão limitada. Já os osteoclastos reabsorvem osso, formando lacunas de Howship, em resposta a fatores liberados pelos osteoblastos (KAPLAN *et al.*, 1994; MARKS; HERMEY, 1996).





**FIGURA 2 – Representação dos quatro componentes da microestrutura óssea:**

1) **Células:** a) osteoblastos b) osteócitos e c) osteoclastos

2) **Matriz orgânica:** constituída por 90% de colágeno tipo I e 10% de elementos não-colagenosos.

3) **Matriz inorgânica:** consiste de cristais de cálcio e fosfato (hidroxiapatita)

**FONTE:** HOLLINGER, J.O.; BUCK, D.C.; BRUDER, S.P. *Biology of Bone Healing: Its Impact on Clinical Therapy*. In: LYNCH, S.E.; GENCO, R.J.; MARX, R.E. **Tissue Engineering**. Quintessence Publishing Co, Inc. 1999.

### 2.1.2 Remodelamento Ósseo

O crescimento ósseo começa intra-útero e continua durante a adolescência até a maturidade do esqueleto. Os ossos longos crescem através de dois mecanismos: eles crescem em comprimento pela ossificação endocondral, e em largura pela ossificação intramembranosa. Mesmo após a maturidade do esqueleto, os ossos continuam se remodelando durante a vida e adaptam suas propriedades materiais às solicitações mecânicas sobre eles impostas. Os mecanismos celulares e moleculares pelos quais o osso responde à carga mecânica são ainda assunto de investigação (KAPLAN *et al.*, 1994).

Todo ciclo de remodelamento é iniciado pela ativação de precursores osteoclásticos que se tornam osteoclastos multinucleados e iniciam a reabsorção óssea. Quando esta reabsorção acaba, a área é invadida por pré-osteoblastos que se diferenciam em osteoblastos, formando nova matriz que subsequentemente se torna mineralizada durante a contínua formação óssea. O remodelamento ósseo é freqüentemente descrito como uma seqüência ativação-reabsorção-formação. O período de remodelamento, isto é, a duração da seqüência completa de remodelamento, é normalmente subdividida em um período de reabsorção e um período de formação. Em humanos, com metabolismo ósseo normal, o período de remodelamento é de aproximadamente 100 dias no osso cortical e 200 dias no osso trabecular.

No osso cortical o processo de reabsorção dura 30 dias (em humanos), formando-se um túnel criado por osteoclastos. Em seguida, chegam os pré-osteoblastos que, diferenciando-se em osteoblastos, sintetizam a matriz que, após 15 a 20 dias, sofre mineralização. O período de formação dura em média 90 dias, durante o qual o osso novo preenche o túnel.

No osso trabecular humano, o processo de reabsorção dura ao redor de 43 dias. Durante um período de 7 dias os pré-osteoblastos migram para a cavidade de reabsorção e se diferenciam em osteoblastos. A formação de matriz então começa e dura 15 dias antes da detecção de sinais de mineralização. A cavidade de reabsorção é então preenchida com osso novo (ERIKSEN, *et al.* 1994).

O osso cortical é remodelado através da atividade de unidades de remodelamento ósseo (BRU – *Basic Remodelling Unit*). Os osteoclastos reabsorvem o osso como um “cone cortante”, deixando osso novo para trás (“cone de fechamento”) depositado pelos osteoblastos. Quando completo, este ósteon cortical

consiste de osso lamelar disposto em camadas concêntricas ao longo do eixo longo da BRU, ao redor de um canal central (haversiano) contendo vasos sanguíneos. O ósteon cortical constitui uma unidade estrutural óssea (BSU – *Basic Structural Unit*), representando o resultado final de um ciclo de remodelamento no osso cortical (ERIKSEN, *et al.* 1994; KAPLAN *et al.*, 1994). A porosidade do osso cortical é normalmente menor que 5%, como resultado de remodelamento contínuo ou da presença de canais de Havers de ósteons em descanso. Se a atividade de remodelamento aumenta, um aumento na porosidade e uma diminuição na massa óssea cortical podem ser esperados.

As BRUs trabeculares reabsorvem e formam osso na superfície trabecular e, como no osso cortical, deixam para trás unidades de osso lamelar novo. No entanto, ao contrário do osso cortical, o osso trabecular tem uma superfície relativamente grande envolvida na atividade de remodelamento. Isto explica a atividade metabólica mais intensa do osso trabecular.

O remodelamento ósseo é um fenômeno de superfície, e ocorre nas superfícies de periósteo, endósteo, canais de Havers e trabéculas (KAPLAN *et al.*, 1994). O crescimento do osso ocorre por *aposição*, o que implica na adição de camadas de matriz e células em superfícies livres do tecido mineralizado (ALBERTS *et al.*, 1989).

### **2.1.3 Fratura e Reparo Ósseo**

Fraturas do sistema esquelético constituem lesão consumada integral do osso, consistindo de todos os aspectos de lesão física e potencial circulatória do conteúdo celular viável bem como da integridade estrutural óssea. Células viáveis devem estar disponíveis; sinais apropriados devem ser gerados para permitir que

estas células produzam a matriz extracelular apropriada em cada fase do reparo, e um meio mecânico suficientemente conservado deve existir para assegurar que isto ocorra (OSTRUM *et al.*, 1994).

O reparo ósseo é um processo regenerativo altamente complexo e, essencialmente, uma repetição de eventos de desenvolvimento. Estes eventos incluem a ação de diferentes tipos de células, proteínas e uma expressão genética ativa que restaura a integridade natural dos ossos. Vários avanços biológicos e biofísicos têm sido introduzidos para minimizar o retardo de consolidação de fraturas e a pseudartrose, alguns com resultados promissores. Um exemplo deste avanço é o ultra-som pulsado de baixa intensidade, uma forma de energia mecânica transmitida transcutaneamente como ondas acústicas de alta frequência em organismos biológicos. Vários estudos com animais *in vivo*, duplo-cegos, com placebo e controlados clinicamente demonstraram que o ultra-som de baixa intensidade é capaz de acelerar e aumentar o reparo de fraturas agudas (HADJIARGYROU *et al.*, 1998).

## **2.2 O Ultra-som**

O ultra-som é uma forma de onda mecânica, similar à onda audível mas com uma frequência maior. Por definição, o ultra-som tem uma frequência superior a 16 kHz, acima do limiar audível para humanos. A onda é uma das maneiras da natureza transferir energia de um ponto a outro. Uma onda mecânica é aquela na qual a energia é transmitida por vibrações das moléculas do meio através do qual a onda está viajando (sólido, líquido ou gasoso) (TER HAAR, 1987).

Conforme a onda ultra-sônica atravessa um tecido, a energia contida nela diminui com a distância percorrida. Este processo é conhecido como *atenuação*. A absorção da energia mecânica pelo tecido leva ao aquecimento. Altas frequências são absorvidas mais rapidamente que as baixas.

Sob condições corretas, a irradiação ultra-sônica de líquidos pode levar à formação de pequenas bolhas. Estas bolhas (da ordem de  $10^{-6}$  m de diâmetro) podem ser dirigidas pelo campo ultrasônico para oscilar de maneira estável, aumentando e diminuindo em volume, seguindo as variações de pressão do campo, sendo chamada de *cavitação estável*, ou oscilar de maneira violenta, fazendo grandes excursões em volume antes de colapsar completamente, o que caracteriza o *colapso* ou a *cavitação transiente*. Ambos tipos de cavitação promovem fluxo do líquido local no fluido ao redor da bolha vibrante. Isto é conhecido como *streaming*, e pode levar a alguns dos benefícios obtidos na terapia ultra-sônica (TER HAAR, 1987).

### **2.2.1 O Ultra-Som de Baixa Intensidade no Reparo Ósseo**

Em um estudo com ossos humanos, Fukada e Yasuda (1957), constataram a piezoelectricidade do osso quando uma força de cisalhamento foi aplicada às fibras de colágeno. A *piezoelectricidade* do material foi observada quando este produziu, sob ação de carga mecânica, uma polarização elétrica, convertendo então a energia mecânica em energia elétrica (efeito piezoelétrico direto). O efeito piezoelétrico inverso é obtido quando se aplica um campo elétrico a um material piezoelétrico, que se deforma mecanicamente.

Com esta descoberta, nova onda de trabalhos de pesquisa se iniciou, tendo como tema central o conhecimento e o uso da eletricidade como meio para atingir o osso por processos terapêuticos. Desde então, a eletricidade e a necessidade de reparo ósseo têm sido associados (DUARTE ; XAVIER, 1983).

Duarte (1983) preconizou o uso de parâmetros adequados de ultra-som para acelerar a consolidação de fraturas com retardo de consolidação e pseudartroses. Segundo este método, as cargas elétricas necessárias ao reparo ósseo são produzidas no osso por meio do efeito piezoelétrico, pois o ultra-som pulsado atinge o tecido ósseo por uma sucessão de impulsos, cada um deles resultando em um sinal elétrico como resposta do osso. Daí por diante, o processo de crescimento do osso é regulado pelo campo elétrico assim formado e o metabolismo ósseo é estimulado eletricamente.

Um fato interessante a respeito do método ultra-sônico é sua semelhança com o processo natural, pois sendo o osso piezoelétrico ele está sujeito a cargas mecânicas como o próprio peso da pessoa, a deambulação, a corrida, ou até mesmo o repouso, quando a balística cardíaca produz uma onda de choque cujo impulso atinge o osso; para todos estes estímulos o osso tem resposta elétrica, que, por sua vez, aciona a divisão celular, mantendo o equilíbrio entre remodelamento e reabsorção. Quando existe uma lesão, há então necessidade de ação no local em desequilíbrio com o resto do esqueleto não traumatizado. No sítio da lesão, há a necessidade urgente de um grande número de células que possa se diferenciar e produzir as matrizes mineral e orgânica, que organizadamente reconstituem a descontinuidade produzida pela lesão. Logo, quando o sítio da fratura encontra-se com insuficiência de vascularização, ou com insuficiência de potencial elétrico, ou com as duas, leva-se à consideração de que, se houver movimento no foco da

lesão, deverá ocorrer aumento do potencial elétrico via efeito piezoelétrico, bem como a nova situação dinâmica possibilitará um fluxo sanguíneo maior. Nestas circunstâncias, o único movimento que pode ser produzido sem dor é aquele a nível molecular, de pequeníssima amplitude, porém atuante numa frequência muito alta. Sendo esta a idéia básica, a energia ultra-sônica aplicada ao local se identifica plenamente com a necessidade orgânica de promover potencial elétrico para disparar o mecanismo de reparo e acelerá-lo, restaurar o fluxo sanguíneo, permitindo assim a continuidade da vida celular e possibilitando seu desempenho. Logo, a presença de cargas elétricas no osso é vital, não só para seu desenvolvimento, mas principalmente para o reparo em caso de fratura (DUARTE; XAVIER, 1983).

Em seu estudo pioneiro, Duarte (1983) demonstrou a aceleração do processo de reparo ósseo normal em fraturas de fíbulas e córtex de fêmures de coelhos. O tempo de tratamento variou de 4 a 18 dias. Foram realizadas avaliações qualitativas (radiológica e histológica) e quantitativas (medida da área do calo). Foi demonstrado que o ultra-som induz alterações no osso osteotomizado rapidamente, nos primeiros 10 a 12 dias de estimulação, estabilizando após este período. Na análise histológica observou-se que, enquanto nos cortes histológicos dos ossos não tratados haviam áreas de necrose, nos ossos tratados haviam osteoblastos, indicando reparo tecidual. Nos radiogramas foi possível observar claramente a formação de calo ósseo mais rapidamente nos membros tratados quando comparados aos controles. A área de calo ósseo, medida em  $\text{mm}^2$ , foi também maior nas fraturas estimuladas com ultra-som. Logo se concluiu que, com parâmetros adequados, a energia ultra-sônica pode acelerar a cura de uma fratura.

Logo em seguida foi realizada uma investigação clínica, em que o uso da estimulação ultra-sônica do calo ósseo foi avaliado em 27 pacientes portadores de pseudartrose e/ou retardo de consolidação de fraturas. O índice de cura obtido foi de 70% nas pseudartroses do tipo hipertrófico. Nestes casos, houve nítida neoformação óssea, com aumento e reforço do calo periostal, acompanhado do fechamento progressivo da falha óssea (DUARTE; XAVIER, 1983).

O tratamento com ultra-som pode induzir mudanças fisiológicas que aumentam o reparo tecidual após lesão, e pode também diminuir a dor, quando este é aplicado de acordo com a lesão que está sendo tratada (DYSON, 1987).

Um estudo clínico multi-institucional verificou o efeito do ultra-som pulsado de baixa intensidade na cura de fraturas corticais de tíbia de 66 pacientes como um complemento ao tratamento ortopédico convencional. Os grupos placebo e tratado levavam para casa equipamentos de ultra-som idênticos (sinais visuais, táteis e auditivos) com exceção do sinal de ultra-som, que era só emitido no grupo tratado. O tratamento se iniciava 7 dias após a fratura e consistia em uma aplicação diária de 20 minutos por 20 semanas ou até que o avaliador considerasse a fratura curada. O ultra-som tinha as seguintes características: 1,5 MHz de frequência com pulsos de frequência de repetição de 1 kHz, largura de pulso de 200  $\mu$ s e intensidade SATA de 30 mW/cm<sup>2</sup>. Os resultados foram verificados através de radiogramas interpretados por um radiologista independente. Foram utilizadas classificações para a formação de pontes corticais e para a cura endosteal (observada pela linha de fratura). Ao final do tratamento houve uma diminuição estatisticamente significativa ( $p < 0.01$ ) no tempo total de cura clínica (em média 86 dias no grupo de tratamento ativo comparados com 114 dias no grupo controle) e também uma diminuição significativa no tempo de cura total (clínica e radiológica) no grupo tratado



( $p < 0.0001$ ). Cento e vinte dias após a fratura, 88% das fraturas do grupo tratado estavam curadas, comparadas com 44% do grupo placebo (HECKMAN *et al.*, 1994).

A pedido da FDA (*Food and Drug Administration*) americana, os pacientes citados no estudo acima receberam acompanhamento de 2 a 4 anos após o tratamento para verificar se as fraturas de ambos os grupos (controle e tratado) continuavam curadas por pelo menos dois anos após a lesão. Foram contatados 55 pacientes e todas as fraturas estavam curadas (HECKMAN *et al.*, 1994).

Um estudo clínico multicêntrico, prospectivo, randomizado e duplo-cego com controle placebo foi conduzido por Kristiansen e colaboradores (1997) para testar a eficácia do ultra-som pulsado, atérmico e de baixa intensidade na redução do tempo de cura radiológica de fraturas de rádio que foram tratadas com manipulação e gesso. Trinta pacientes receberam o tratamento que se iniciou sete dias após a fratura, e foi realizado por 20 minutos diários por 10 semanas. Outros trinta pacientes receberam tratamento placebo. O tempo de reparo foi significativamente menor ( $p < 0.0001$ ) no grupo tratado:  $61 \pm 3$  dias comparado com  $98 \pm 5$  dias no grupo placebo. Foi também constatada uma menor perda de redução no grupo que foi efetivamente tratado com ultra-som.

É interessante notar que ambos estudos de Kristiansen e colaboradores (1997) e Heckman e colaboradores (1994) obtiveram uma redução no tempo de reparo das fraturas muito semelhante com a utilização da estimulação ultra-sônica. Ambas foram em torno de 40% quando comparados aos grupos não tratados.

Um estudo *in vitro* foi realizado para elucidar a resposta específica do tecido ósseo ao tratamento ultrasônico. Sun e colaboradores (1999) utilizaram fêmures de 36 ratos da raça Wistar, que foram perfurados no centro de cada metáfise distal. Os fêmures foram mantidos em cultura de tecido *in vitro* por 7 ou 14 dias recebendo 15

minutos de estimulação ultra-sônica de intensidade de 320 ou 770 mW/cm<sup>2</sup> ou tratamento placebo. Através de histomorfometria óssea demonstrou-se que a estimulação ultra-sônica pode acelerar a regeneração trabecular óssea. Todos os “defeitos” femorais experimentais tratados tiveram cura mais rapidamente, mas a intensidade de 770 mW/ cm<sup>2</sup> alcançou um nível significativamente maior que a alcançada pela intensidade de 320 mW/ cm<sup>2</sup>. Com a análise da síntese e secreção de prostaglandina E<sub>2</sub>, pôde-se constatar sua significativa diminuição no grupo estimulado. Logo, estes autores afirmam que a aceleração do reparo ósseo pela estimulação ultra-sônica foi ao menos parcialmente devido à diminuição da síntese e secreção de prostaglandina E<sub>2</sub>.

Mayr e colaboradores (2000) afirmam que o ultra-som pulsado de baixa intensidade pode ser um método de tratamento não-cirúrgico muito promissor para alterações de reparo tecidual.

Duarte e Xavier (1983), Mayr e colaboradores (2000), Frankel e colaboradores (2000) e Kristiansen e colaboradores (1997), entre outros autores, preconizam a aceleração da união de fraturas através do uso do ultra-som pulsado de baixa intensidade.

Takikawa e colaboradores (2001) criaram um modelo experimental de não-união de fratura de tíbia de ratos, reproduzindo com precisão os eventos biológicos em humanos que levam à não-união. O ultra-som pulsado de baixa intensidade foi utilizado com sucesso para acelerar o processo de reparo ósseo nesses modelos. Após seis semanas de tratamento diário (20 minutos por dia), 50% das fraturas tratadas foram consolidadas, enquanto nenhuma fratura do grupo controle obteve cura. O sítio da fratura das tíbias não tratadas apresentava tecido fibroso e tecido de granulação. No entanto, 4 semanas após o início do tratamento com ultra-som, o

sítio da lesão do grupo tratado passou a apresentar evidências de formação óssea intramembranosa e endocondral. Havia condrócitos, mas a linha de fratura ainda era visível. Após seis semanas do início do tratamento a linha de fratura não podia mais ser identificada, indicando sucesso no tratamento.

O mecanismo específico pelo qual o ultra-som pulsado de baixa intensidade acelera o reparo ósseo continua assunto de especulação científica; no entanto, em termos de mecanismos físicos, o ultra-som pode exercer uma força mecânica nas células de tecidos moles no local da fratura (TAKIKAWA *et al.*, 2001). Duarte (1983) sugeriu a investigação do efeito piezoelétrico com o objetivo de esclarecer se este efeito em ossos *in vivo* é apenas devido ao material como transdutor ou se as células também se comportam como um transdutor num fenômeno cooperativo.

Existem evidências que campos elétricos variáveis, com frequência semelhante àquela do ultra-som utilizado em estimulação de crescimento ósseo, produzem aumento na incorporação de cálcio iônico intracelular em culturas de células ósseas, através da ativação de canais de transporte de cálcio do tipo L (sensíveis à variação de tensão elétrica) presentes na membrana plasmática (SILVA *et al.*, 1993). Mais tarde, foi determinado que os canais de transporte de cálcio do tipo L são mecano-sensíveis, ou seja, respondem a estímulos mecânicos (DUNCAN; HRUSKA, 1994; CHEN *et al.*, 2000).

### **2.3 O Laser**

Laser é um acrônimo para *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation* (amplificação de luz por emissão estimulada de radiação), que tornou-se parte de nossa linguagem e dia-a-dia num período relativamente curto de tempo. As

aplicações dos lasers estão em quase todos os campos de conhecimento humano, desde medicina, ciência e tecnologia a negócios e entretenimento (BAXTER *et al.*, 1997).

