

## EFEITO DO ULTRASSOM DE BAIXA POTÊNCIA NO REPARO ÓSSEO POR MEIO DE IMAGE- J

**Juliana de Carvalho Apolinário Coêlho**

Fisioterapeuta-Doutora; Professora das Faculdades Integradas de Três Lagoas - AEMS.

**Jader Iury de Souza Mercante**

Graduando em Fisioterapia  
Faculdades Integradas de Três Lagoas – FITL/AEMS

**Natalia Marinho Dourado Coelho**

Doutoranda UNESP – Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, SP, Brasil.  
Docente e Coordenadora do Curso de Enfermagem das Faculdades Integradas de  
Três Lagoas – AEMS, Três Lagoas, MS, Brasil.

**Gisele de Carvalho Apolinário Santos**

Doutora. Professora Contratada do Departamento de Matemática - UNESP –  
Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira, SP, Brasil. Professora das Faculdades  
Integradas Rui Barbosa – FIRB – Andradina, SP, Brasil.

**Mário Jefferson Quirino Louzada**

Livre Docente. Docente do Departamento de Apoio Produção e Saúde Animal,  
UNESP – Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, SP, Brasil.

### RESUMO

O tecido ósseo é frequentemente lesado, ocorrendo fraturas que podem ser completas ou incompletas. A presença de osteopenia ou osteoporose podem facilitar a ocorrência destas fraturas. A regeneração do tecido ósseo é determinada pela proliferação celular e deposição de sais de cálcio, que restabelecerão sua arquitetura e funcionalidade. O processo biológico de reparo ósseo pode ocorrer lentamente (retardo de consolidação) ou não se desenvolver (pseudoartrose), resultando em deficiência ou incapacidade para o indivíduo (DOBLARÉ et al., 2004). A resposta de reparo ósseo pode ser acentuada pela estimulação física, tanto mecânica quanto eletromagnética. Há evidências de que o ultrassom de baixa potência pode acelerar a regeneração óssea. Este trabalho objetivou verificar a implicação do ultrassom de baixa potência no defeito ósseo, criado experimentalmente, em tíbias de ratos sob ausência de carga. Trinta *Rattus norvegicus albinus*, Wistar adultos, divididos em: G1 (n=10), sem suspensão - 15 dias; G2 (n=10), suspenso pela cauda - 15 dias e G3 (n=10), suspensos pela cauda - 36 dias, foram submetidos à osteotomia em ambas as tíbias e à aplicação do ultrassom pulsado de baixa potência, frequência de 1 MHz, ciclo de trabalho 1:4, 30mW/cm<sup>2</sup>, nas tíbias direitas por 12 sessões de 20 minutos. Para análise utilizou-se sistema digital Digora®. O resultado não demonstrou diferença significativa, na variável estudada, ao comparar os lados tratados com os controles de cada grupo. A literatura relata uma aceleração da formação do calo ósseo pelo ultrassom, mas, nosso trabalho não evidenciou este fato, talvez pelo menor tempo de tratamento com relação aos trabalhos encontrados na literatura, assim como, pelo tipo de variável analisada em nosso estudo e pela técnica utilizada para análise desta variável.

**PALAVRAS-CHAVE:** Ausência de peso; Densidade óssea; Doenças ósseas metabólicas; Estimulação física; Osteotomia.

## INTRODUÇÃO E OBJETIVO

O osso é um tecido vivo que se renova permanentemente durante a vida toda. Essa renovação deve-se às células ósseas responsáveis pela atividade de formação (osteoblastos) e de reabsorção (osteoclastos) (GUYTON, 1997; ROBBINS, 1993). Um dos fatores responsáveis pela manutenção do metabolismo mineral normal dos ossos é a compressão longitudinal exercida sobre eles, produzida pelo efeito da gravidade sobre o arcabouço. A pressão estimula o crescimento ósseo por aposição. A descarga de peso resulta em maior espessura do osso e maior densidade (MCARDLE *et al.*, 2003), assim, para o osso ter uma boa resistência, é importante uma tensão adequada, visto que um osso subtensionado pode se tornar enfraquecido (HAYES; CARTER, 1979 *apud* GUIRRO, 1995).