O laser foi citado por Mester e colaboradores (1985) como sendo uma das descobertas mais significativas do século XX no campo de ciência médica. Isto envolve novas perspectivas nas áreas de pesquisa biológica e aplicação na prática médica.

A introdução da tecnologia laser na prática médica iniciou-se com o uso da interação fototérmica e cortante do laser com tecidos à partir de altas potências e densidades de energia em cirurgias. Além disso, os efeitos biológicos dos lasers de baixa potência e densidade de energia eram inicialmente obscuros; na verdade, as unidades de baixa potência de He-Ne eram consideradas como não produtoras de efeitos biológicos e eram (e ainda são), apenas, incorporadas em lasers de alta potência para alinhamento do feixe principal.

Dado que alguns dos lasers de alta potência só poderiam produzir radiação laser em pulsos muito curtos, a natureza potencial altamente destrutiva de sua interação com tecidos biológicos e o fato destes equipamentos freqüentemente operarem em partes invisíveis do espectro, o uso de um laser He-Ne vermelho visível, atérmico, operando na faixa dos miliwatts parecia uma solução ideal para o problema de mirar o laser principal. Foi à partir de então que vários grupos começaram seus estudos nos possíveis efeitos biológicos e clínicos do laser de baixa potência, incluindo notavelmente o professor Endre Mester em Budapeste (BAXTER *et al.*, 1997).

Mester iniciou uma série de estudos em células isoladas e em animais experimentais durante a década de 70 na qual ele tentou demonstrar o que

considerava ser os potenciais efeitos carcinogênicos do laser He-Ne de baixa potência e o laser argônio. Em um dos experimentos, Mester utilizou laser He-Ne para irradiar carcinomas experimentais em ratos, esperando encontrar uma aceleração no crescimento de carcinomas como resultado da irradiação. Para sua surpresa, os carcinomas experimentais não foram afetados pela irradiação He-Ne. No entanto, e surpreendentemente, os animais irradiados (que haviam sofrido tricotomia para os propósitos do experimento) tiveram um crescimento de pêlos mais rápido que os animais do grupo controle.

Em seguida, Mester e sua equipe realizaram uma série de experimentos com animais e todos mostraram um efeito estimulante na velocidade de reparo tecidual em várias feridas induzidas experimentalmente como um resultado da irradiação laser He-Ne de baixa potência. Baseado no sucesso deste trabalho experimental, este mesmo grupo de pesquisadores começou a realizar estudos clínicos com pequenos números de pacientes portadores de feridas crônicas de várias etiologias que não responderam a outros tratamentos. Resultados similarmente encorajadores foram encontrados nestes pacientes, que forneceram a primeira evidência direta do potencial fotobioestimulante da terapia laser de baixa energia em humanos *in vivo*.

À partir deste trabalho pioneiro, uma diversidade de projetos de pesquisa se iniciaram durante a década de 80, principalmente na Europa Oriental, China e na antiga União Soviética. Os achados geralmente positivos desta pesquisa resultaram na popularidade do laser como modalidade terapêutica nos países citados, o que se refletiu na proporção relativamente grande das publicações que se originaram nestes países (BAXTER *et al.*, 1997).

O uso e aplicações da terapia laser de baixa intensidade cresceu consideravelmente nos anos seguintes em grupos clínicos que incluíam

fisioterapeutas e dentistas. Porém, enquanto o laser terapêutico atualmente tem certo grau de aceitação na Europa e na Ásia, a FDA americana ainda precisa aprovar seu uso para várias aplicações, incluindo osso. Mas como as pesquisas continuam e os benefícios potenciais da terapia laser de baixa intensidade (LILT – *Low Intensity Laser Therapy*) se tornaram mais claras, pode ser razoável esperar que não demore muito para esta modalidade ter similar popularidade na América (BAXTER *et al.*, 1997). Em 2002 a FDA aprovou o uso do laser para uso adjunto no alívio temporário de dor crônica no pescoço, dor no ombro de origem musculoesquelética e dor na mão e punho associada à síndrome do túnel do carpo (LASER WORLD, 2002).

A LILT tem sido usada no tratamento de muitas condições com relatos de múltiplos efeitos clínicos incluindo promoção da cura de lesão de tecidos mole e ósseo. No entanto, esta continua controversa como modalidade terapêutica. Os efeitos do comprimento de onda, tipo de feixe, nível e intensidade de energia e regime de exposição do laser terapêutico continuam não explicados. Além disso, não existem determinações específicas de dosimetria e mecanismo de ação para diferentes tipos celulares (COOMBE *et al.*, 2001).

Mester e colaboradores (1985) concluíram que o efeito estimulante dos lasers na cicatrização de feridas é relacionado com o aumento na formação de prostaglandinas, e que este aumento nos níveis de várias prostaglandinas contribuíam para a aceleração de um processo parcial do reparo tecidual – a fase inflamatória.

A LILT (*Low Intensity Laser Therapy*) tem sido utilizada com sucesso em diversas áreas, incluindo fisioterapia, medicina veterinária, odontologia e como uma alternativa às agulhas metálicas em acupuntura (BAXTER *et al.*, 1997).

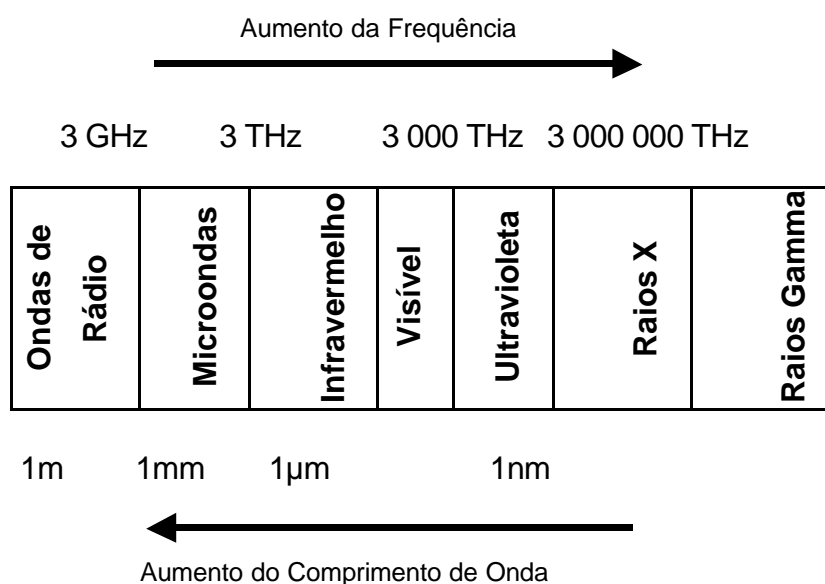
De acordo com Karu e colaboradores (1995), a irradiação com laser He-Ne aumenta os níveis de ATP em células cultivadas *in vitro*. Uma camada de células tumorais humanas foi irradiada com laser He-Ne (632,8 nm, 10 W/ m<sup>2</sup>, 100 J/m<sup>2</sup>, 10 s) e a quantidade de adenosina trifosfato (ATP) foi medida por uma técnica bioluminescente luciferina-luciferinase em diferentes momentos (5-45 min) após a irradiação. A habilidade da luz vermelha monocromática de induzir um aumento nos níveis de ATP celular foi descoberta como sendo dependente da fase de crescimento da cultura. Com os resultados experimentais desta investigação, concluiu-se que a síntese de ATP em células irradiadas pode continuar em altas taxas após o término do tratamento.

Observações da estrutura fibrilar pela microscopia eletrônica de varredura evidenciou melhoria da organização tecidual e maior número de células para a síntese de material extracelular produzido pela fotoestimulação com laser He-Ne após tenectomia de ratos. Análises por microscopia de força atômica mostraram que o laser estimulou a formação de colágeno precocemente, com melhor empacotamento e organização ao longo do eixo maior do tendão (PARIZOTTO, 1998).

### **2.3.1 A Física do Laser**

A maioria dos equipamentos terapêuticos atualmente disponíveis produzem infra-vermelho ao invés da radiação visível. O espectro eletromagnético inclui, além do infra-vermelho e do ultra-violeta, raios X e Gamma, microondas, luz visível e ondas de rádio. Estes diferentes tipos de radiação têm em comum a existência de campos elétricos e magnéticos alternados que flutuam em sincronia e

perpendicularmente na direção da propagação. A intensidade do campo elétrico aumenta até um valor máximo positivo, depois diminui passando pelo zero até um máximo negativo, antes de subir novamente ao zero e completar outro ciclo. Esta flutuação sinusoidal no campo elétrico é espelhada (em ângulos retos) por uma variação idêntica no campo magnético. É esta combinação da flutuação de campos elétrico e magnético que dá a esta radiação o nome 'eletromagnético'. Similarmente, o comprimento de onda também caracteriza a radiação eletromagnética, a medida que altas freqüências são sinônimos de ondas mais curtas e vice-versa.



**FIGURA 3 – O espectro eletromagnético.**

**FONTE:** BAXTER, G.D. (1997). *Therapeutic lasers: theory and practice*. United States of America: Ed. Churchill Livingstone.

Os comprimentos de onda na porção do espectro em que o laser terapêutico opera são muito pequenos, e geralmente abrangem de 600 a 1000 nm (1 nm = 1 / 1 000 000 000 m), incluindo ambas radiações visível (vermelha) na porção mais baixa da faixa visível e radiações invisíveis (perto do infra-vermelho) (BAXTER *et al.*, 1997).



A irradiação laser difere da luz comum por ser *monocromática* e altamente *direcional* e *coerente*.

*Monocromaticidade* se refere a um mesmo comprimento de onda eletromagnética com pouca dispersão deste valor.

Fontes de luz não-laser tipicamente irradiam de maneira uniforme para todas as direções. No entanto, o feixe de luz do laser é altamente colimado. *Colimação* simplesmente se refere ao grau de divergência do feixe de luz emitido; conseqüentemente descrever o laser como altamente colimado significa que a luz emitida é altamente paralela. O significado clínico da colimação é que o feixe de luz mantém um pequeno foco numa distância relativamente grande.

A *coerência* se refere à sincronização da radiação produzida pelo laser, isto é, as ondas eletromagnéticas, ao saírem do dispositivo estão em fase temporal e espacial (BAXTER *et al.*, 1997).

### **2.3.2 O Laser de Baixa Intensidade no Reparo Ósseo**

Os efeitos da radiação eletromagnética, como o laser de baixa intensidade, no crescimento e reparo ósseo, têm sido investigados de maneira limitada, segundo Barushka e colaboradores (1995). O laser é freqüentemente estudado na cicatrização muscular, nervosa e dérmica.

O laser de baixa intensidade pode promover: maiores velocidades de cicatrização e reparo, aceleração da neovascularização, oclusão de feridas, maior formação do tecido de granulação, maior número de fibroblastos, maior número de fibras colágenas, aumento na síntese de ATP, liberação de histamina pré-formada, redução do pH intracelular e alterações na proliferação e motilidade celular,

fagocitose, resposta imune e respiração (KITCHEN; PARTRIDGE, 1991; VEÇOSO, 1993).

Marino (2003) investigou o efeito da LILT no reparo ósseo em tibia de rato e cita a existência de uma suposta ação modulatória sobre o processo inflamatório atribuída à LILT. Possíveis ações como reabsorção mais rápida de exudatos, controle de emergência de fatores quimiotáticos, aumento da atividade fagocitária e/ou aumento de vascularização, certamente contribuíram para uma osteossíntese inicialmente mais ativa, ao propiciarem a instalação de condições ambientais favoráveis.

A radiação laser de baixa potência tem apresentado efeitos positivos na cura de fraturas ósseas em animais, baseado em medidas morfogênicas, bioquímicas, radiográficas e ao microscópio eletrônico (LUGER *et al.*, 1998).

Trelles e Mayayo (1987) sugeriram que o laser de baixa potência pode modular a função de osteócitos, promovendo aceleração do metabolismo e reação mais rápida do calo ósseo. Em seu experimento, fraturas de tibia de 30 ratos foram tratadas com laser He-Ne (632 nm, 4mW, 2,4 J), por 10 min (a 20 cm de distância do foco), em dias alternados num total de 12 sessões, com início no pós-operatório imediato. Tratamento simulado foi dado a 30 animais controles. Ao microscópio óptico, foram observados, no grupo tratado, um aumento importante na vascularização e formação mais rápida de tecido ósseo com uma densa rede trabecular comparada ao grupo controle, que apresentou apenas tecido cartilaginoso e pobre vascularização, correspondendo assim a um estágio mais precoce do reparo ósseo.

Em uma investigação feita com ratos, a carga máxima suportada e a rigidez estrutural do calo da tibia fraturada foram significativamente mais elevadas no grupo

que recebeu tratamento com radiação laser. Outro achado interessante foi que 21% das fraturas não tratadas evoluíram para não-união, fato que não ocorreu em nenhuma fratura do grupo tratado, sugerindo, então, um outro aspecto positivo do laser no processo de reparo ósseo. Os animais foram divididos em 2 grupos de 25 e sofreram fratura transversa total no terço médio da tíbia, acompanhada de fixação interna com fio de Kirschner intramedular. O grupo 1 foi tratado com LLLT (*Low Level Laser Therapy*) (He-Ne, contínuo, 632,8 nm, 35mW) imediatamente após a cirurgia a uma distância de 20 cm por 30 min diários (10 min na área fraturada, 10 min na área imediatamente superior e mais 10 na inferior) por 14 dias consecutivos. O grupo 2 serviu de controle. A escolha do sacrifício 4 semanas após as cirurgias foi baseada nos resultados do projeto piloto. Os calos ósseos foram testados com distração com 2, 4 e 6 semanas. Com 2 semanas, os calos estavam muito imaturos. Com 4 semanas a resistência do calo era próxima à da fratura completamente curada, e em 6 semanas as fraturas estavam totalmente curadas (LUGER *et al.*, 1998).

A aplicação diária de laser terapêutico por mais de sete dias produziu melhora na neoformação trabecular num estudo feito com fratura de tíbia de ratos. Os osteoblastos ficaram dispostos lado a lado, de maneira que pareciam um epitélio simples na periferia da trabécula óssea. Esta disposição é característica de osteoblastos ativamente engajados na síntese de matriz óssea. A terapia laser não só diminuiu o tempo de reparo como também produziu uma maior área de reparo ósseo. Como foi utilizado o laser de baixa potência (1mW), os resultados deste estudo demonstram que processos foto-biológicos não relacionados a efeitos térmicos provavelmente constituem os mecanismos básicos envolvidos na recuperação do tecido lesado (FREITAS *et al.*, 2000).

Em um estudo feito com fraturas circulares de tíbia em 292 ratos, Barushka e colaboradores (1995) demonstraram que a radiação laser de baixa intensidade pode alterar a atividade e o número de osteoblastos e osteoclastos, como refletido na alteração da atividade de fosfatase alcalina e fosfatase ácida tartrato-resistente, e promove o reparo ósseo no local da lesão em modelos *in vivo*. O laser (HeNe, 632 nm, 6,0 mW de potência, diâmetro do feixe de 1,9 mm, e dose de 31 J/cm<sup>2</sup>) foi utilizado no 5<sup>o</sup> e 6<sup>o</sup> dias pós-osteotomia por 2,3 minutos. Este protocolo foi escolhido após uma série de experimentos preliminares. Nestes experimentos foi observado que se o local lesado fosse irradiado 1-3 dias pós-lesão, a extensão da intensificação do reparo ósseo era menor que aquele do protocolo acima citado. Análises histomorfométricas revelaram um acúmulo mais rápido de tecido ósseo de reparo no local irradiado, tendo aproximadamente dobrado a velocidade de reparo.

Freitas e colaboradores (2000) estudaram os efeitos do laser HeNe na osteogênese de fraturas cirúrgicas em ratos. A fratura foi feita com broca dentária, tendo apenas 2 mm de diâmetro em apenas uma superfície cortical da tíbia. Vinte e quatro horas após a cirurgia começou o tratamento com laser He-Ne 633 nm de 1 mW de potência. Foram utilizadas doses de 3,15, 31,5 e de 94,7 J/cm<sup>2</sup> para três grupos de animais e o tempo de exposição à radiação era de 30 s, 5 min ou 15 min respectivamente. As tíbias contra-laterais eram usadas como controle. Após o sacrifício dos animais no oitavo ou no décimo quinto dia de tratamento, foram realizadas análises histológicas através de microscopia óptica e organização estrutural tridimensional por microscopia eletrônica de varredura. A aceleração no processo de formação óssea foi claramente observada nos animais tratados com doses de 31,5 e 94,7 J/cm<sup>2</sup>, sendo maior com a dose de 94,7 J/cm<sup>2</sup>. No entanto, os tratamentos com doses de 3,15 J/cm<sup>2</sup> não apresentaram diferenças aparentes dos

resultados dos controles. A eficácia do tratamento com laser demonstrou-se dose dependente. No oitavo ou no décimo quinto dia, a dose de 3,15 J/cm<sup>2</sup> não foi diferente em relação aos controles. No entanto, doses de 31,5 e 94,7 J/cm<sup>2</sup> causaram consolidação óssea progressiva e mais rápida, quando comparadas aos controles. Os resultados deste estudo demonstraram que o uso sucessivo diário de laser HeNe com doses de 31,5 e 94,7 J/cm<sup>2</sup> (após períodos de 7 e 14 dias de irradiação) asseguraram melhor restauração em áreas ósseas lesadas, sendo a dose de 94,7 J/cm<sup>2</sup> mais efetiva.

A terapia laser de baixa potência parece acentuar o reparo de defeitos ósseos. Os efeitos do laser de baixa potência em outras áreas ortopédicas como a osteointegração de dispositivo ósseo protético implantado ainda não são claros. Em um estudo com 12 coelhos, pinos cilíndricos de hidroxiapatita foram parafusados distalmente em ambos os fêmures de cada animal. À partir do primeiro dia pós-operatório e por 5 dias consecutivos, o fêmur esquerdo dos animais receberam tratamento laser As-Ga-Al (780nm) de baixa potência com os seguintes parâmetros: 300 J/ cm<sup>2</sup>, 1 W, 300 Hz, pulsado por 10 minutos. O fêmur direito recebia tratamento placebo. Quatro ou 8 semanas após a colocação do implante, análises histológicas e histomorfométricas avaliaram o contato osso-biomaterial. A histomorfometria mostrou um maior grau de osteointegração na interface osso-hidroxiapatita no grupo tratado por 4 (p<0.0005) e 8 semanas (p<0.001). Estes resultados positivos preliminares parecem sustentar a hipótese que a LILT pode ser considerada uma boa ferramenta para acentuar a interface osso-implante na cirurgia ortopédica (GUZZARDELLA *et al.*, 2001).

Silva Júnior e colaboradores (2002) realizaram a avaliação computadorizada morfométrica de defeitos ósseos (de 1 cm<sup>2</sup>) criados no terço médio de fêmures de

ratos tratados com LLLT. Quarenta animais foram divididos em 4 grupos de 10: grupo A (12 sessões, 4,8 J/ cm<sup>2</sup> por sessão, tempo de observação de 28 dias); grupo C (3 sessões, 4,8 J/ cm<sup>2</sup> por sessão, tempo de observação de 7 dias). Os grupos B e D serviram, respectivamente, como controles não irradiados. Quarenta e oito horas após a cirurgia os grupos A e C começaram a ser tratados com laser diodo de onda contínua (40 mW, 830 nm) três vezes por semana, resultando num total de 12 aplicações (57,6 J/ cm<sup>2</sup>) no grupo A e 3 aplicações ( 14,4 J/ cm<sup>2</sup>) no grupo C. A morfometria computadorizada demonstrou uma diferença significativa entre as áreas de osso mineralizado dos grupos C e D (p= 0.017). Não houveram diferenças entre os grupos A e B (p= 0.383) que foram sacrificados 28 dias após a cirurgia. Concluiu-se, então, que sob estas condições experimentais, a LLLT aumentou o reparo ósseo em estágios precoces deste processo.

Um estudo que avaliou os efeitos da LLLT em células osteoblásticas humanas utilizou doses diárias de laser GaAIs (830 nm, 90 mW, densidades de energia de 1,7 a 25,1 J/cm<sup>2</sup>) por até 10 dias. A viabilidade celular não foi afetada pela radiação laser, sendo esta maior que 90% em todos os grupos experimentais. A proliferação ou ativação celular não foi significativamente afetada por quaisquer níveis de energia ou regimes de exposição investigados. A investigação da concentração do cálcio intracelular revelou uma tendência de mudança transitória positiva após irradiação. O aumento do cálcio intracelular indicou que células osteoblásticas respondem à LLLT (COOMBE, 2001).

## 2.4 Similaridades entre as Diferentes Modalidades Terapêuticas

Considerações sobre a dosimetria das modalidades ultra-som (US) e campos eletromagnéticos (EMF) sugerem um possível mecanismo unificador para os efeitos dos sinais dos EMF, US e potenciais gerados à partir de deformação (SGP - *strain-generating potentials*), baseados no campo elétrico variável ao longo do tempo,  $E(t)$ , associados com cada tipo de estímulo. O campo  $E(t)$  é diretamente induzido com fontes eletromagnéticas e indiretamente induzido via potenciais de fluxo associados ao movimento mecânico dos fluidos iônicos e efeito piezoelétrico. Os campos  $E(t)$  induzidos elétrica ou mecanicamente têm características comuns de forma de onda no local de tratamento e, assim, podem liberar doses similares de estimulação elétrica.

Pilla (2002), então, propõe que o campo elétrico endógeno variável com o tempo,  $E(t)$ , de uma mudança variável com o tempo no meio mecânico do osso em reparo ou remodelamento, pode agir como um estímulo de crescimento dose-dependente. Assim, o primeiro mensageiro afetando a atividade celular é o campo  $E(t)$ , sugerindo que o reparo ou remodelamento ósseo possa ser modulado utilizando-se sinais mecânicos (incluindo o US) ou eletromagnéticos.

Sinais de ambos campos eletromagnético e ultra-som têm efeito clinicamente significativo no reparo ósseo. Ambas modalidades são agora uma parte comum do arsenal do ortopedista para o tratamento de retardo de consolidação, não-união óssea e fraturas recentes (PILLA, 2002).

## 2.5 Histomorfometria Óssea

A histologia óssea é o estudo do osso por microscopia que fornece informação qualitativa, incluindo a estrutura geral e a distribuição dos componentes ósseos.

A histomorfometria óssea inclui a medida de componentes morfológicos, como a espessura do osteóide e da trabécula óssea. Estas são variáveis estáticas que são medidas diretamente. A histomorfometria também pode estimar variáveis cinéticas através do uso de marcadores fluorescentes, administrados em diferentes intervalos de tempo, que se integram ao osso em formação. A distância entre as marcações fornece informações sobre a taxa de formação óssea e, por derivação, sobre outros processos metabólicos também (ERIKSEN, *et al.* 1994).

A histomorfometria óssea ainda é o único método que dá acesso a uma análise direta e precisa dos mecanismos celulares e teciduais do remodelamento ósseo envolvidos na patofisiologia da osteoporose e nos efeitos de drogas osteotrópicas. Este método torna possível medidas no nível intermediário da organização do osso, isto é, o osteon no osso cortical e a unidade estrutural trabecular básica (BSU) no osso esponjoso, que são os produtos finais da atividade osteoblástica, e também fornece informação dinâmica através do procedimento com marcação dupla de tetraciclina, que permite a introdução da dimensão de tempo nas análises quantitativas (MEUNIER, 1995). A tetraciclina se deposita com grande afinidade sobre a matriz óssea recém-formada. Este antibiótico é fluorescente e isto possibilita a avaliação da velocidade de formação óssea, um parâmetro importante para o estudo do crescimento ósseo e para o diagnóstico de certas doenças ósseas. O método consiste em duas injeções de tetraciclina separadas por um intervalo de,



em média, cinco dias. Em seguida é feita uma biópsia óssea e os cortes são examinados no microscópio de fluorescência. A distância entre as duas faixas fluorescentes é proporcional à velocidade de aposição óssea (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

Nas últimas três décadas a histomorfometria óssea tem progredido muito e atualmente é utilizada de maneira marcante na avaliação e acompanhamento da osteoporose (MEUNIER, 1995).

Apesar do presente estudo não tratar da osteoporose, é interessante notar a quantidade e a qualidade das informações obtidas com a histomorfometria pois esta é capaz de fornecer, nos estados osteoporóticos:

- Diagnóstico de doença óssea;
- Avaliação dos mecanismos heterogêneos sublinhando a perda óssea das síndromes osteoporóticas, dado que esta doença é caracterizada por heterogeneidade anatômica e histopatogenética, com diferentes distúrbios no remodelamento ósseo em níveis orgânicos, teciduais e celulares;
- Avaliação dos efeitos de tratamentos no remodelamento ósseo;
- Avaliação da qualidade óssea. Este conceito inclui vários componentes – todos acessíveis à análise histomorfométrica: a microarquitetura óssea, particularmente da rede trabecular; a textura da matriz óssea, isto é, a presença de osso lamelar ou imaturo; a possível presença de defeitos de mineralização, ambos em superfícies ósseas ou intersticiais, que pode por em risco a resistência óssea e as outras propriedades biomecânicas dos ossos (MEUNIER, 1995).

A análise histomorfométrica é realizada com luz, luz polarizada, e microscopia fluorescente; sistemas de placa óptica; e equipamentos computadorizados digitais (ERIKSEN, *et al.* 1994).

## 2.6 Biomecânica do Osso e Ensaio de Flexão

Desde as observações de Galileo, tem sido assumido que a arquitetura inerente ao osso é influenciada pela tensão mecânica associado à sua função normal. Uma definição mais formal destas relações entre estrutura e função foi estabelecida no final do século XIX, o que desde então tem sido conhecida como a lei de Wolff. Os princípios da lei de Wolff são baseados no conceito de que há uma correlação entre os padrões de alinhamento trabecular e as direções das principais tensões estimados a ocorrer na função normal. Sob condições fisiológicas normais, a relação estrutura-função observada em osso, junto a seu papel de manutenção da homeostase mineral, sugere fortemente que este seja um material de *design* ótimo (EINHORN, 1996).

O tecido ósseo é *heterogêneo* pois sua composição é variável em cada região do material. Outra característica óssea importante é a *anisotropia*, isto é, suas propriedades mecânicas não são iguais em todas as direções de carregamento. O material ósseo é mais resistente na orientação longitudinal que nas direções radiais ou tangenciais. Isto se deve principalmente ao fato de que ósteons são orientados ao longo do eixo longitudinal do osso e eles são “grudados” ao material ósseo vizinho. Esta adesão óssea não é tão resistente quanto o próprio material ósseo. A orientação das direções anisotrópicas se relacionam com sua adaptação a cargas fisiológicas: este é o efeito da lei de Wolff no osso cortical (CORDEY, 2000).

O osso é um material *viscoelástico*, apresentando, então, características mecânicas de deformação viscosa e elástica. A *deformação elástica* ocorre quando há uma relação proporcional entre tensão e deformação; esta deformação não é permanente, pois quando a carga aplicada é retirada, o material retorna imediatamente à sua forma original. Por outro lado, a *deformação viscosa* é caracterizada por retardos, pois leva um certo tempo para iniciar após a aplicação da carga e também para cessar após a interrupção da mesma (CALLISTER; WILEY, 1994). O osso apresenta um comportamento elástico instantâneo seguido de comportamento viscoso logo em seguida, sendo por isso denominado *viscoelástico*.

Em materiais biológicos, o efeito interno da aplicação de uma carga ou força externa é uma mudança na forma do corpo associada à produção de forças internas. É, pois, necessário definir precisamente esses fenômenos físicos que ocorrem em sólidos sob cargas.

*Tensão* é definida como a força interna por unidade de área da secção transversal que uma parte de um corpo de um lado de um plano exerce na outra parte oposta do plano. Note que desta definição, tensão é intimamente associada com uma área ou plano. O conceito de tensão solicita um plano específico sobre o qual a tensão é distribuída.

Tensão não é uma carga; é o resultado de uma carga. Para um material resistir à qualquer tipo de carga, este deve desenvolver uma tensão interna. Há dois tipos de tensão: tensão normal e tensão de cisalhamento. Tensão normal é a força por unidade de área atuando perpendicularmente à área considerada. Já a tensão de cisalhamento é a força por unidade de área paralela à área considerada (FRANKEL; BURSTEIN, 1971).

*Deformação* é a mudança na configuração geométrica que um corpo sofre. Um método que causa deformação é a aplicação de forças externas. A deformação pode ser longitudinal, quando a mudança de comprimento de uma linha é considerada, ou de cisalhamento, quando ocorre uma deformação angular sofrida por um ângulo reto (FRANKEL; BURSTEIN, 1971).

Na natureza, a compressão, o cisalhamento e a tração podem se combinar como resultado de uma variedade de configurações de cargas complexas e levar a diferentes padrões de fratura. A flexão, por exemplo, resulta de uma combinação de forças de tração e compressão (tração no lado convexo; compressão no lado côncavo) e é uma das condições de carregamento que leva à fraturas clínicas (EINHORN, 1992).

A condição de tensão mais comum e complexa existente em ossos e fixadores internos é a flexão (FRANKEL; BURSTEIN, 1971).

*Flexão* é o efeito de uma força aplicada perpendicularmente ao eixo de uma viga. A *teoria da flexão linear* é importante para o cálculo da deformação ao longo do eixo da viga quando esta é submetida à flexão. O princípio básico desta teoria é que um plano perpendicular ao eixo da viga continua perpendicular a ele após a flexão. (CORDEY, 2000).

As tensões associadas às cargas de flexão são uma combinação de cisalhamento, compressão e tração. Para compreender a condição de tensão causada pela flexão, um corpo de prova de secção transversal uniforme pode ser considerado. Se uma condição de equilíbrio existe, é evidente que os resultados da reação interna da secção considerada devem ser iguais à tensão mecânica produzida pelo corpo. Esta reação interna é atingida pela distribuição da tensão consistindo de tração e compressão. Há uma distribuição de compressão e tração na

secção transversal do material submetido a um ensaio de 3 pontos, por exemplo, com compressão máxima ocorrendo na superfície mais externa do lado côncavo do corpo de prova e tração máxima na superfície convexa da amostra (FRANKEL; BURSTEIN, 1971).

A distribuição da tensão normal na flexão é linear, e varia de zero a um máximo no centro conforme as fibras do material externo são aproximadas. A tensão máxima sempre ocorre nas fibras da superfície (FRANKEL; BURSTEIN, 1971; TIMOSHENKO, 1978).

É possível calcular as tensões agindo em vários locais da secção transversal. A tensão em qualquer posição vertical é relacionada ao momento fletor,  $M$ , na secção, à distância do ponto de aplicação da carga até a linha neutra,  $Y$ , e ao momento de inércia da área,  $I_a$ .

O valor do *momento fletor*  $M$  em qualquer secção é o produto de uma força e uma distância. Isto significa que dado uma mesma força agindo num ponto do corpo, a tensão em qualquer secção distal à força varia com o comprimento, já que o momento fletor interno varia com o comprimento (FRANKEL; BURSTEIN, 1971).

No centro de uma viga simétrica há a *superfície neutra*, que não é deformada sob tração ou compressão quando a flexão é aplicada. Na secção transversal da viga, esta superfície neutra é o eixo ou *linha neutra* (CORDEY, 2000), que passa pelo centro de gravidade da secção transversal (TIMOSHENKO, 1978).

O *momento de inércia* é uma expressão da distribuição do material na área, e é dependente da forma da secção transversal (FRANKEL; BURSTEIN, 1971). Este também pode ser chamado de segundo momento de área, e é uma importante característica geométrica da secção transversal. Na flexão, o momento de inércia tem a mesma função da área de secção transversal na carga axial (CORDEY, 2000).

O *momento de inércia da área*  $I$  é o conceito mais importante ao considerar a resistência de uma amostra, pois é aquela propriedade da área de secção transversal que leva em consideração não somente a quantidade de área, mas também a disposição da área em relação ao eixo ou linha neutra, ou o eixo centróide (FRANKEL; BURSTEIN, 1971).

A tensão de flexão pode ser calculada através da fórmula: tensão igual ao momento fletor multiplicado pela distância do eixo ou linha neutra dividido pelo momento de inércia da área:

$$s = \frac{M.Y}{I_a}$$

Considerando  $Y$  na fibra mais externa, a tensão será máxima neste ponto. Geralmente a amostra fratura sob uma carga de flexão devido à ruptura da fibra mais externa, com subsequente ruptura das fibras adjacentes. Se uma secção transversal é simétrica em relação à linha neutra, a tensão máxima de compressão é igual à tensão máxima de tração. Se a secção transversal é assimétrica em relação à linha neutra, como por exemplo na tíbia (devido à forma anatômica e distribuição do material), a tensão compressiva máxima sob a carga de flexão pode ser diferente da tensão máxima de tração.

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1 Cirurgia e Tratamento

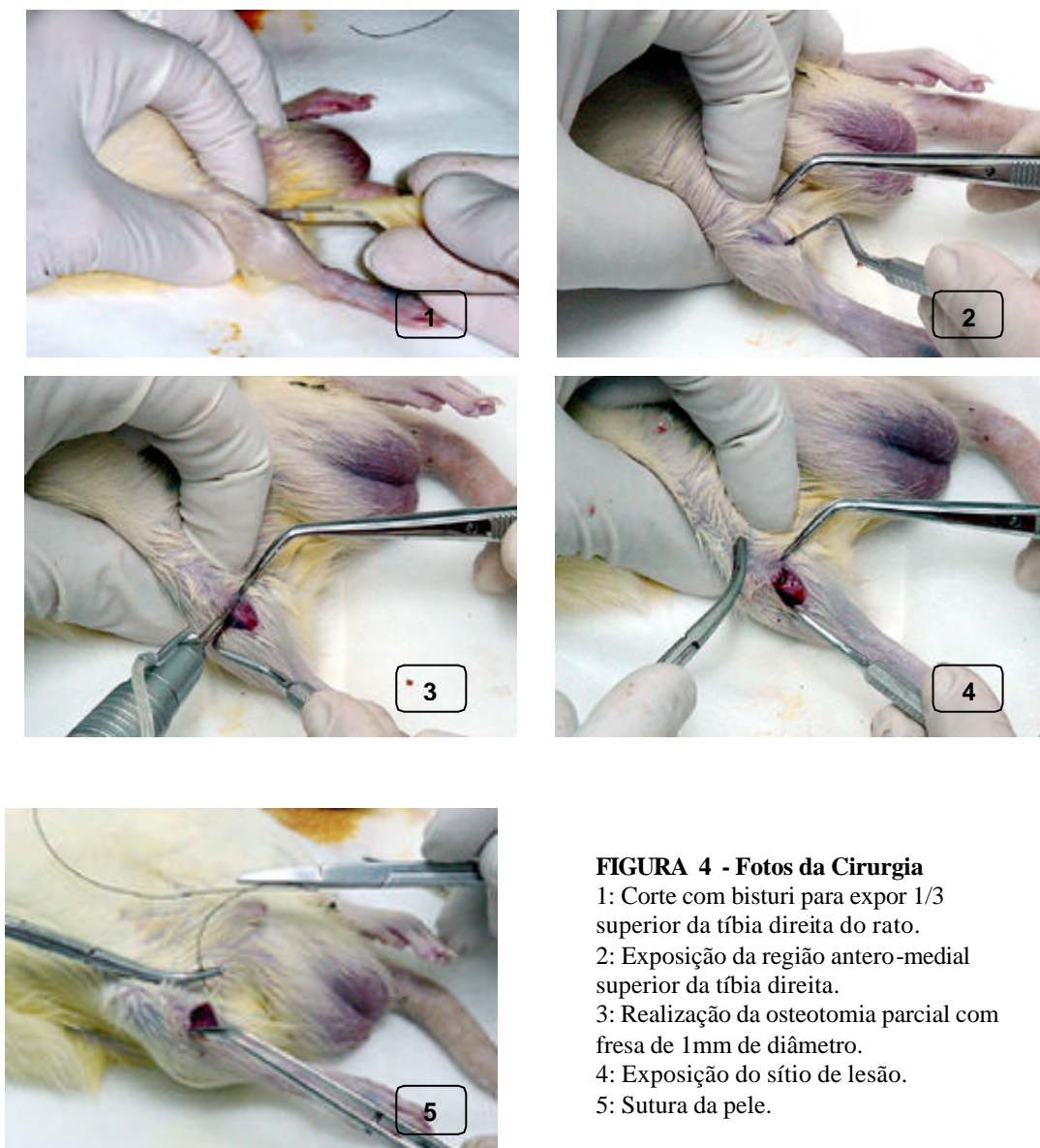
Neste estudo foram utilizados 48 animais *rattus norvegicus albinus* com fraturas cirúrgicas unilaterais parciais do terço superior da tíbia. Todas as cirurgias foram realizadas de acordo com as normas para a prática didático-científica da vivissecção de animais (lei 6638/ 08 de maio de 1979) e com os princípios éticos na experimentação animal (COBEA, 1991) sob condições padrão de assepsia e sob anestesia geral. Todos os animais foram alojados e alimentados adequadamente no Biotério do Laboratório de Bioengenharia da Escola de Engenharia de São Carlos, USP.

Os ratos pesavam em média 300g na data da cirurgia, com idade entre 12 e 15 semanas, sendo considerados adultos jovens.

Os animais foram sedados com 0,2 a 0,3 ml de Ketamin (anestésico) e a mesma dose de Ronpun (relaxante muscular). A superfície anterior da pata posterior direita do animal, logo abaixo do joelho, foi submetida à tricotomia pré-operatória seguida de assepsia da região com etanol a 70%. A pele então foi cortada no sentido longitudinal da tíbia direita logo abaixo do joelho do animal. Os músculos foram afastados com pinça para permitir o acesso à tíbia mas foram reaproximados logo após a realização da osteotomia.

As fraturas foram obtidas através de osteotomias parciais transversais com um aparelho de marca *Driller K®* modelo *BLM 600 plus*, com caneta de alta rotação com fresa de 1 mm de diâmetro, 690 rpm, irrigado com soro fisiológico para evitar queimadura do tecido ósseo. Aproximadamente 8 mm distal ao joelho foi feito um

corte transversal do platô tibial em direção medial de aproximadamente 5 mm de comprimento e profundidade de 1 mm, sendo a pele suturada após a realização da fratura.