Um ambiente desprovido de estímulos mecânicos produz efeitos diretos na estrutura óssea e altera sua função (HOLICK, 1998; SHIMANO, 2006), destarte a ausência de carga mecânica promove reabsorção óssea aumentada reduzindo assim a massa óssea (RUBIN *et al.*, 1985; TURNER *et al.*, 1994), podendo levar à ocorrência de osteopenia ou osteoporose.

Várias enfermidades acometem os animais (como luxação coxofemoral) provocando perda de marcha e prejudicando a manutenção do metabolismo mineral ósseo e conseqüentemente a qualidade dos ossos (ALBUQUERQUE SOUZA; TUDURY, 2003); estas características podem levar a fratura.

A remodelação óssea e sua estimulação são motivos de um grande número de estudos, com interesse focado principalmente, nos fatores capazes de acelerar a osteointegração, promovendo uma maior rapidez na reabilitação do paciente. Estudos demonstram que a resposta de reparo ósseo pode ser acentuada pela estimulação física, tanto mecânica quanto eletromagnética (LIND; BUNGER, 2001). Nesta linha há evidências de que o ultrassom de baixa intensidade pode acelerar a regeneração óssea (COLOMBO, 1992; DUARTE, 1977 *apud* RENNÓ *et al.*, 2002; DYSON; BROOKES, 1983; DUARTE; XAVIER, 1983 *apud* DOUAT, 2004).

Considerando a grande ocorrência de fraturas em indivíduos e animais debilitados e que na literatura encontram-se poucos trabalhos relacionando ausência de carga e seu processo de reparação óssea é objetivo deste estudo realizar análise

radiográfica em tíbias de ratos osteotomizadas, submetidos à ausência de carga e à aplicações de ultrassom, tendo como hipótese que o ultrassom promove a aceleração do processo de osteogênese.

## **METODOLOGIA**

### **Grupos Experimentais**

Após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (Protocolo nº 2007-002868), foram utilizados trinta ratos machos, da raça *Rattus norvegicus albinus*, variedade Wistar adultos ( $348 \pm 14g$ ), fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista - UNESP / Campus de Araçatuba - SP.

Os animais foram divididos em três grupos de 10 animais. No Grupo1 (G1) os animais foram submetidos à cirurgia para osteotomia; permaneceram livres em gaiolas individuais por 15 dias e concomitantemente foram tratados. No Grupo2 (G2) os animais foram submetidos à cirurgia para osteotomia e suspensos pela cauda por 15 dias e, concomitantemente, tratados com Ultrassom. No Grupo3 (G3) os animais foram suspensos pela cauda e após 21 dias de suspensão submetidos à cirurgia para osteotomia e novamente suspensos por 15 dias e tratados com Ultrassom.

### **Cirurgia**

A osteotomia foi realizada em ambas as tíbias, em região diafisária média, sob anestesia geral com Ketamina (30mg/kg) e Xilazina (3mg/kg), via intramuscular. Após a anestesia a superfície anterior da pata posterior direita e esquerda do animal, na região do terço médio, foi submetida à tricotomia seguida de anti-sepsia da região com etanol 70%. A pele foi incisada no sentido longitudinal da tíbia, os músculos afastados com pinça para permitir acesso, então as fraturas foram feitas por meio de osteotomia por perfuração, com broca cirúrgica para osso contra-ângulo de 2 mm, acoplada a motor de baixa rotação (uso odontológico), passando pelo perióstio, cortical óssea, até atingir o endóstio. Após a perfuração, o tecido muscular foi reposicionado e a pele suturada.

Após a cirurgia, para analgesia pós-operatória, os animais receberam uma dose de Buprenorfina, (0,05 mg/kg 0,02 ml de 12 em 12 h) via subcutânea por três dias, e receberam Pentabiótico (0,035ml) uma vez após cirurgia como profilaxia antimicrobiana.