Os animais foram divididos em três grupos de 16 animais. No grupo “ultra-som”, o membro fraturado foi tratado com ultra-som pulsado de baixa intensidade, denominado “*estimulador ultra-sônico de regeneração óssea*” montado no laboratório de eletrônica do Programa de Pós-graduação Bioengenharia da USP/



São Carlos com frequência fundamental 1,5 MHz, ciclo de trabalho 1:4, e intensidade SATA 30 mW/cm<sup>2</sup>, em 12 sessões de 20 minutos, à partir do terceiro dia pós-cirúrgico, 5 vezes por semana. No grupo “laser”, o membro fraturado foi tratado com laser terapêutico de baixa intensidade As-Ga-Al de marca *MM optics®*, modelo *Twin* laser infra-vermelho, com 780 nm de comprimento de onda, 4 mm<sup>2</sup> de área do feixe, 30 mW de potência e dose de 112,5 J/cm<sup>2</sup>, em 12 sessões de 2,5 minutos, à partir do terceiro dia pós-cirúrgico, 5 vezes por semana. O grupo 3 serviu de controle, sendo igualmente submetido à cirurgia mas não recebendo qualquer tratamento.



**FIGURA 5** – Tratamento com ultra-som da tíbia fraturada.



**FIGURA 6** – Tratamento com laser da tíbia fraturada.

A maioria dos estudos com ultra-som utiliza mais de 3 semanas de tratamento e os trabalhos com LLLT são baseados em poucos dias de tratamento. Logo, para

se chegar às 12 sessões utilizadas neste estudo alguns fatores foram considerados. Duarte (1983) demonstrou que o ultra-som induz alterações no osso osteotomizado nos primeiros 10 a 12 dias de estimulação, estabilizando após este período. Trelles e Mayayo (1987) obtiveram sucesso com 12 sessões de tratamento com LLLT e Luger e colaboradores (1998) preconizam entre 2 e 4 semanas pós-cirúrgicas para sacrifício, sugerindo que, nesta fase, o calo ósseo se encontre em fase ideal para análise. O número de sessões dos grupos tratados com laser e ultra-som foi o mesmo para permitir uma comparação pertinente entre ambos. Os parâmetros do equipamento de ultra-som foram os já aprovados pela FDA e os do laser foram próximos à ordem de grandeza da dose de energia do ultra-som. Também esta escolha da densidade de energia do laser foi baseada na ausência de resultados satisfatórios em vários estudos com LLLT que preconizam uma densidade de energia muito baixa; além disso, Freitas e colaboradores (2000) demonstraram que a dose de  $94,7 \text{ J/ cm}^2$  foi mais eficaz na aceleração de reparo ósseo quando comparada a doses menores.

Oito amostras de cada grupo foram destinadas à análise histomorfométrica e o restante (oito de cada grupo) ao ensaio mecânico.

Radiogramas foram obtidos logo após a cirurgia e no 19º dia (dia do sacrifício) com a finalidade de fornecer um acompanhamento da formação do calo ósseo.

Após o tratamento os ratos foram sacrificados através de sedação profunda com overdose de Ketamin e Ronpun (0,7 ml de cada) para extração das tíbias direitas para consequente obtenção de material para análise histomorfométrica ou ensaio mecânico de flexão.

A metodologia proposta foi submetida a um ensaio piloto em número reduzido de animais não incluídos nos grupos experimentais, de forma a efetuar correções que foram incorporadas na metodologia.

### **3.2 Análise Histomorfométrica**

Oito animais de cada grupo receberam injeção intraperitoneal do marcador ósseo oxitetraciclina Terramicina/ LA (solução injetável – 20g/100ml) (25 mgKg) nos dias 10 e 11, e 4 e 5 anteriores ao sacrifício para posterior avaliação da taxa de crescimento ósseo no local fraturado.

As amostras foram cortadas 1 cm antes e após a lesão óssea sendo, então, colocadas em etanol a 70% no mesmo dia (dia do sacrifício). Em seguida, foram submetidas ao protocolo para histologia de tecido ósseo calcificado do Laboratório de Fisiopatologia Renal da Faculdade de Medicina da USP/São Paulo para a obtenção de lâminas e posterior análise histomorfométrica, conforme descrito no anexo A.

Os índices histomorfométricos podem ser divididos em primários e secundários. Os índices primários são aqueles que podem ser medidos diretamente durante uma sessão histológica e incluem:

1. *Número de Células* - Enumeração de células como osteoblastos ou osteoclastos.
2. *Estimativa de Superfície* - Medida da extensão de superfície coberta com aquela estrutura.
3. *Largura de Estruturas* - Medida da espessura de estruturas como o osteóide.
4. *Profundidade de Erosão* - Profundidade da cavidade de reabsorção medida na superfície.

5. *Largura entre Marcações* - Medida da distância entre marcações duplas de tetraciclina.

Os índices histomorfométricos secundários ou derivados são calculados à partir de índices primários e incluem, dentre outros, período de erosão, período de formação e taxa de formação óssea (ERIKSEN, *et al.* 1994).

No presente estudo, a dupla marcação com tetraciclina foi realizada mas, devido à alta velocidade de reparo ósseo em ratos, sua leitura não foi muito clara, não permitindo então a obtenção de índices histomorfométricos secundários.

Neste estudo foram utilizados os seguintes índices:

1. *T.Ar* ( $mm^2$ ): Área do tecido total analisado (medula e trabéculas).
2. *BV/TV* (%): Volume ósseo trabecular como porcentagem do volume tecidual.
3. *Tb.Sp* ( $\mu m$ ): Distância entre trabéculas.
4. *Tb.N* (/mm): Número de trabéculas por milímetro de tecido.
5. *OV/BV* (%): Volume osteóide como porcentagem do volume ósseo.
6. *OS/BS* (%): Superfície osteóide como porcentagem da superfície óssea.
7. *Ob.S/BS* (%): Superfície de osteoblastos como porcentagem da superfície óssea.
8. *N.Ob/T.Ar*: Número de osteoblastos por área de tecido.
9. *ES/BS* (%): Superfície de reabsorção como porcentagem da superfície óssea.
10. *Oc.S/BS* (%): Superfície de osteoclastos como porcentagem da superfície óssea.
11. *N.Oc/T.Ar*: Número de osteoclastos por área de tecido.
12. *Tb.Th* ( $\mu m$ ): Espessura trabecular.

A região fraturada (em reparo) foi localizada no microscópio e foram analisados de 6 a 8 campos de osso trabecular logo abaixo da cortical. A análise histomorfométrica foi realizada às cegas e com a supervisão da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vanda

Jorgetti do Laboratório de Fisiopatologia Renal da Faculdade de Medicina da USP/São Paulo.

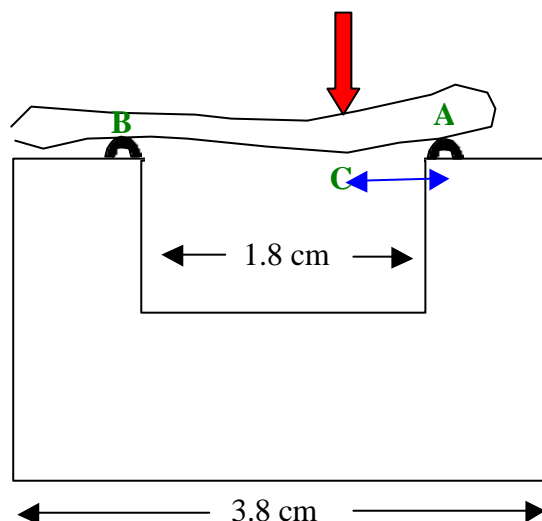
### **3.3 Ensaio Mecânico**

As tíbias destinadas ao ensaio mecânico (oito animais de cada grupo) foram todas limpas, embebidas em soro fisiológico (solução de cloreto de sódio a 0,9%) e congeladas. Na véspera do ensaio mecânico estas amostras foram colocadas na geladeira para descongelar e o local do calo ósseo foi marcado com lápis para permitir maior precisão durante o ensaio mecânico.

Os ensaios mecânicos foram realizados no Laboratório de Neuroendocrinologia no Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos. Foi utilizada uma máquina *Instron* modelo 4444 com célula de carga de 1 KN e pré-carga de 5N para evitar o deslizamento do corpo de prova durante o ensaio. Foi utilizado um suporte de metal de 3,8 cm de comprimento expondo apenas 1,8 cm do corpo de prova, sendo este apoiado sobre pequena haste metálica semi-cilíndrica acoplada ao suporte a fim de evitar possíveis danos ao osso a ser testado, conforme mostram as figuras 7 e 8. As tíbias foram posicionadas de tal forma que a superfície medial da tíbia (isto é, a região da fratura reparada) ficasse para baixo, para submeter esta região à tração conforme a carga foi aplicada, numa velocidade de 5 mm/min. O software *série 9* utilizado pela máquina de ensaio forneceu os valores da flecha e cargas impostas às amostras.



**FIGURA 7 – Máquina de ensaio e detalhamento da posição da tíbia.** Note que a região fraturada fica para baixo, na linha de ação da carga a ser aplicada.



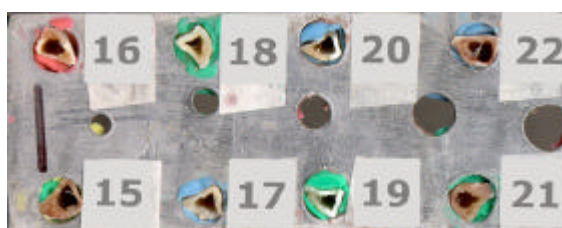
**FIGURA 8 - Desenho do suporte metálico para apoio das tíbias.** A seta vermelha indica o local de aplicação da carga pela máquina de ensaio. A distância marcada pela seta azul é de 0.5 cm e indica a distância da área lesada C (submetida à tração) até o ponto de apoio A.

Os ensaios mecânicos de flexão permitiram submeter o tecido ósseo neoformado a solicitações de tração, de forma que pudessem ser avaliadas quantitativamente as propriedades mecânicas dos tecidos estimulados e comparadas àquelas do tecido de reparo obtido naturalmente.

Apesar do ensaio realizado ser chamado de flexão em três pontos, ele submete a região fraturada a uma tração. Callister e Wiley (1994) citam que o teste

de tração é caracterizado pelo aumento gradual da carga, que é aplicada uniaxialmente, com velocidade constante. Este ensaio permite medir simultânea e constantemente a carga instantânea aplicada e os alongamentos resultantes. É um teste destrutivo pois a amostra sofre deformação e normalmente fratura.

Após os ensaios mecânicos, os ossos fraturados foram colocados em um suporte metálico e fixados com massa para modelar atóxica de tal forma que a secção transversal do osso pudesse ser digitalizada (figura 9).



**FIGURA 9 – Suporte metálico.** Exposição da secção transversal das tíbias no local da fratura.

As áreas das secções transversais foram estimadas no programa *Autocad® 2000*, bem como o momento de inércia e a linha neutra.



**FIGURA 10 – Detalhamento da secção transversal da tíbia no suporte metálico.**

O momento fletor foi calculado considerando-o no eixo X, com base na distância da linha de aplicação carga C às extremidades A e B apoiadas no suporte conforme mostrado nas figuras 8 e 11.

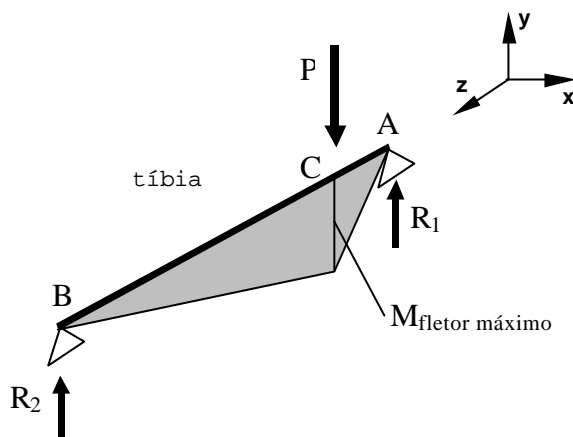


FIGURA 11 - Forças e Momentos atuantes na tíbia ensaiada.

Considerando que:  $\mathbf{A} = R_1$  ;  $\mathbf{B} = R_2$  ;

$\mathbf{a} = 13\text{mm}$  (dist. BC) e  $\mathbf{b} = 5\text{mm}$  (dist. AC)

$P$  = carga máxima aplicada em C.

Então,  $F_y = 0 \implies R_1 + R_2 = P$  (equação 1)

$M = 0 \implies R_1 \cdot b = R_2 \cdot a$  (equação 2)

2  $\implies R_2 = R_1 \cdot b/a$

1  $\implies R_1 + R_1 \cdot b/a = P \implies R_1 = \frac{P}{(1+b/a)}$

Lembrando que  $M_{\text{fletor } x} = F_y \cdot b$ , então:

$$M_{\text{fletor máx.}} = R_1 \cdot b = \frac{P}{(1+b/a)} \cdot b$$

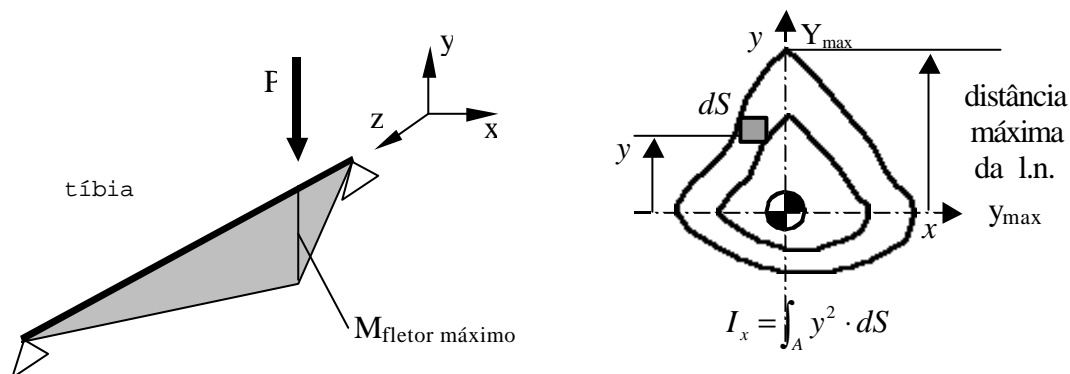


Substituindo pelos valores, temos:

$$M_{\text{fleitor máx.}} = \frac{P}{(1 + 5/13)} \cdot 5 = 3,61P \text{ [ N.mm]}$$

Assim, para o cálculo do momento fleitor, multiplicou-se 3,61 pelo valor da carga máxima para cada amostra.

Em seguida, para o cálculo da tensão no limite máximo foram necessárias algumas padronizações. No *Autocad®*, primeiramente as figuras (que foram digitalizadas ao lado de uma régua) foram ajustadas para uma escala em milímetros, seguidas de um contorno preciso das secções dos ossos com o auxílio da ferramenta de maquinificação (“lupa”) para o cálculo adequado da área e momento de inércia. Então todos os contornos da secção transversal das tíbias foram posicionados como no ensaio: com a parte medial para baixo e com a lateral (que recebeu a carga da máquina de ensaio) na vertical, permitindo assim um cálculo adequado do momento de inércia e da linha neutra.



**FIGURA 12** - Momentos de Inércia da tíbia ensaiada.

As forças paralelas ao eixo Y causam momento fletor em torno de X ( $M_{\text{fletor } x}$ ) e usam o momento de inércia em torno de X ( $I_x$ ) e a linha neutra em Y ( $Y_{\text{max}}$ ), pois:

$$I_x = \int y^2 dS$$

Por esta razão, o valor da linha neutra foi dado pela distância do centro de massa da figura até o ponto  $Y_{\text{max}}$  (vide figura 12). O valor do momento de inércia ( $I_x$ ) foi dado nas propriedades de massa fornecido no programa *Autocad*®, bem como a área do contorno.

### 3.4 Análise Estatística

Os dados obtidos no ensaio mecânico e na histomorfometria óssea foram analisados estatisticamente com o programa *GraphPad Instat*® através da análise de variância (ANOVA) para a comparação simultânea dos grupos (controle, tratado com ultra-som e tratado com laser). A análise de *Tukey-Kramer* foi utilizada para verificar a existência de diferença significativa entre os grupos precisando o nível de significância dos pares controle *versus* ultra-som, controle *versus* laser e laser *versus* ultra-som.

O nível de significância estatística utilizado foi de 5% em todas as análises.

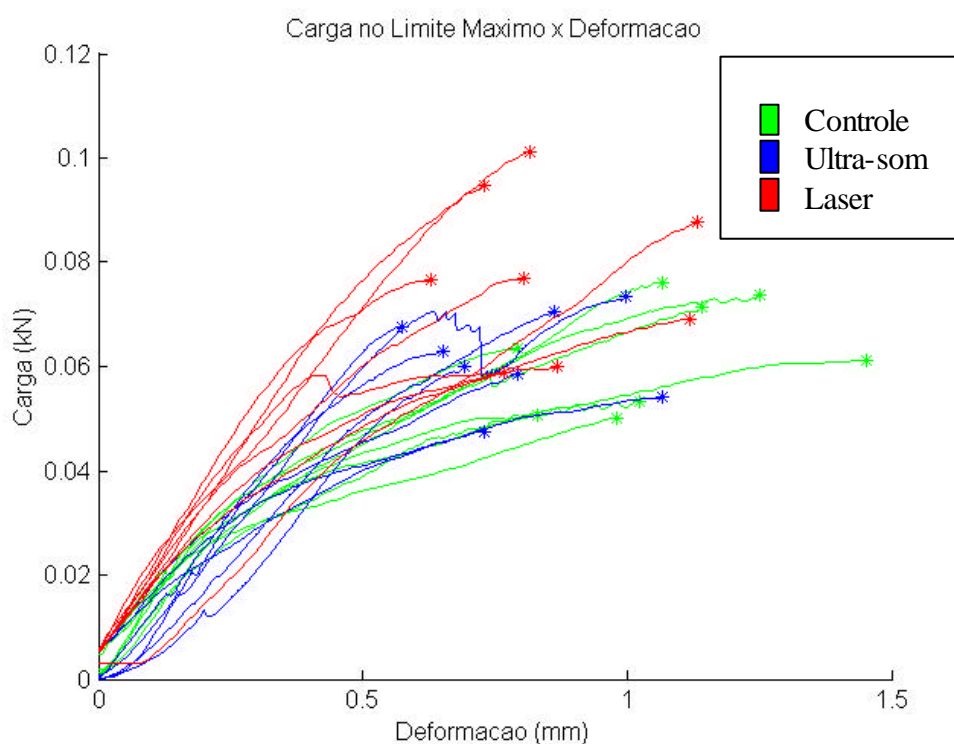
## 4. Resultados

### 4.1 Resultados do Ensaio Mecânico

Os dados relativos ao ensaio mecânico bem como a análise estatística dos mesmos podem ser encontrados, respectivamente, nos apêndices A e C.

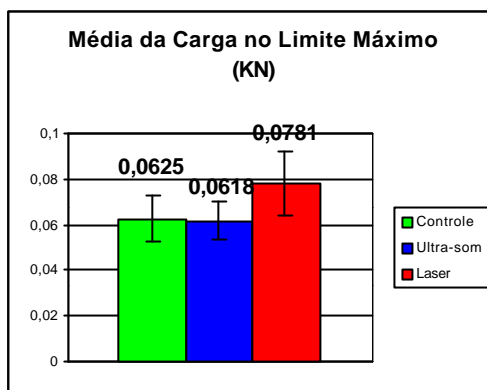
#### 4.1.1 Carga Máxima

Os dados obtidos no ensaio mecânico permitiram a obtenção das curvas carga *versus* deformação (ou flecha) dos grupos Laser, Ultra-som e Controle.



**FIGURA 13 - Gráfico carga versus deformação.** Relativo às 24 tíbias submetidas ao ensaio mecânico de flexão.

A média da carga suportada por cada um dos grupos no limite máximo durante o ensaio mecânico de flexão em três pontos está representada na figura 14.



**FIGURA 14 - Média da Carga no Limite Máximo.**

Através da análise estatística foi possível comparar os dados dos diferentes grupos experimentais.

A carga no limite máximo, em KN, suportada pelas amostras do grupo tratado com laser ( $0,0781 \pm 0,0153$ ) foi significativamente maior que os grupos tratado com ultra-som ( $0,0618 \pm 0,0086$ ) e controle ( $0,0625 \pm 0,0105$ ), com nível de significância  $p < 0,05$  ( $p = 0,0189$ ) em ambos casos. A comparação do grupo ultra-som com controle teve nível de significância  $p > 0,05$ .

#### **4.1.2 Flecha**

A média das flechas (ou deformação provocada nas amostras) é representada na figura 15 para os grupos controle, ultra-som e laser.

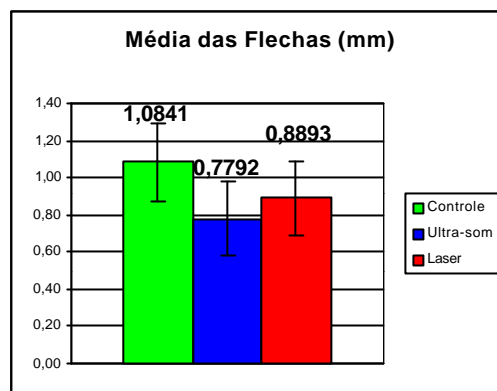


FIGURA 15 -Média das flechas.

O grupo controle ( $1,0841 \pm 0,2104$ ) teve sua média da flecha, em mm, significativamente maior que a do grupo tratado com ultra-som ( $0,7791 \pm 0,2029$ ) mas as outras comparações não permitiram a mesma afirmação.

#### 4.1.3 Área da Secção Transversal no Calo e Momento de Inércia

A área da secção transversal do calo ósseo e o momento de inércia foram calculados no programa *Autocad®*, e não houve significância ( $p > 0,05$ ) para quaisquer comparações entre grupos para estas duas variáveis, conforme está representado na tabela 1.

TABELA 1 - Médias e desvios padrão da área e do momento de inércia dos grupos controle, ultra-som e laser.

GRUPOS	ÁREA (mm <sup>2</sup> )	MOMENTO DE INÉRCIA (mm <sup>4</sup> )
Controle	$8,165 \pm 1,282$	$10,393 \pm 3,315$
Ultra-som	$8,078 \pm 1,586$	$8,918 \pm 2,997$
Laser	$8,061 \pm 1,177$	$8,865 \pm 2,711$

Os desvios padrão para os valores de momento de inércia foram muito altos (> 25%), indicando que a dispersão fora muito grande ( vide apêndice A).

#### 4.1.4 Tensão Máxima

O cálculo da tensão para cada amostra em seu limite máximo permitiu a construção do seguinte gráfico:

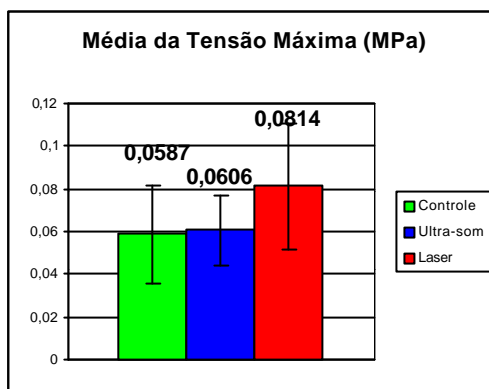


FIGURA 16 - Média das tensões obtidas para cada grupo.

Apesar do valor médio da tensão máxima, em MPa, do grupo tratado com laser ( $0,0817 \pm 0,0293$ ) ter sido maior que o ultra-som ( $0,0606 \pm 0,0164$ ) e controle ( $0,0587 \pm 0,0234$ ), a diferença não foi significativa para nenhum grupo, com  $p=0,1221$ .

#### 4.2 Resultados da Histomorfometria Óssea

A análise histomorfométrica das lâminas histológicas dos grupos controle, laser e ultra-som permitiu a obtenção de resultados que foram comparados estatisticamente (apêndice D).

#### 4.2.1 Área de Tecido e Volume Ósseo

A área de tecido (T.Ar) analisada foi muito semelhante nos grupos controle, ultra-som e laser, com médias (em mm<sup>2</sup>), respectivamente, 0,9685 ( $\pm$  0,1476), 0,9361 ( $\pm$  0,0883) e 0,9716 ( $\pm$  0,1719), não apresentando diferenças estatísticas significativas ( $p=$  0,8560) (figura 17a). A medida do volume ósseo como porcentagem do volume total de tecido (BV/TV) dos grupos controle (44,5701  $\pm$  12,961), ultra-som (52,1686  $\pm$  9,802) e laser (47,4779  $\pm$  11,105) também não demonstrou significância estatística com  $p=$  0,4176 (figura 17b).

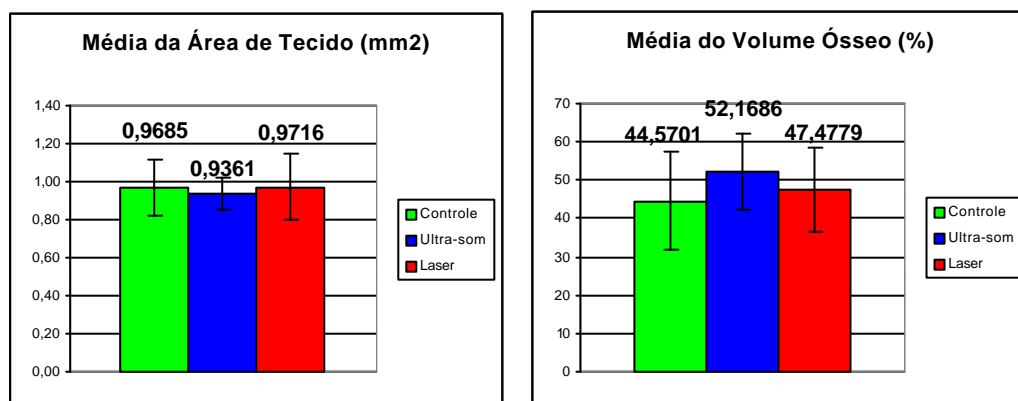
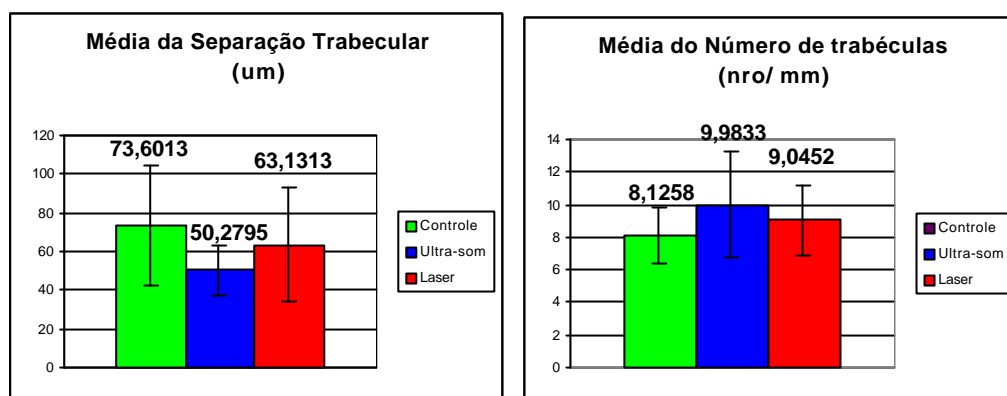


FIGURA 17 – a) Média da área de tecido analisado; b) Média da porcentagem de volume ósseo deste tecido.

#### 4.2.2 Separação Trabecular e Número de Trabéculas

A separação trabecular (Tb.Sp) (em  $\mu$ m) no grupo controle (73,6016  $\pm$  30,84) foi maior que nos grupos laser (63,1313  $\pm$  29,51) e ultra-som (50,2795  $\pm$  12,722), mas esta diferença não foi estatisticamente significativa, com  $p=$  0,2159 (figura 18a). A média do número de trabéculas ósseas (Tb.N) dos grupos ultra-som (9,9833  $\pm$

3,232), laser ( $9,0452 \pm 2,113$ ) e controle ( $8,1258 \pm 1,682$ ) também não apresentou diferenças significativas ( $p= 0,3307$ ) (figura 18b).

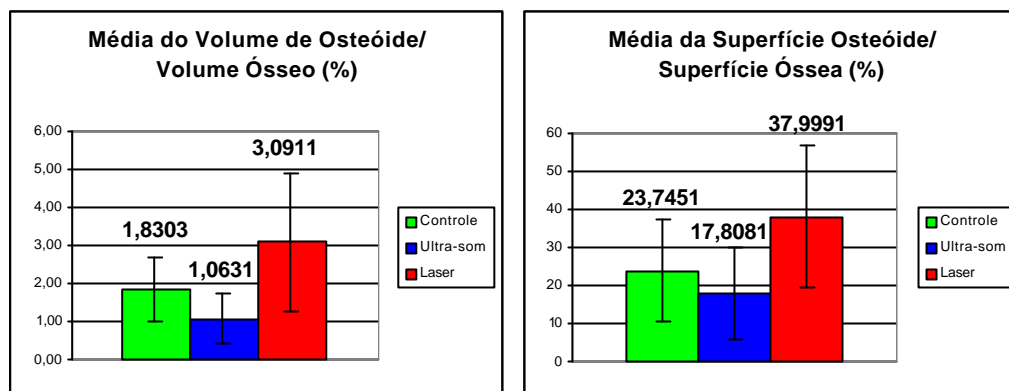


**FIGURA 18** a) Média da separação trabecular óssea. b) Média do número de trabéculas ósseas por milímetro de tecido dos grupos controle, ultra-som e laser.

#### 4.2.3 Volume e Superfície Osteóide

A média da proporção volume de osteóide/ volume ósseo (OV/BV) do grupo laser ( $3,0911 \pm 1,807$ ) foi estatisticamente maior ( $p= 0,01$ ) que a média obtida no grupo ultra-som ( $1,0631 \pm 0,6478$ ), mas nenhuma outra significância foi obtida comparando estes grupos com o controle ( $1,8303 \pm 0,8284$ ) (figura 19a). O resultado também foi estatisticamente significativo ( $p= 0,039$ ) para a comparação da proporção de superfície de osteóide/ superfície óssea (OS/BS), entre os grupos laser ( $37,9991 \pm 18,765$ ) e ultra-som ( $17,8081 \pm 12,127$ ) mas também não houveram comparações significativas com o grupo controle ( $23,7451 \pm 13,422$ ) (figura 19b).





**FIGURA 19 – a) Média da proporção volume de osteóide/ volume ósseo; b) Média da proporção de superfície de osteóide/ superfície óssea.**

#### 4.2.4 Superfície de Osteoblastos e Densidade de Volume de Osteoblastos

A superfície de osteoblastos proporcional à superfície óssea (Ob.S/BS) foi significativamente maior no grupo laser ( $11,3755 \pm 3,354$ ) que no grupo ultra-som ( $4,9330 \pm 3,535$ ) com  $p=0,01$ , porém, sem quaisquer comparações significativas com o grupo controle ( $6,5706 \pm 4,8226$ ) (figura 20a). Quanto à densidade de volume de osteoblastos (N.Ob/T.Ar), o grupo laser apresentou maior número de osteoblastos por unidade de área de tecido analisado ( $117,8392 \pm 41,406$ ) quando comparado aos grupos ultra-som ( $57,8933 \pm 44,477$ ) e controle ( $56,1326 \pm 35,710$ ) com significância estatística de 0,009 (figura 20b).

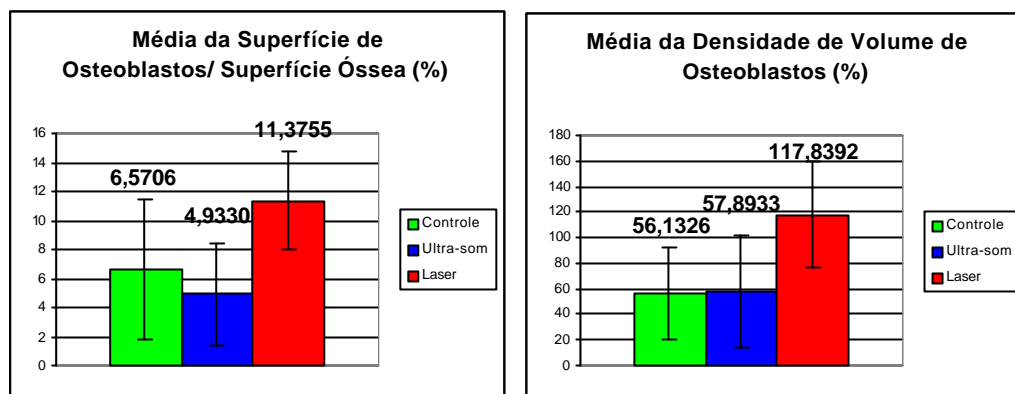


FIGURA 20 – a) Média da superfície de osteoblastos proporcional à superfície óssea analisada; b) Média do número de osteoblastos por unidade de área de tecido.

#### 4.2.5 Superfície de Reabsorção

A média da superfície de reabsorção relativa à superfície óssea (ES/BS) do grupo ultra-som ( $14,3249 \pm 6,092$ ) foi significativamente maior que a do grupo controle ( $5,3702 \pm 3,306$ ) com  $p= 0,02$ , mas o resultado do grupo laser ( $9,7054 \pm 7,157$ ) não apresentou relação estatística com os demais resultados (figura 21).

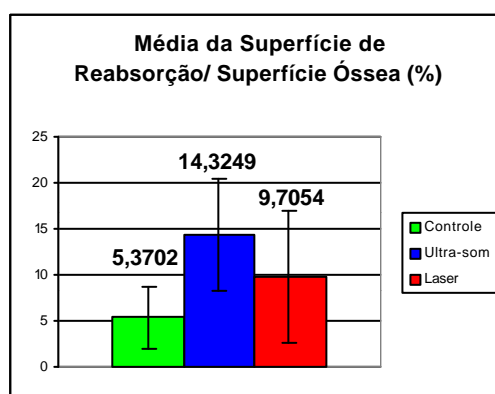


FIGURA 21 - Média da superfície de reabsorção relativa à superfície óssea.

#### 4.2.6 Superfície de Osteoclastos e Densidade de Volume de Osteoclastos

Da mesma forma, a média da superfície de osteoclastos (Oc.S/BS) do grupo ultra-som ( $4,7388 \pm 2,486$ ) também foi estatisticamente maior ( $p= 0,04$ ) que o grupo controle ( $2,1862 \pm 1,558$ ), sem significância quanto ao grupo laser ( $2,8995 \pm 1,673$ ) (figura 22a). Apesar da média da densidade de volume de osteoclastos, ou número de osteoclastos por área de tecido (N.Oc/T.Ar), do grupo ultra-som ( $26,9250 \pm 12,596$ ) ter sido maior que a dos grupos controle ( $10,6130 \pm 8,051$ ) e laser ( $19,5813 \pm 17,406$ ), estas diferenças não foram estatisticamente significativas ( $p= 0,06$ ) (figura 22b).

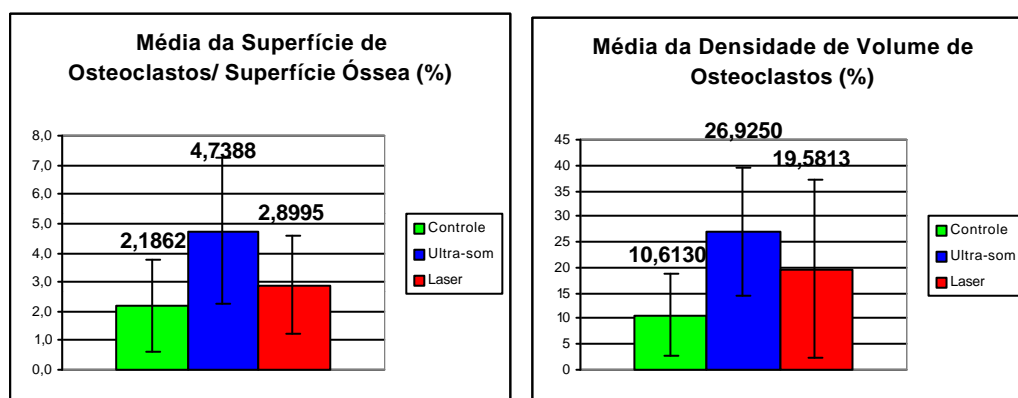
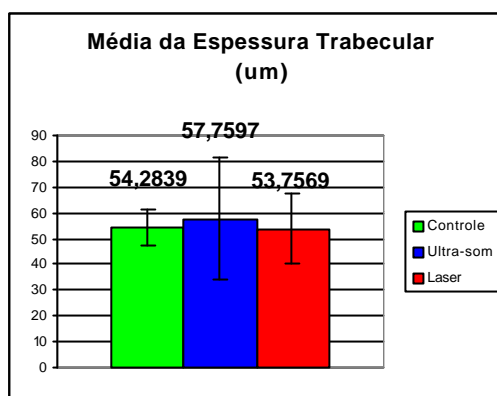


FIGURA 22 – a) Média da superfície de osteoclastos por unidade de superfície óssea; b) Média do número de osteoclastos por unidade de área de tecido.

#### 4.2.7 Espessura Trabecular

As médias da espessura trabecular (em  $\mu\text{m}$ ) dos grupos ultra-som ( $57,2839 \pm 23,514$ ), controle ( $54,2839 \pm 7,310$ ) e laser ( $53,7569 \pm 13,505$ ) estão representadas

na figura 23. Não houve significância estatística ( $p=0,87$ ) para quaisquer comparações entre os grupos para esta variável.



**FIGURA 23** – Média da espessura trabecular dos grupos controle, ultra-som e laser.

## 5. Discussão

O uso do ultra-som para acelerar o reparo ósseo está bem estabelecido e aprovado pela FDA americana. De acordo com Heckman e colaboradores (1994), as ondas de pressão geradas pelo ultra-som podem mediar a atividade biológica diretamente pela deformação mecânica da membrana celular ou, indiretamente, pelo efeito elétrico causado por esta deformação.

Chang e colaboradores (2002) investigaram os efeitos do ultra-som e das microondas no reparo de fraturas em coelhos e obtiveram aumento na neoformação óssea e na rigidez torsional apenas no grupo tratado com ultra-som, sugerindo que a hipertermia não deve promover esta estimulação óssea.

Heckman e colaboradores (1994) e Kristiansen e colaboradores (1997) realizaram, respectivamente, em média 86 e 70 dias de estimulação ultra-sônica, e obtiveram sucesso no tratamento de fraturas recentes em humanos. Duarte e Xavier (1983) obtiveram sucesso no tratamento de fraturas não consolidadas de humanos com no mínimo 30 dias de tratamento.