### **Técnica de Suspensão**

A técnica de suspensão, que é proposta para simular ausência de carga ou ambiente de “microgravidade” (SILVA & VOLPON, 2004), provocando diminuição das propriedades mecânicas do osso (SHIMANO, 2006), foi realizada com os animais anestesiados com Ketamina (30mg/kg) e Xilazina (3mg/kg), via intramuscular, semelhantemente à técnica de suspensão utilizada por VICENTINI et al. (2007), divergindo no preparo da cauda do animal, que em nosso estudo foi lavada com sabonete líquido anti-séptico e substituída a tintura de Benjoin por Iodopovedine tópico.

### **Tratamento com Ultrassom**

Os animais foram imobilizados manualmente durante a terapia e apenas o membro direito de ambos os grupos foi tratado com Ultrassom pulsado de baixa potência, frequência de 1 MHz, ciclo de trabalho 1:4, 30mW/cm<sup>2</sup>, por 12 sessões de 20 minutos cada, servindo o membro esquerdo como controle. O protocolo de tratamento iniciou no segundo dia após a cirurgia para osteotomia. As aplicações foram executadas de forma padronizada, ocorrendo, a primeira, 48 horas após a osteotomia, com intervalo de 1 dia após 6 sessões consecutivas, cumprindo-se um total de 12 sessões de tratamento.

No 16º dia pós-operatório (pós-osteotomia), os animais foram anestesiados com Ketamina e Xilazina e então eutanasiados com Pentobarbital 1,5 ml (Tiopental®) intravenoso e suas tíbias foram retiradas para análise densitométrica.

## Image J

Ao término do experimento os animais foram anestesiados com Ketamina e Xilazina e então eutanasiados com Pentobarbital 1,5 ml (Tiopental<sup>®</sup>) intravenoso e suas tíbias foram desarticuladas, removidas, dissecadas e submetidas à análise.

As tíbias foram radiografadas por meio do aparelho de raios X GE-100 (General Electric, Milwaukee, EUA), operando com 60 Kvp, 8mA, 0,2 segundos, com distância foco-filme de 20 cm e com incidência do foco de radiação perpendicular ao plano do filme-objeto. As imagens digitais, das tíbias e de sua identificação junto a uma escada de alumínio, foram obtidas através de placa óptica do sistema digital Digora<sup>®</sup> (Soredex, Orion Corporation, Helsinki, Finland). A escada de alumínio foi usada como referencial densitométrico, de 9 degraus, cada degrau com 5x25mm<sup>2</sup> de área. As placas ópticas foram então colocadas em scanner a laser do próprio equipamento Digora<sup>®</sup>, lidas e enviadas ao programa computacional do sistema Digora<sup>®</sup> (LOUZADA *et al.*, 1998; SALZEDAS *et al.*, 2006). As imagens digitalizadas foram transferidas para um microcomputador e salvas com extensão TIFF para serem utilizadas pelo programa computacional Image J (livre pela internet). O programa computacional Image J<sup>®</sup> foi utilizado para avaliar em área pré estabelecida o nível de densidade, em tons de cinza, das tíbias e dos degraus da escada de alumínio. Os valores das tíbias foram convertidos para valores relativos à espessura em milímetros de alumínio (mmAl), através do programa computacional Excel<sup>®</sup>. Desta maneira, a densidade óssea será expressa em equivalente de Alumínio (mmAl).

## Análise Estatística

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente pelo Teste T de Student, pareado (mesmo grupo), com o programa *GraphPad Instat*<sup>®</sup>.

Os resultados foram todos apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. O nível de significância utilizado foi de 5% em todas as análises ( $p \leq 0,05$ ).

## RESULTADOS

A Densidade Óssea, mensurada no defeito ósseo, em milímetros de Alumínio está exposta, para cada Grupo em ambas as tíbias, na Tabela 1.

Os resultados da análise densitométrica, pelo sistema digital Digora<sup>®</sup>, não demonstraram diferenças significativas ( $p > 0.05$ ) entre as tíbias tratadas e controle de cada grupo, indicando assim que o ultrassom não interveio na qualidade mineral óssea.