No presente estudo, o ensaio mecânico de três pontos demonstrou que a carga máxima e a tensão máxima do grupo tratado com ultra-som não foram significativamente maiores que as dos outros dois grupos (controle e tratado com laser). Isto pode ser explicado pelo tempo reduzido de tratamento (12 sessões ao longo de 18 dias) utilizado neste estudo quando comparado com outros autores que estudaram o efeito do ultra-som no reparo ósseo, também em ratos, como Gebauer e colaboradores (2002) que utilizaram 42 dias de tratamento ultra-sônico e Azuma e colaboradores (2001) que sacrificaram os animais 25 dias após a cirurgia.

Diferentemente da presente investigação, Gebauer e colaboradores (2002) afirmam que o ultra-som melhora as propriedades mecânicas, como maior torque no

limite máximo e maior rigidez de ossos fraturados de ratos diabéticos, apesar de não ter alterado significativamente a proliferação celular. No entanto, estes resultados foram conquistados com 42 dias de tratamento ultra-sônico.

Sun e colaboradores (1999) utilizaram apenas 7 ou 14 dias de tratamento ultra-sônico em defeito ósseo de fêmur de rato *in vitro*, mas com uma intensidade mais alta que a usual neste tipo de tratamento (320 ou 770 mW/cm<sup>2</sup>) e demonstraram aceleração no reparo ósseo.

Apesar de Duarte (1983) ter demonstrado que o sucesso do tratamento com ultra-som é mais notável nos primeiros 10 a 12 dias de estimulação em estudo com coelhos, alguns estudos como o de Azuma e colaboradores (2001) afirmam que tratamentos mais longos são mais efetivos. Neste caso em particular, os ratos que tiveram seus fêmures fraturados, foram sacrificados 25 dias após a cirurgia, e o torque máximo (obtido no ensaio mecânico de torção) foi significativamente maior no grupo tratado com ultra-som, mas não houve alterações na área do calo nem no conteúdo mineral.

No presente estudo, apesar das propriedades mecânicas dos ossos tratados com ultra-som não terem apresentado diferenças significativas quando comparados aos outros grupos com sacrifício dos animais no 19<sup>o</sup> dia pós-fratura, a área do calo ósseo foi praticamente igual nos três grupos, conforme ocorreu no estudo acima citado.

A flecha, isto é, a deformação média obtida no grupo controle foi significativamente maior que o grupo ultra-som. Isto pode ter ocorrido pelo fato de que os grupos estavam em diferentes fases do reparo ósseo, já que, segundo Einhorn (1996), o calo ósseo não curado tem um comportamento mais elástico, podendo sofrer grande deformação elástica sem romper. Logo, estes resultados

sugerem que, apesar do grupo tratado com ultra-som não ter suportado uma carga máxima maior que o grupo controle, o primeiro pode ter alcançado uma fase mais avançada do reparo ósseo enquanto que o segundo ainda se encontrava em uma fase mais precoce.

Na análise histomorfométrica, a média da superfície de reabsorção relativa à superfície óssea (ES/BS) e a média da superfície de osteoclastos (Oc.S/BS) do grupo ultra-som foram significativamente maiores que as do grupo controle, indicando maior ação osteoclástica e conseqüente predomínio da fase de reabsorção óssea no grupo tratado com ultra-som em relação ao controle. O número de osteoclastos por área de tecido também foi maior no grupo tratado com ultra-som, quando comparado aos outros grupos, mas esta diferença não foi estatisticamente relevante.

A porcentagem de superfície de reabsorção do osso trabecular (que foi significativamente maior no grupo ultra-som em relação ao controle) indica contínua reabsorção óssea ou reabsorção já terminada mas onde os osteoblastos ainda não começaram a preencher as lacunas de Howship (MEUNIER, 1995).

Assim, pelos resultados obtidos na histomorfometria, fica claro que o grupo ultra-som já se encontrava numa fase mais adiantada de reparo ósseo quando comparado ao grupo controle. Enquanto o grupo controle estava iniciando a reabsorção, o grupo ultra-som estava em intensa reabsorção e atividade osteoclástica, caracterizando, então, o ultra-som como estimulador do processo de reparo ósseo.

Associando estes achados aos resultados do ensaio mecânico, nota-se que a aceleração do reparo ósseo promovida pelo ultra-som não pôde ser demonstrada por maior carga máxima suportada, pois em fase de reabsorção ainda não se está

produzindo matriz nova, o que poderia ser responsável por maior resistência óssea. Logo, a carga e a tensão máximas só são boas preditoras da aceleração do reparo ósseo quando um dos grupos já se encontra em fase de formação óssea.

Quando a reabsorção óssea termina, a formação óssea é iniciada na cavidade de reabsorção através de um processo chamado “coupling”. Sob condições normais, este processo assegura que a quantidade de osso removido será depositado novamente durante a subsequente fase de formação. O estímulo mecânico de células ósseas parece ser importante para o processo de “coupling”. (ERIKSEN, *et al.* 1994). Logo, é pertinente sugerir que a vibração causada pelo ultra-som seja responsável pela abundante reabsorção óssea (conforme os resultados deste trabalho) e que provavelmente seria responsável pela formação óssea mais rápida no osso tratado em relação ao controle numa fase posterior, conforme já observado pelos autores citados anteriormente.

O modelamento/remodelamento ósseo é iniciado pelo recrutamento de osteoclastos e subsequente reabsorção óssea, que é então seguida de recrutamento de osteoblastos e subsequente formação de matriz óssea e sua mineralização (ERIKSEN, *et al.* 1994).

A superfície de osteoblastos proporcional à superfície óssea (Ob.S/BS) foi estatisticamente maior no grupo laser que no grupo ultra-som. Já o número de osteoblastos por área de tecido (N.Ob/T.Ar) do grupo laser foi significativamente maior que dos grupos ultra-som e controle. As médias das proporções volume de osteóide/ volume ósseo (OV/BV) e superfície de osteóide/ superfície óssea (OS/BS) do grupo laser foram estatisticamente maiores que as médias obtida no grupo ultra-som. Tudo isto indica que a radiação laser foi capaz de acelerar ainda mais o processo de reparo ósseo pois, enquanto o grupo controle iniciava sua fase de



reabsorção e o grupo tratado com ultra-som se encontrava numa fase com maior presença de osteoclastos na região fraturada e conseqüente reabsorção óssea, conforme citado anteriormente, o grupo tratado com laser já apresentava um grande número de osteoblastos e osteóide abundante, o que indica um predomínio da fase de formação óssea.

Estes resultados estão de acordo com o estudo de Marino (2003), que concluiu que a LILT favorece o processo de reparação óssea durante os estágios iniciais do mesmo. Os mecanismo estimulatórios de tal terapia não estão completamente elucidados mas, com base na literatura, supõe-se que o laser possa atuar estimulando a proliferação e/ou a diferenciação de células mesenquimais osteoprogenitoras imaturas, transformando-as mais rapidamente em osteoblastos e/ou em maior número, favorecendo conseqüentemente a formação precoce de osso reparador. Provavelmente tal efeito estimulatório não se estenda a estágios tardios subseqüentes, onde células maduras altamente diferenciadas passam a predominar, visto que não houve aumento estatisticamente significativo da efetividade do tratamento com o aumento do número de sessões (MARINO, 2003).

Segundo Trelles e Mayayo (1987), as propriedades particulares do laser não agiriam na síntese óssea *per se* mas poderia criar uma série de “condições ambientais” que aceleram a cura da fratura. Karu e colaboradores (1995) constataram que o laser He-Ne aumenta os níveis de ATP em células cultivadas *in vitro*. Coombe e colaboradores (2001) obtiveram um aumento no cálcio intracelular em células osteoblásticas humanas tratadas com terapia laser de baixa intensidade, indicando que estas células respondem positivamente à LILT.

De acordo com Nicolau e colaboradores (2003) a terapia laser de baixa intensidade aumenta a atividade de reabsorção e formação óssea em fraturas de

fêmures de ratos. Cinco dias após a cirurgia o volume ósseo e a superfície de osteoclastos do grupo tratado eram maiores que o controle, e em quinze dias pós-cirúrgico a superfície de osteoblastos e a taxa de aposição mineral eram também estatisticamente maiores no grupo tratado com laser.

A LILT estimula o crescimento da área trabecular e a concomitante invasão de osteoclastos durante a primeira semana de tratamento pós-osteotomia de tíbia, e acelera a organização de colágeno da matriz ao final da segunda semana (GARAVELLO-FREITAS *et al.*, 2003). Logo, se no presente estudo, animais tratados com laser tivessem sido sacrificados ao final da primeira semana (após a realização da fratura) possivelmente os resultados obtidos seriam semelhantes aos acima citados e que, de fato, estão de acordo com o que foi observado no grupo ultra-som, porém, com 19 dias de pós-cirúrgico e 12 sessões de tratamento.

É interessante notar que, no presente estudo, a terapia laser apresentou resultados estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ) também no ensaio mecânico, quanto à carga no limite máximo quando comparada aos grupos controle e ultra-som. Isto deixa claro que numa fase em que já existe predomínio de formação óssea (como no caso do grupo laser) o resultado do ensaio mecânico pode indicar a aceleração do processo de reparo ósseo. Como as médias do número, espessura e separação entre as trabéculas ósseas, que se referem ao osso já mineralizado, não obtiveram diferença significativa entre os grupos estudados, fica evidente então que a presença significativa de osteóide pôde assegurar a maior resistência óssea do grupo laser.

Bem como a presente investigação, Luger e colaboradores (1998) concluíram que a carga máxima suportada no calo da tíbia de rato fraturada foi significativamente maior no grupo que recebeu tratamento com radiação laser. As

diferenças entre as propriedades dos calos dos dois grupos indicaram que os calos não irradiados tendiam a ser maiores em volume e mais fracos, pois apresentavam composição mais fibrocartilaginosa e menos ossificada. Já os calos das fraturas tratadas apresentavam início de união óssea e, portanto, o calo já havia sido reabsorvido.

Vários estudos reforçam o sucesso da terapia laser no tratamento de fraturas (SILVA JÚNIOR *et al.*, 2002; LUGER *et al.*, 1998; FREITAS *et al.*, 2000; GARAVELLO-FREITAS *et al.*, 2003, dentre outros autores). Apesar dos resultados positivos encontrados, os estudos utilizam parâmetros e duração de tratamento muito diferentes, dificultando a comparação dos mesmos.

Considerando que na presente investigação os resultados para carga máxima do ensaio mecânico só foram significativamente positivos para o grupo tratado com laser, e que o tratamento com ultra-som foi utilizado por um período reduzido de tempo quando comparado com muitos outros trabalhos, é pertinente notar que a grande questão a ser bem estabelecida é a dosagem *versus* tempo de tratamento.

Além dos parâmetros de tempo e dosagem de tratamento, é relevante considerar a variabilidade da geometria óssea - mesmo dentre indivíduos da mesma espécie, sexo e idade - e as diferentes adaptações que o osso pode sofrer no processo de reparo, quando busca-se estudar as propriedades mecânicas do osso.

Um aumento na densidade óssea ocorre com exercícios com carga e após o tratamento com certos agentes terapêuticos. Além disso, alterações na geometria óssea são observadas durante o reparo ósseo, fenômeno este que parece ser adaptativo. Com isto, eventos relacionados à tensão têm sido o foco da fisiologia óssea e biomecânica por mais de um século (KAPLAN *et al.*, 1994).

Quando ossos inteiros são submetidos às condições de carga experimental ou fisiológica, seu comportamento mecânico pode depender não somente da massa do tecido e de suas propriedades materiais mas também de sua geometria e arquitetura (EINHORN, 1992).

No presente estudo, a área de tecido (T.Ar) e a medida do volume ósseo como porcentagem do volume total de tecido (BV/TV), analisados na histomorfometria, não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre os grupos controle, ultra-som e laser. Da mesma forma, a área da seção transversal das tíbias ensaiadas dos 3 grupos foi muito semelhante. Isto possivelmente ocorreu pela osteotomia realizada, pois esta não permitiu movimento interfragmentário, não culminando, então, em um calo macroscopicamente maior que o tamanho original do osso em nenhum grupo de animais.

Porém, a distribuição deste material ósseo em cada seção foi muito distinta, e isto deve estar ligado às diferenças inter-individuais. Dentro de cada grupo (controle, ultra-som e laser) houve uma dispersão muito grande do momento de inércia, com uma porcentagem de desvio padrão da média de 31,9%, 33,6% e 30,6% respectivamente, não possibilitando nem mesmo a associação de diferentes momentos de inércia a diferentes grupos de tratamento, conforme pode ser observado no apêndice A.

Einhorn (1992) demonstrou cautela quanto a este parâmetro quando descreveu que, de maneira ideal, na flexão ou na torção, o osso deveria ser distribuído o mais longe possível da linha neutra da carga, e o parâmetro geométrico usado para descrever este fenômeno é o momento de inércia da área. Logo, se um osso tem a cortical fina mas um diâmetro aumentado, distribuindo o material longe

da linha neutra, há uma melhora na resistência a cargas de flexão pela propriedade do momento de inércia de área.

No presente estudo todas as amostras foram igualmente posicionadas e o valor do desvio padrão da linha neutra foi o menor de todos os desvios dos parâmetros do ensaio mecânico. O desvio padrão do momento fletor também não foi alto, o que demonstra que o único parâmetro com resultados discrepantes foi o momento de inércia.

Jämsä e colaboradores (1998) afirmam que a forma curva e cônica da tíbia de ratos pode interferir em testes biomecânicos.

É importante lembrar que ensaios mecânicos com ossos são de difícil padronização por tratar-se de um material heterogêneo e anisotrópico, enquanto material compósito, e assimétrico anatomicamente, levando a problemas importantes quanto à geometria, posicionamento e distribuição de tensões.

A tensão máxima média, em MPa, do grupo tratado com laser ( $0,081 \pm 0,030$ ) foi maior que o grupo ultra-som ( $0,061 \pm 0,016$ ) e controle ( $0,059 \pm 0,023$ ). A média da carga máxima do grupo laser excedeu em 25% esta mesma média do grupo controle e obteve significância estatística. Já a média da tensão máxima do laser excedeu em 38,64% a tensão do grupo controle, mas devido ao grande desvio padrão, não obteve significância estatística.

Do que já foi exposto anteriormente quanto ao desvio padrão dos outros parâmetros deste estudo, é evidente que o grande impecilho para o sucesso da análise estatística da tensão máxima foi a grande dispersão do momento de inércia (vide apêndice A).

Este fato também impediu a correlação dos resultados da carga e da tensão máximas. Os resultados da tensão deveriam corresponder, senão superar, os da

carga máxima, já que a tensão é muito mais específica que a carga máxima por levar em consideração as propriedades de distribuição de massa do material estudado. O programa *Autocad*® calcula a área e o momento de inércia da secção transversal, mas não é capaz de informar sobre diferenças na densidade óssea.

Apesar da massa óssea ser a principal determinante da resistência mecânica óssea, 30 a 40% da variabilidade da última não é explicável pela medida da primeira. Assim, a qualidade do tecido ósseo, que interfere notavelmente no grau de mineralização, no nível de remodelamento e na microarquitetura, é igualmente um elemento a ser considerado. Sugere-se que os parâmetros microestruturais dados por medidas histomorfométricas permitam explicar de 10 a 30% suplementares da variabilidade da resistência mecânica óssea (CORTET; MARCHANDISE, 2001).

O uso da histomorfometria e do ensaio mecânico num mesmo estudo é importante porque enquanto o ensaio nos informa sobre o comportamento do osso como um todo (osso cortical e trabecular), a análise histomorfométrica complementa estes resultados com dados mais específicos da composição óssea trabecular, indicando a fase de reparo em que o osso analisado se encontra.

Os resultados do presente estudo estão de acordo com várias investigações a respeito do laser (NICOLAU *et al.*, 2003; SILVA JÚNIOR *et al.*, 2002; LUGER *et al.*, 1998; FREITAS *et al.*, 2000 COOMBE, 2001; GARAVELLO-FREITAS *et al.*, 2003) e do ultra-som (GEBAUER *et al.* 2002; AZUMA *et al.*, 2001; TAKIKAWA *et al.* 2001) e trazem informações importantes: o ultra-som acelerou o reparo ósseo (em relação ao grupo controle) por viabilizar mais rapidamente a fase de reabsorção, enquanto que a terapia laser foi capaz de acelerar ainda mais este processo por já promover um predomínio de formação óssea no 19º dia pós-cirúrgico no modelo experimental utilizado neste estudo.

## 6. Conclusão

Neste estudo, a análise das propriedades mecânicas do tecido ósseo neoformado em osteotomias parciais em tíbias de ratos mostrou diferenças entre os grupos tratados com laser, ultra-som e controle. As tíbias dos animais tratados com laser de baixa intensidade suportaram uma carga máxima maior, indicando maior resistência das mesmas.

Pela análise histomorfométrica ficou evidente que o tecido ósseo tratado com ultra-som de baixa intensidade tinha maior superfície de reabsorção e de osteoclastos (em relação ao grupo controle), promovendo prevalência de reabsorção óssea, enquanto que o irradiado com laser de baixa intensidade apresentou maior número e superfície de osteoblastos e maior volume e superfície de osteóide, indicando já o predomínio da fase de formação óssea. Baseado nisto, conclui-se que ambas modalidades terapêuticas podem acelerar o processo de reparo ósseo: o ultra-som por promover a reabsorção mais precocemente que o grupo controle, e o grupo laser por estar “um passo à frente” do grupo ultra-som com predomínio da fase de formação óssea 19 dias após a realização da osteotomia.

### Sugestões para Trabalhos Futuros

- Analisar e comparar as características histológicas avaliadas por histomorfometria e as propriedades mecânicas do calo ósseo tratado com laser ou ultra-som em diferentes fases do reparo ósseo.: fases mais precoces e mais tardias que a analisada neste estudo.
- Comparar ossos tratados com laser e ultra-som após a cura completa da fratura para avaliar possíveis diferenças mecânicas e/ou morfológicas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZUMA, Y. *et al.* (2001). Low-intensity pulsed ultrasound accelerates rat femoral fracture healing by acting on the various cellular reactions in the fracture callus. *J Bone Miner Res*, v. 16, n. 4, p. 671-680. apr.

ALBERTS, B. *et al.* (1989). Differentiated cells and the maintenance of tissues. In: *Molecular Biology of the Cell*. 2<sup>nd</sup> ed. Garland Publishing, Inc. New York & London. p. 989-990.

BARUSHKA, O.; YAAKOBI, T.; ORON, U. (1995). Effect of low-energy laser (He-Ne) irradiation on the process of bone repair in the rat tibia. *Bone*, v. 16, n. 1, p. 47-55.

BAXTER, G.D. (1997). *Therapeutic lasers: theory and practice*. United States of America: ed. Churchill Livingstone.

BURR, D.B. (2002) The contribution of the organic matrix to bone's material properties. *Bone*, v. 31, n. 1, p. 8-11. jul.

CALLISTER JR., W.D.; WILEY, W.D. (1994). Mechanical properties of metals. In: *Materials science and engineering – an introduction*. Cap. 6.

CHANG, W. H. *et al.* (2002). Study of thermal effects of ultrasound stimulation on fracture healing. *Bioelectromagnetics*, v. 23, n. 4, p. 256-263, may.

CHEN, N. L. *et al.* (2000). Ca<sup>+2</sup> regulates fluid shear-induced cytoskeletal reorganization and gene expression in osteoblasts. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, v. 278, p. C989–C997.

CLINGEN, H.J.; DICKSON, G.R. (1996). Fracture healing and alkaline phosphatase expression after low energy laser treatment. *Bone*, v. 19, n. 6, p. 700-701, dec.