Tabela 1: Média e desvio padrão da Densidade Óssea (mm Al) observadas na tíbia tratada e controle dos ratos dos grupos 1, 2 e 3; Análise realizada pelo sistema digital Digora<sup>®</sup>

GRUPO	DENSIDADE ÓSSEA (mm Al)	
	TRATADA	CONTROLE
G1	1,17 ± 0,17 <sup>a</sup>	1,19 ± 0,10 <sup>a</sup>
G2	1,43 ± 0,18 <sup>a</sup>	1,46 ± 0,28 <sup>a</sup>
G3	1,12 ± 0,27 <sup>a</sup>	1,24 ± 0,23 <sup>a</sup>

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, teste de Tukey ( $P > 0,05$ ).

## DISCUSSÃO

Carvalho e Cliquet Jr. (2003) analisando a ação do ultrassom pulsado de baixa potência durante 20 dias consecutivos, por 20 minutos diários, na região proximal dos fêmures de ratas osteopênicas, evidenciaram uma melhora da arquitetura dos ossos (análise qualitativa), mas não do conteúdo mineral (análise quantitativa), supondo que a análise quantitativa não tenha apontado diferenças devido ao fato de existir grande quantidade de tecido neoformado, o qual ainda não está totalmente mineralizado. Ainda de acordo com este trabalho, talvez a duração do tratamento com ultrassom de baixa intensidade não tenha sido suficiente para possibilitar a total mineralização das regiões estimuladas, o que não possibilitou alterações de forma quantitativa.

O estudo realizado por Warden *et al.* (2006) investigou o efeito do ultrassom sobre o reparo ósseo de fratura em fêmur de ratos, em 2 grupos experimentais de 25 dias e 40 dias, submetidos a osteotomia e tratados com ultrassom durante 16 e

27 dias respectivamente; o tratamento tinha duração de 20 minutos por sessão, era realizado 5 vezes por semana somente em um dos fêmures, o contralateral serviu como controle. O grupo experimental de 25 dias não apresentou diferenças significativas, entre os fêmures tratados e controle, nas análises densitométricas e biomecânicas; diferentemente do grupo experimental de 40 dias, que teve um aumento de 14,3% no CMO e 25,8% na Área Óssea ao comparar os fêmures tratados com os controles (Análise Densitométrica – DEXA). Estes achados reforçam a justificativa, de que em nosso trabalho não foi encontrada influência do ultrassom de baixa intensidade, devido ao pequeno número de sessões de tratamento.

Compartilhamos que em nosso trabalho, no momento da dissecação das tíbias observou-se uma diminuição da coloração na musculatura que envolvia a tíbia tratada, comparado com a da tíbia controle, sugestiva de necrose. Este dado sugere a necessidade da realização de um estudo direcionado à obtenção do efeito secundário do ultrassom pulsado de baixa intensidade, frequência de 1 MHz, ciclo de trabalho 1:4, 30mW/cm<sup>2</sup>, na musculatura adjacente à região óssea tratada.

## CONCLUSÃO

Os resultados não demonstraram diferenças significativas, na variável estudada, ao comparar as tíbias tratadas com as controle de cada grupo. A literatura relata uma aceleração da formação do calo ósseo pelo ultrassom, mas, nosso trabalho não evidenciou este fato, podendo ser justificado pelo menor tempo de tratamento com relação aos trabalhos encontrados na literatura, assim como, pelo tipo de variável analisada em nosso estudo.

## REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE SOUZA, A. F.; TUDURY, E. A. Displasia coxofemoral: diagnóstico clínico e radiográfico – revisão. **Revista Clínica Veterinária**, v.8, n.47, p 54-66, 2003.

AZUMA, Y.; ITO, M.; HARADA, Y.; TAKAGI, H.; OHTA, T.; JINGUSHI, S. *Low-intensity pulsed ultrasound accelerates rat femoral fracture healing by acting on the various cellular reactions in the fracture callus.* **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 16, n. 4, p. 671-680, 2001.

CARVALHO, D. C. L.; CLIQUET JR, A. *Low intensity ultrasound effects over osteopenic female rats bones. Acta Ortopédica Brasileira*, v.11, n.1, p.17-24, 2003.