COBEA (1991). Princípios éticos na experimentação animal. Editado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Junho, 1991.

COOMBE, A.R. *et al.* (2001). The effects of low level laser irradiation on osteoblastic cells. *Clin Orthop Res*, v. 4, p. 3-14.

CORDEY, J. (2000). Introduction: Basic concepts and definitions in mechanics. *Injury*, v.31, S-B1-S-B13.

CORTET, B.; MARCHANDISE, X. (2001). Microarchitecture et résistance mécanique osseuse. *Rev Rhum*, v. 68. p. 584-594.



DAVID, R. *et al.* (1996). Effect of low-power He-Ne laser on fracture healing in rats. *Lasers Surgery Medicine*, v. 19, n. 4, p. 458-64.

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

DUARTE, L.R.; XAVIER, C.A.M. (1983). Estimulação ultrasônica do calo ósseo. Aplicação clínica. *Revista Brasileira de Ortopedia*, v. 18, n. 3, p. 73-80, mai/jun.

DUNCAN, R.L.; HRUSKA, K.A. (1994). Chronic, intermittent loading alters mechanosensitive channel characteristics in osteoblast-like cells. *American Journal of Physiology*, v. 267, p. F909-F914.

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

EINHORN, T. A. (1996). Biomechanics of Bone. In: BILEZIKIAN, J. P.; RAISZ, L. G.; RODAN, G. A. *Principles of Bone Biology*. San Diego: Academic Press. Cap.3, p.25-37.

EINHORN, T. A. (1992). Bone Strength: the bottom line. *Calcified Tissue International*, v. 51, p. 333-339.

EINHORN, T. A. (1995). Enhancement of fracture-healing. *Journal of Bone and Joint Surgery*, v. 77-A, n. 6, p. 940-956. jun.

ERIKSEN, E.F.; AXELROD, D.W.; MELSEN, F. (1994). Bone Histomorphometry. Raven Press. New York.

FRANKEL, V.H.; BURSTEIN, A.H. (1971). Elasticity. In: *Orthopaedic Biomechanics: The Application of Engineering to the Musculoskeletal System*. Lea & Febiger. Philadelphia. p. 40-76.

FRANKEL, V.; MAYR, E.; RUTER, A. (2000). Ultrasound - an alternative healing method for nonunions? *Archives of Orthopedic and Trauma Surgery*, v.120, n.1-2, p.1-8.

FREITAS, I.G.F.; BARANAUSKAS, V.; CRUZ-HÖFLING, M.A. (2000). Laser effects on osteogenesis. *Applied Surface Science*, v. 154-155, p. 548-554, feb.

FUKADA, E.; YASUDA, I. (1957). On the piezoelectric effect of bone. *Journal of the Physical Society of Japan*, v. 12, n. 10, p. 1158-1162, oct.

GAM, A. N.; JOHANNSEN, F. (1995). Ultrasound therapy in musculoskeletal disorders: a meta-analysis. *Pain*, v. 63, p. 85-91.

GARAVELLO-FREITAS, I. *et al.* (2003). Low-power laser irradiation improves histomorphometrical parameters and bone matrix organization during tibia wound healing in rats. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, n. 70, p. 81-89.

GEBAUER, G. P. *et al.* (2002). Low-intensity pulsed ultra-sound increases the fracture callus strength in diabetic BB Wistar rats but does not affect cellular proliferation. *J Orthop Res*, v. 20, n. 3, p. 587-592, may.

GUZZARDELLA, G.A. *et al.* (2001). Laser technology in orthopedics: preliminary study on low power laser therapy to improve the bone-biomaterial interface. *Int J Artif Organs*, vol. 24, n. 12, p. 898-902, dec.

HADJIARGYROU, M. *et al.* (1998). Enhancement of fracture healing by low intensity ultrasound. *Clinical Orthopaedics*, suplemento 355, S216-29, out.

HECKMAN, J.D. *et al.* (1994). Acceleration of tibial fracture-healing by non-invasive, low-intensity pulsed ultrasound. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, v. 76-A, n. 1, jan.

HECKMAN, J. D.; SARASOHN-KAHN, J. (1997). The economics of treating tibia fractures. The cost of delayed unions. *Bull Hosp Jt Dis*, v. 56, n. 1, p. 63-72.

HOLLINGER, J.O.; BUCK, D.C.; BRUDER, S.P. (1999). Biology of Bone Healing Its Impact on Clinical Therapy. In: LYNCH, S.E.; GENCO, R.J.; MARX, R.E. *Tissue Engineering*. Quintessence Publishing Co, Inc.

JÄMSÄ, T. *et al.* (1998). Comparison of three-point bending test and peripheral quantitative computed tomography analysis in the evaluation of the strength of mouse femur and tibia. *Bone*, v. 23, n. 2, p. 155-161, aug.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. (1999). Tecido Ósseo. In: *Histologia Básica*. 9<sup>a</sup> ed. Guanabara Koogan. p. 111-128.

KAPLAN, F.S. *et al.* (1994). Form and Function of Bone. In: SIMON, S.R. *Orthopaedic Basic Science*. American Academy of Orthopaedic Surgeons.

KARU, T.; PYATIBRAT, L.; KALENDO, G. (1995). Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated in vitro. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 27, p. 219-223.

KITCHEN, S.S; PARTRIDGE, C.J. (1991). A review of low level laser therapy. *Physiotherapy*, v. 77, n. 3, p. 161-168, mar.

KRISTIANSEN, T.K. *et al.* (1997). Accelerated healing of distal radial fractures with the use of specific, low-intensity ultrasound. A multicenter, prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *American Journal of Bone and Joint Surgery*, v. 79, n.7, p. 961-73, jul.

LASER WORLD (2002). Laser Therapy FDA News: Food and Drug Administration approves laser therapy. In: *The Low Level Laser Therapy – LLLT Internet Guide* Disponível em: <<http://www.laser.nu/llt/fda.htm>> Acesso em: 11 fev. 2004.

LUGER, E.J. *et al.* (1998). Effect of low-power laser irradiation on the mechanical properties of bone fracture healing in rats. *Lasers Surgery Medicine*, v. 22, n. 2, p. 97-102.

MARINO, J.A.M. (2003). Efeito do laser terapêutico de baixa potência sobre o processo de reparação óssea em tibia de rato. 107p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2003.

MARKS, S. C.; HERMEY, D. C. (1996). The Structure and Development of Bone. In: BILEZIKIAN, J. P.; RAISZ, L. G.; RODAN, G. A. *Principles of Bone Biology*. San Diego: Academic Press. Cap.1, p. 3-14.

MAYR, E. *et al.* (2000). Does low intensity, pulsed ultrasound speed healing of scaphoid fractures?. *Handchir Mikrochir Plast Chir*, v.32, n.2, p.115-22. mar.

MESTER, E.; MESTER, A.F.; MESTER, A. (1985). The biomedical effects of laser application. *Lasers in Surgery and Medicine*, v. 5, p. 31-39.

MEUNIER, P.J. (1995). *Bone Histomorphometry. Osteoporosis: Etiology, Diagnosis and Management*. 2a ed. Lippincott-Raven publishers.. Philadelphia. p. 299-318.

NICOLAU, R.A. *et al.* (2003). Effect of low-power GaAlAs laser (660 nm) on bone structure and cell activity: an experimental animal study. *Lasers Med Sci*, n. 18, p. 89-94.

OSTRUM, R.F. *et al.* (1994). Bone Injury, Regeneration, and Repair. In: SIMON, S.R. *Orthopaedic Basic Science*. American Academy of Orthopaedic Surgeons.

PARFITT, A.M *et al.* (1987). Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. *Journal of Bone and Mineral Research*, v. 2, n. 6, p. 595-610.

PILLA, A. A. (2002). Low intensity electromagnetic and mechanical modulation of bone growth and repair: are they equivalent?. *J Orthop Sci*, v. 7, n. 3, p. 420-428.

PARIZOTTO, N. A. (1998). Ação do laser de hélio-neônio sobre o processo de reparo tecidual: um estudo do colágeno por microscopia eletrônica de varredura, microscopia de força atômica e espectroscopia por infravermelho. 181p. Tese (doutorado) – Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.

RHO, J.Y.; KUHN-SPEARING, L.; ZIOUPOS, P. (1998). Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. *Medical Engineering & Physics*, v. 20, p. 92-102.

SILVA JUNIOR *et al.* (2002). Computerized morphometric assesment of the effect of low-level laser therapy on bone repair: an experimental animal study. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*, v. 20, n. 2, p. 83-87.

SILVA O. L.; REINBOLD, K. A.; POLLACK, S. R. (1993). The Effects of 1.5 MHz Electric Field Stimulation in Primary Bone Cells Cultures. In: *Electricity and Magnetism in Biology and Medicine*. Ed.: Martin Blank. San Francisco, San Francisco Press, p.905-908.

SUN, J. *et al.* (1999). Bone defect healing enhanced by ultrasound stimulation: an *in vitro* tissue culture model. *J Biomed Mater Res*, v. 46, n.2, p. 253-261.

TAKIKAWA, S. *et al.* (2001). Low-intensity pulsed ultrasound initiates bone healing in rat nonunion fracture model. *Journal of Ultrasound Medicine*, n.20, p.197-205.

TER HAAR, G. (1987). Basic physics of therapeutic ultrasound. *Physiotherapy*, v. 73, n. 3, p. 110-113. mar.

TIMOSHENKO, S. (1978). Tensões nas vigas carregadas transversalmente. In: *Resistência dos Materiais.v.1*. Rio de Janeiro, Livros técnicos e científicos, cap.4, p. 109-111.

TRELLES, M.A.; MAYAYO, E. (1987). Bone fracture consolidates faster with low-power laser. *Lasers in Surgery and Medicine*, v. 7, p. 36-45.

VEÇOSO, M.C. (1993). *Laser em Fisioterapia*. 1<sup>a</sup> ed. São Paulo: Ed. Lovise Científica.

## APÊNDICE A - Dados Relativos ao Ensaio Mecânico

<b>Animal</b>	<b>CargaMáx.</b>	<b>Flecha</b>	<b>M. Fletor</b>	<b>L.Neutra</b>	<b>M.Inércia</b>	<b>Tensão</b>	<b>Área</b>
<b>CONTROLE</b>	<b>(KN)</b>	<b>(mm)</b>	<b>(N.mm)</b>	<b>(mm)</b>	<b>(mm<sup>4</sup>)</b>	<b>(MPa)</b>	<b>(mm<sup>2</sup>)</b>
1	0,0714	1,145	0,257833	2,334100	6,1066	0,098550	6,4473
2	0,0738	1,234	0,266499	2,113400	7,0171	0,080264	7,2671
3	0,0761	1,058	0,274805	2,160200	7,7276	0,076820	7,1911
4	0,0533	1,029	0,192472	2,446200	8,8074	0,053458	7,9398
5	0,0635	0,825	0,229305	2,649700	13,0565	0,046535	9,8500
6	0,0612	1,488	0,220999	2,580000	14,4083	0,039573	9,8602
7	0,0507	0,8689	0,183083	2,870000	13,5581	0,038755	7,6975
8	0,05	1,025	0,180555	2,483800	12,4651	0,035977	9,0659
<b>MEDIA</b>	<b>0,0625</b>	<b>1,084113</b>	<b>0,225694</b>	<b>2,454675</b>	<b>10,3933</b>	<b>0,058742</b>	<b>8,1649</b>
<b>DESV P</b>	0,01052	0,210431	0,037988	0,252099	3,3148	0,023412	1,2817
<b>%desvpad</b>	<b>16,83186</b>	<b>19,41042</b>	<b>16,83186</b>	<b>10,270172</b>	<b>31,8938</b>	<b>39,855487</b>	<b>15,6975</b>
<b>U-SOM</b>							
1	0,0705	0,8043	0,254583	2,099000	6,3959	0,083549	6,1518
2	0,0599	0,5441	0,216305	2,082900	6,0010	0,075078	6,7922
3	0,0733	0,9503	0,264694	2,521800	9,2308	0,072313	8,6486
4	0,0677	0,5147	0,244471	2,312100	8,8949	0,063547	7,8670
5	0,063	0,648	0,227499	2,089800	7,6311	0,062301	6,8475
6	0,0541	1,107	0,195361	1,974100	8,1070	0,047571	8,1905
7	0,0475	0,7961	0,171527	2,359100	9,4342	0,042892	8,9544
8	0,0585	0,8687	0,211249	2,804900	15,6503	0,037861	11,1729
<b>MEDIA</b>	<b>0,061813</b>	<b>0,77915</b>	<b>0,223211</b>	<b>2,280463</b>	<b>8,9182</b>	<b>0,060639</b>	<b>8,0781</b>
<b>DESV P</b>	0,008639	0,202872	0,031198	0,278422	2,9970	0,016412	1,5860
<b>%desvpad</b>	<b>13,97671</b>	<b>26,03762</b>	<b>13,97671</b>	<b>12,209030</b>	<b>33,6052</b>	<b>27,064539</b>	<b>19,6328</b>

<b>LASER</b>							
<b>1</b>	0,0946	0,7598	0,34161	2,178800	6,2105	0,119845	6,9875
<b>2</b>	0,0872	1,078	0,314888	2,114800	5,7181	0,116459	5,9514
<b>3</b>	0,101	0,833	0,364721	2,382700	8,7678	0,099115	8,5438
<b>4</b>	0,0769	0,8474	0,277694	2,093900	6,2167	0,093532	7,5356
<b>5</b>	0,0767	0,6552	0,276971	2,200100	8,4089	0,072467	9,2182
<b>6</b>	0,0697	1,223	0,251694	2,512900	12,2764	0,051520	9,2309
<b>7</b>	0,0599	0,8997	0,216305	2,744700	11,6132	0,051122	8,0243
<b>8</b>	0,0588	0,8186	0,212333	2,592600	11,7053	0,047029	8,9984
<b>MEDIA</b>	<b>0,0781</b>	<b>0,889338</b>	<b>0,282027</b>	<b>2,352563</b>	<b>8,8646</b>	<b>0,081386</b>	<b>8,0613</b>
<b>DESV P</b>	0,015386	0,1807	0,055561	0,243452	2,7108	0,029854	1,1771
<b>%desvpad</b>	<b>19,70072</b>	<b>20,31854</b>	<b>19,70072</b>	<b>10,348370</b>	<b>30,5797</b>	<b>36,682082</b>	<b>13,6474</b>

## APÊNDICE B – Dados Relativos à Análise Histomorfométrica

CONTROLE	Tb.Sp (mm)	Tb.N(/mm)	T.Ar (mm)	BV/TV (%)	OV/BV (%)	OS/BS (%)	Ob.S/BS (%)
1	32,8897	10,1245	0,7801	66,7009	1,1833	15,0086	5,2207
2	63,9772	8,5646	1,1741	45,2064	2,1136	27,5968	2,3826
3	73,4027	7,6907	1,0922	43,5486	2,4742	33,8106	15,4848
4	55,1516	8,5741	0,9361	52,7127	1,3563	16,4527	4,7814
5	112,4418	5,9314	0,9361	33,3064	3,4231	51,7287	12,3286
6	43,5910	10,5748	0,7801	53,9032	1,2522	16,6790	6,6646
7	90,4207	7,3887	1,1130	33,1905	0,9413	12,6701	3,1431
8	116,9355	6,1580	0,9361	27,9919	1,8981	16,0144	2,5592
<b>MÉDIA</b>	<b>73,6013</b>	<b>8,1258</b>	<b>0,9685</b>	<b>44,5701</b>	<b>1,8303</b>	<b>23,7451</b>	<b>6,5706</b>
<b>U-SOM</b>							
1	47,0788	7,7348	0,9361	63,5857	0,6076	19,6238	1,9401
2	43,6991	7,3738	0,9532	67,7773	0,7513	18,2955	7,3557
3	47,6531	10,8558	0,9361	48,2689	1,0417	13,1552	1,7784
4	45,3958	10,2664	0,7631	53,3950	1,7865	32,8064	11,5516
5	31,2446	16,9732	0,9361	46,9678	0,6360	7,0663	5,8035
6	64,7589	9,7773	0,9361	36,6832	0,2015	1,9448	3,9808
7	50,2927	10,2815	0,9361	48,2915	1,3744	12,2391	6,1023
8	72,1134	6,6036	1,0922	52,3791	2,1060	37,3338	0,9519
<b>MÉDIA</b>	<b>50,2795</b>	<b>9,9833</b>	<b>0,9361</b>	<b>52,1686</b>	<b>1,0631</b>	<b>17,8081</b>	<b>4,9330</b>
<b>LASER</b>							
1	67,5688	8,4128	1,1207	43,1555	1,4045	24,1664	10,6222
2	45,9659	11,8760	0,9361	45,4107	0,9280	5,9246	9,2055
3	38,8544	10,8800	1,1631	57,7261	1,6053	40,1582	10,5015
4	56,2697	10,2773	0,7801	42,1697	6,3120	42,6453	13,1022
5	128,5748	5,7733	1,1207	25,7704	3,7144	54,3724	10,1929
6	43,0262	9,0946	0,7801	60,8696	2,5481	36,1941	6,1555
7	47,2880	9,6298	0,7801	54,4624	4,0485	32,2899	17,2244
8	77,5024	6,4180	1,0922	50,2589	4,1681	68,2420	13,9998
<b>MÉDIA</b>	<b>63,1313</b>	<b>9,0452</b>	<b>0,9716</b>	<b>47,4779</b>	<b>3,0911</b>	<b>37,9991</b>	<b>11,3755</b>

CONTROLE	ES/BS (%)	Oc.S/BS (%)	Tb.Th (mm)	N.Ob/T.Ar (/mm2)	N.Oc/T.Ar(/mm2)
1	8,8575	3,1465	65,8810	55,1194	19,2277
2	2,7231	0,5804	52,7831	26,4027	2,5551
3	2,6241	1,2992	56,6253	123,6066	4,5780
4	3,5039	2,0649	61,4793	48,0692	11,7503
5	3,0278	0,8406	56,1528	84,3882	3,2046
6	8,5812	3,4459	50,9731	67,9378	23,0732
7	3,1969	1,0852	44,9204	29,6499	4,4924
8	10,4475	5,0272	45,4559	13,8867	16,0231
<b>MÉDIA</b>	<b>5,3702</b>	<b>2,1862</b>	<b>54,2839</b>	<b>56,1326</b>	<b>10,6130</b>
<b>U-SOM</b>					
1	5,9010	2,7055	82,2077	16,0231	10,6820
2	21,6633	8,5884	91,9166	60,8459	27,2758
3	12,3870	4,4507	44,4639	25,6369	26,7051
4	15,2073	4,4487	52,0095	132,3498	41,9326
5	13,7132	2,9967	27,6717	110,0251	28,8415
6	23,2194	8,4124	37,5188	42,7282	41,6600
7	15,2618	4,2881	46,9692	67,2969	30,9779
8	7,2465	2,0200	79,3187	8,2404	7,3248
<b>MÉDIA</b>	<b>14,3249</b>	<b>4,7388</b>	<b>57,7597</b>	<b>57,8933</b>	<b>26,9250</b>
<b>LASER</b>					
1	15,4459	3,5002	51,2973	116,0031	24,0929
2	16,6762	4,0661	38,2372	114,2979	29,9097
3	21,1509	5,8360	53,0568	147,8814	55,8854
4	5,1612	2,1483	41,0317	142,2849	11,5366
5	4,6615	1,2198	44,6374	71,3865	4,4617
6	1,6002	0,5670	66,9297	60,2468	5,1274
7	9,0574	3,3829	56,5559	187,1495	19,2277
8	3,8897	2,4756	78,3091	103,4633	6,4092
<b>MÉDIA</b>	<b>9,7054</b>	<b>2,8995</b>	<b>53,7569</b>	<b>117,8392</b>	<b>19,5813</b>



## APÊNDICE C - Dados Estatísticos Relativos ao Ensaio Mecânico

<b>DADOS ESTATÍSTICOS DA CARGA MÁXIMA (KN)</b>			
<b>N = 08</b>			
	<b>Controle</b>	<b>Ultra-som</b>	<b>Laser</b>
<b>Média</b>	0,0625	0,0618	0,0781
<b>Desvio Padrão</b>	0,0105	0,0086	0,0153
<b>Erro Padrão da</b>			
<b>Média</b>	0,0037	0,0030	0,0054
<b>Lim.inf. 95%</b>	0,0537	0,0549	0,0652
<b>Lim.sup. 95%</b>	0,0713	0,0690	0,0910
<b>Min.</b>	0,0500	0,0475	0,0588
<b>Mediana</b>	0,0623	0,0614	0,0768
<b>Máx.</b>	0,0761	0,0733	0,1010

Análise de variância unilateral ANOVA com nível de significância  $p < 0,05$ , distribuição gaussiana e teste de comparações múltiplas Tukey-Kramer.

Para as análises da carga máxima,  $p = 0,0189$ .

Se o valor de  $q$  é maior que 3,567 então o valor de  $p$  é menor que 0,05.

<b>Teste de Comparações Tukey-Kramer</b>			
<u>comparação</u>	<u>média da diferença</u>	<u>q</u>	<u>valor de p</u>
<b>Usx laser</b>	-0,02041	3,884	* $p < 0,05$
<b>Usx controle</b>	-0,00069	0,164	ns $p > 0,05$
<b>controle x laser</b>	-0,01629	3,720	* $p < 0,05$

<b>DADOS ESTATÍSTICOS DA TENSÃO MÁXIMA</b>			
<b>(MPa)</b>			
<b>N = 08</b>			
	<b>Controle</b>	<b>Ultra-som</b>	<b>Laser</b>
<b>Média</b>	0,0587	0,0606	0,0817
<b>Desvio Padrão</b>	0,0234	0,0164	0,0294
<b>Erro Padrão da</b>			
<b>Média</b>	0,0083	0,0058	0,0104
<b>Lim.inf. 95%</b>	0,0392	0,0469	0,0572
<b>Lim.sup. 95%</b>	0,0783	0,0744	0,1063
<b>Min.</b>	0,0360	0,0379	0,0499
<b>Mediana</b>	0,0500	0,0629	0,0830
<b>Máx.</b>	0,0985	0,0835	0,1198

Para as análises de tensão máxima,

**p= 0,1221**

<b>Teste de Comparações Tukey-Kramer*</b>			
<u>comparação</u>	<u>média da diferença</u>	<u>q</u>	<u>valor de p</u>
<b>Usxlaser</b>	-0,0211	2,522	ns p>0,05
<b>Usxcontrole</b>	-0,0019	0,227	ns p>0,05
<b>controlexlaser</b>	-0,0230	2,749	ns p>0,05

\*Se o valor de q é maior que 3,567 então o valor de p é menor que 0,05.

<b>DADOS ESTATÍSTICOS DA FLECHA MÁXIMA</b>			
<b>(mm)</b>			
<b>N = 08</b>			
	<b>Controle</b>	<b>Ultra-som</b>	<b>Laser</b>
<b>Média</b>	1,0841	0,7791	0,8893
<b>Desvio Padrão</b>	0,2104	0,2029	0,1807
<b>Erro Padrão da</b>			
<b>Média</b>	0,0744	0,0717	0,0639
<b>Lim.inf. 95%</b>	0,9082	0,6095	0,7382
<b>Lim.sup. 95%</b>	1,2600	0,9488	1,0400
<b>Min.</b>	0,8250	0,5147	0,6552
<b>Mediana</b>	1,0440	0,8002	0,8402
<b>Máx.</b>	1,4880	1,1070	1,2230

<b>Teste de Comparações Tukey-Kramer*</b>			
<b><u>comparação</u></b>	<b><u>média da diferença</u></b>	<b><u>q</u></b>	<b><u>valor de p</u></b>
<b>Usxlaser</b>	-0,1102	1,571	ns p>0,05
<b>Usxcontrole</b>	0,3050	4,348	* p<0,05
<b>controlexlaser</b>	0,1948	2,777	ns p>0,05

\*Se o valor de q é maior que 3,567 então o valor de p é menor que 0,05.

## APÊNDICE D - Dados Estatísticos Relativos à Análise Histomorfométrica

<b>DADOS ESTATÍSTICOS DA SEPARAÇÃO TRABECULAR (<math>\mu\text{m}</math>)</b>			
<b>N = 08</b>			
	<b>Controle</b>	<b>Ultra-som</b>	<b>Laser</b>
<b>Média</b>	73,6013	50,2795	63,1313
<b>Desvio Padrão</b>	30,846	12,722	29,509
<b>Erro Padrão da</b>			
<b>Média</b>	10,906	4,498	10,433
<b>Lim.inf. 95%</b>	47,809	39,642	38,457
<b>Lim.sup. 95%</b>	99,393	60,917	87,805
<b>Min.</b>	32,890	31,245	38,854
<b>Mediana</b>	68,690	47,366	51,779
<b>Máx.</b>	116,94	72,113	128,57

**p = 0,2159**

<b>DADOS ESTATÍSTICOS DO NÚMERO DE TRABÉCULAS ( /mm)</b>			
<b>N = 08</b>			
	<b>Controle</b>	<b>Ultra-som</b>	<b>Laser</b>
<b>Média</b>	8,1258	9,9833	9,0452
<b>Desvio Padrão</b>	1,682	3,232	2,113
<b>Erro Padrão da</b>			
<b>Média</b>	0,5947	1,143	0,7470
<b>Lim.inf. 95%</b>	6,719	7,281	7,279
<b>Lim.sup. 95%</b>	9,532	12,686	10,812
<b>Min.</b>	5,931	6,604	5,773
<b>Mediana</b>	8,128	10,022	9,362
<b>Máx.</b>	10,575	16,973	11,876

**p = 0,3307**

<b>DADOS ESTATÍSTICOS DA ÁREA DO TECIDO</b>			
<b>(mm)</b>			
<b>N = 08</b>			
	<b>Controle</b>	<b>Ultra-som</b>	<b>Laser</b>
<b>Média</b>	0,9685	0,9361	0,9716
<b>Desvio Padrão</b>	0,1476	0,0883	0,1719
<b>Erro Padrão da</b>			
<b>Média</b>	0,0522	0,0312	0,0608
<b>Lim.inf. 95%</b>	0,8450	0,8623	0,8279
<b>Lim.sup. 95%</b>	1,092	1,010	1,115
<b>Min.</b>	0,7801	0,7631	0,7801
<b>Mediana</b>	0,9361	0,9361	1,014
<b>Máx.</b>	1,174	1,092	1,163

**p = 0,8560**

<b>DADOS ESTATÍSTICOS DO VOLUME ÓSSEO</b>			
<b>(BV/TV) (%)</b>			
<b>N = 08</b>			
	<b>Controle</b>	<b>Ultra-som</b>	<b>Laser</b>
<b>Média</b>	44,5701	52,1686	47,4779
<b>Desvio Padrão</b>	12,961	9,802	11,105
<b>Erro Padrão da</b>			
<b>Média</b>	4,582	3,466	3,926
<b>Lim.inf. 95%</b>	33,733	43,972	38,193
<b>Lim.sup. 95%</b>	55,407	60,365	56,763
<b>Min.</b>	27,992	36,683	25,770
<b>Mediana</b>	44,378	50,335	47,835
<b>Máx.</b>	66,701	67,777	60,870

**p = 0,4176**

<b>DADOS ESTATÍSTICOS DO VOLUME DE OSTEÓIDE / VOLUME ÓSSEO (OV/BV) (%)</b>			
<b>N = 08</b>			
	<b>Controle</b>	<b>Ultra-som</b>	<b>Laser</b>
<b>Média</b>	1,8303	1,0631	3,0911
<b>Desvio Padrão</b>	0,8284	0,6478	1,807
<b>Erro Padrão da Média</b>	0,2929	0,2290	0,6390
<b>Lim.inf. 95%</b>	1,138	0,5214	1,580
<b>Lim.sup. 95%</b>	2,523	1,605	4,602
<b>Min.</b>	0,9413	0,2015	0,9280
<b>Mediana</b>	1,627	0,8965	3,131
<b>Máx.</b>	3,423	2,106	6,312

**p = 0,0102**

<b>Teste de Comparações Tukey-Kramer*</b>			
<u>comparação</u>	<u>média da diferença</u>	<u>q</u>	<u>valor de p</u>
controlexUs	0,7671	1,797	ns p>0,05
controlexlaser	-1,261	2,954	ns p>0,05
Usxlaser	-2,028	4,751	* p<0,05

\*Se o valor de q é maior que 3,567 então o valor de p é menor que 0,05.

<b>DADOS ESTATÍSTICOS DA SUPERFÍCIE OSTEÓIDE / SUPERFÍCIE ÓSSEA (OS/BS) (%)</b>			
<b>N = 08</b>			
	<b>Controle</b>	<b>Ultra-som</b>	<b>Laser</b>
<b>Média</b>	23,7451	17,8081	37,9991
<b>Desvio Padrão</b>	13,422	12,127	18,765
<b>Erro Padrão da Média</b>	4,745	4,288	6,635
<b>Lim.inf. 95%</b>	12,522	7,668	22,308
<b>Lim.sup. 95%</b>	34,968	27,948	53,690
<b>Min.</b>	12,670	1,945	5,925
<b>Mediana</b>	16,566	15,725	38,176
<b>Máx.</b>	51,729	37,334	68,242

**p = 0,0389**

<b>Teste de Comparações Tukey-Kramer*</b>			
<b><u>comparação</u></b>	<b><u>média da diferença</u></b>	<b><u>q</u></b>	<b><u>valor de p</u></b>
<b>controlexUs</b>	5,937	1,116	ns p>0,05
<b>controlexlaser</b>	-14,254	2,679	ns p>0,05
<b>Usxlaser</b>	-20,191	3,795	* p<0,05

\*Se o valor de q é maior que 3,567 então o valor de p é menor que 0,05.

<b>DADOS ESTATÍSTICOS DA SUPERFÍCIE DE OSTEOBLASTOS (%)</b>			
<b>N = 08</b>			
	<b>Controle</b>	<b>Ultra-som</b>	<b>Laser</b>
<b>Média</b>	6,5706	4,9330	11,3755
<b>Desvio Padrão</b>	4,8226	3,535	3,354
<b>Erro Padrão da</b>			
<b>Média</b>	1,706	1,250	1,186
<b>Lim.inf. 95%</b>	2,535	1,977	8,571
<b>Lim.sup. 95%</b>	10,606	7,889	14,180
<b>Min.</b>	2,383	0,9519	6,156
<b>Mediana</b>	5,001	4,892	10,562
<b>Máx.</b>	15,485	11,552	17,224

**p = 0,0104**

<b>Teste de Comparações Tukey-Kramer*</b>			
<b>comparação</b>	<b>média da diferença</b>	<b>q</b>	<b>valor de p</b>
<b>controlexUs</b>	1,638	1,170	ns p>0,05
<b>controlexlaser</b>	-4,805	3,432	ns p>0,05
<b>Usxlaser</b>	-6,442	4,602	* p<0,05

\*Se o valor de q é maior que 3,567 então o valor de p é menor que 0,05.



<b>DADOS ESTATÍSTICOS DA SUPERFÍCIE DE REABSORÇÃO (ES/BS) (%)</b>			
<b>N = 08</b>			
	<b>Controle</b>	<b>Ultra-som</b>	<b>Laser</b>
<b>Média</b>	5,3702	14,3249	9,7054
<b>Desvio Padrão</b>	3,306	6,092	7,157
<b>Erro Padrão da Média</b>	1,169	2,154	2,530
<b>Lim.inf. 95%</b>	2,606	9,231	3,721
<b>Lim.sup. 95%</b>	8,134	19,419	15,690
<b>Min.</b>	2,624	5,901	1,600
<b>Mediana</b>	3,350	14,460	7,109
<b>Máx.</b>	10,448	23,219	21,151

**p = 0,0186**

<b>Teste de Comparações Tukey-Kramer*</b>			
<b>comparação</b>	<b>média da diferença</b>	<b>q</b>	<b>valor de p</b>
<b>controlexUs</b>	-8,955	4,403	* p<0,05
<b>controlexlaser</b>	-4,335	2,132	ns p>0,05
<b>Usxlaser</b>	4,620	2,271	ns p>0,05

\*Se o valor de q é maior que 3,567 então o valor de p é menor que 0,05.

<b>DADOS ESTATÍSTICOS DA SUPERFÍCIE DE OSTEOCLASTOS(%)</b>			
<b>N = 08</b>			
	<b>Controle</b>	<b>Ultra-som</b>	<b>Laser</b>
<b>Média</b>	2,1862	4,7388	2,8995
<b>Desvio Padrão</b>	1,558	2,486	1,673
<b>Erro Padrão da Média</b>	0,5507	0,879	0,5914
<b>Lim.inf. 95%</b>	0,8838	2,661	1,501
<b>Lim.sup. 95%</b>	3,489	6,817	4,298
<b>Min.</b>	0,5804	2,020	0,5670
<b>Mediana</b>	1,682	4,368	2,929
<b>Máx.</b>	5,027	8,588	5,836

**p = 0,0436**

<b>Teste de Comparações Tukey-Kramer*</b>			
<b>comparação</b>	<b>média da diferença</b>	<b>q</b>	<b>valor de p</b>
<b>controlexUs</b>	-2,553	3,703	* p<0,05
<b>controlexlaser</b>	-0,713	1,035	ns p>0,05
<b>Usxlaser</b>	1,839	2,669	ns p>0,05

\*Se o valor de q é maior que 3,567 então o valor de p é menor que 0,05.

<b>DADOS ESTATÍSTICOS DA ESPESSURA TRABECULAR (µm)</b>			
<b>N = 08</b>			
	<b>Controle</b>	<b>Ultra-som</b>	<b>Laser</b>
<b>Média</b>	54,2839	57,7597	53,7569
<b>Desvio Padrão</b>	7,310	23,514	13,505
<b>Erro Padrão da Média</b>	2,585	8,314	4,775
<b>Lim.inf. 95%</b>	48,171	38,098	42,465
<b>Lim.sup. 95%</b>	60,396	77,421	65,049
<b>Min.</b>	44,920	27,672	38,237
<b>Mediana</b>	54,468	49,489	52,177
<b>Máx.</b>	65,881	91,917	78,309

**p = 0,8668**

<b>DADOS ESTATÍSTICOS DA DENSIDADE DE VOLUME DE OSTEOLASTOS (N.Ob/T.Ar) (%)</b>			
<b>N = 08</b>			
	<b>Controle</b>	<b>Ultra-som</b>	<b>Laser</b>
<b>Média</b>	56,1326	57,8933	117,8392
<b>Desvio Padrão</b>	35,710	44,477	41,406
<b>Erro Padrão da Média</b>	12,625	15,725	14,639
<b>Lim.inf. 95%</b>	26,273	20,703	83,217
<b>Lim.sup. 95%</b>	85,992	95,083	152,46
<b>Min.</b>	13,887	8,240	60,247
<b>Mediana</b>	51,594	51,787	115,15
<b>Máx.</b>	123,61	132,35	187,15

**p = 0,0089**

<b>Teste de Comparações Tukey-Kramer*</b>			
<u>comparação</u>	<u>média da diferença</u>	<u>q</u>	<u>valor de p</u>
controlexUs	-1,761	0,1224	ns p>0,05
controlexlaser	-61,707	4,289	* p<0,05
Usxlaser	-59,946	4,167	* p<0,05

\*Se o valor de q é maior que 3,567 então o valor de p é menor que 0,05.

<b>DADOS ESTATÍSTICOS DA DENSIDADE DE VOLUME DE OSTEOCLASTOS (N.Oc/T.Ar) (%)</b>			
<b>N = 08</b>			
	<b>Controle</b>	<b>Ultra-som</b>	<b>Laser</b>
<b>Média</b>	10,6130	26,9250	19,5813
<b>Desvio Padrão</b>	8,051	12,596	17,406
<b>Erro Padrão da Média</b>	2,846	4,453	6,154
<b>Lim.inf. 95%</b>	3,881	16,393	5,027
<b>Lim.sup. 95%</b>	17,345	37,457	34,136
<b>Min.</b>	2,555	7,325	4,462
<b>Mediana</b>	8,164	28,059	15,382
<b>Máx.</b>	23,073	41,933	55,885

**p = 0,0691**

## ANEXO A - Protocolo para Histologia de Tecido Ósseo Calcificado

Protocolo utilizado pelo Laboratório de Fisiopatologia Renal da Faculdade de Medicina da USP/São Paulo.

### 1) Fixação

Amostra óssea mantida em etanol a 70% por 3 dias (4° C).

### 2) Desidratação

Etanol absoluto (100%) por 3-5 dias (quanto mais desidratado, melhor a posterior penetração pela resina; 4° C).

### 3) Tolueno

1 dia a 4° C.

### 4) Penetração pela Resina (4° C):

- De 3 a 5 dias em Solução A\*
- De 3 a 5 dias em Solução 1%\*\*
- De 3 a 5 dias em Solução 2%\*\*\*

\**Solução A*: 25% de Dibutilftalato e 75% de Metilmetacrilato (estocado em geladeira)

\*\**Solução 1%*: Solução A (100ml) e 1gr de Peróxido de Benzoíla

\*\*\**Solução 2%*: Solução A (100ml) e 2grs de Peróxido de Benzoíla

### 5) Inclusão

A inclusão é feita numa pré-base, ou seja, num frasco de 20ml com tampa, com cerca de 5 ml de Solução 2% já polimerizada (esta solução polimeriza em estufa a 37° C). O material é adicionado à esta pré-base e a seguir completa-se com mais Solução 2%. O bloco estará completamente endurecido em cerca de 48 hs na estufa a 37° C.

### 6) Preparação do Bloco

O frasco de 20 ml onde foi feita a inclusão serve somente como molde. Logo, quebra-se o vidro e forma-se um bloco retangular com o auxílio de uma serra, que então será lixado.

#### 7) Microtomia

Em micrótomo de impacto com navalha de tungstênio (modelo JUNG Policut S, Leica) retira-se cortes de 5 a 7  $\mu\text{m}$  para coloração (parâmetros estáticos na histomorfometria) e cortes de 10  $\mu\text{m}$  para fluorescência (parâmetros dinâmicos).

Os cortes são então colocados em lâminas gelatinadas e esticados com álcool 50% e 100%.

Após a microtomia as lâminas são colocadas em estufa a 37° C por cerca de 12 hs.

#### 8) Desplastificação

Os cortes são desplastificados em Metilmetacrilato puro por 20-40 minutos e em seguida desidratados em Etanol absoluto. Reidratar em Etanol 50% e por fim água destilada.

À partir deste estágio o material desplastificado é corado com azul de toluidina 0,1% por cerca de 10 minutos, clareado no tolueno e montado.