DOBLARÉ, M.; GARCÍA, J. M.; GÓMEZ, M. J. *Modeling bone tissue fracture and healing: a review. Engineering Fracture Mechanics*, v. 17, p. 1809-1840, 2004.

GEBAUER, G. P.; LIN, S. S.; BEAM, H. A.; VIEIRA, P.; PARSONS, J. R. *Low-intensity pulsed ultrasound increases the fracture callus strength in diabetic BB Wistar rat but does not affect cellular proliferation. Journal Orthopaedic Research*, v. 20, n. 3, p. 587-592, 2002.

HOLICK, M. F. *Perspective on the impact of weightlessness on calcium and bone metabolism. Bone*, v.22, p.105-111, 1998.

LIRANI, A. P. R. **Estudo comparativo dos efeitos do Ultra-som e do Laser de Baixa Potência no reparo ósseo de tíbia de rato.** 2004. 94f. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.

LOUZADA, M. J. Q.; PELÁ, C. A.; BELANGERO, W. D.; SANTOS-PINTO, R. Metodologia para avaliação de densidade em imagens radiográficas. **Revista Brasileira de Engenharia/Caderno de Engenharia Biomédica**, v.14, n.2, p.37-47, 1998.

MARQUES, T. M. **Avaliação da densitometria óssea em fêmur de rato após consumo de álcool e fluoreto de sódio.** 2008. 45f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2008.

MOREY-HOLTON, E. R.; GLOBUS, R. K. *Hindlimb unloading of growing rats: a model for predicting skeletal changes during space flight. Bone*, v.22, n.5, p.83-88, 1998.

NARUSE, K.; MIKUNI-TAKAGAKI, Y.; AZUMA, Y.; ITO M. *Anabolic response of mouse bone-marrow-derived stromal cell clone ST2 cells to low-intensity pulsed ultrasound. Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.268, p.216-20, 2000.

NIH Consensus Statement, n. 111. *Osteoporosis prevention, diagnosis and therapy*, v. 17, p. 1-36, 2000.

RIGSS, B. L.; MELTON, L. J. *The worldwide problem of osteoporosis: insight afforded by epidemiology. Bone*, v. 17, p.505-11, 1995;

RISO, N. D. M. **Influência do laser terapêutico no reparo de defeito ósseo de ratos submetidos à ausência de carga: análise densitométrica.** 2008. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Faculdade de Odontologia – UNESP, Câmpus de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2008.

SALZEDAS, L. M. P.; LOUZADA, M. J. Q.; OLIVEIRA FILHO, A. B. *Radiopacity of restorative materials using digital images. Journal of Applied Oral Science*, v. 14, n. 2, p.147-52, 2006.

SHIMANO, M. M. **Microestruturas e propriedades mecânicas de ossos cortical e trabecular de ratos após período de suspensão pela cauda e exercitação.** 2006. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

SILVA, A. V.; VOLPON, J. B. Modelo de simulação de microgravidade e seu efeito em algumas propriedades mecânicas do osso do rato. **Acta Ortopédica Brasileira.** São Paulo, v.12, n.1, p.22-31, 2004.

TAKIKAWA, S.; MATSUI, N.; KOKUBU, T.; TSUNODA, M.; FUJIOKA, H.; MIZUNO, K.; AZUMA, Y. *Low-intensity pulsed ultrasound initiates bone healing in rat nonunion fracture model. Journal of Ultrasound in Medicine*, v. 20, p. 197-205, 2001.

VICENTINI, C. R.; ROSA, R. A. C.; CIARLINI, L. D. R. P.; SANTOS, P. H.; LOUZADA, M. J. Q. Análise biomecânica em fêmures de ratos submetidos a ausência de carga e atividade física em esteira. **Veterinária e Zootecnia**, Botucatu, v.14, n.1, p. 62-71, 2007.

WARDEN, S. J.; FUCHS, R. K.; KESSLER, C. K.; AVIN, K. G.; CARDINAL, R. E.; STEWART, R. L. *Ultrasound Produced by a Conventional Therapeutic Ultrasound Unit Accelerates Fracture Repair. Physical Therapy*, v. 86, n. 8, p. 1118-1127, 2006.