

Ana Flávia Calmon Daltro



Efeito das ondas mecânicas
ultrassônicas vibratórias na regeneração
de defeito ósseo crítico

Salvador
2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM PROCESSOS INTERATIVOS
DOS ÓRGÃOS E SISTEMAS



ANA FLÁVIA CALMON DALTRO

EFEITO DAS ONDAS MECÂNICAS ULTRASSÔNICAS
VIBRATÓRIAS NA REGENERAÇÃO DE DEFEITO ÓSSEO CRÍTICO

Salvador
2018

ANA FLÁVIA CALMON DALTRO

**EFEITO DAS ONDAS MECÂNICAS ULTRASSÔNICAS
VIBRATÓRIAS NA REGENERAÇÃO DE DEFEITO ÓSSEO CRÍTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fabiana Paim Rosa

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Isabela Cerqueira Barreto

Salvador

2018

Ficha catalográfica: Keite Birne de Lira CRB-5/1953

Daltro, Ana Flávia Calmon

Efeitos das ondas mecânicas ultrassônicas vibratórias na regeneração de defeito ósseo crítico./ [Manuscrito]. Ana Flávia Calmon Daltro.- Salvador, 2018.

64f. : il.

Orientador: Profa. Dra. Fabiana Paim Rosa.

Co-orientadora: Profa. Dra. Isabela Cerqueira Barreto.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, Salvador, 2018.

1. Osso. 2. Regeneração Óssea. 3. Ultrassom. 4. Terapia por Ultrassom. I. Rosa, Fabiana Paim. II. Barreto, Isabela Cerqueira. III. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciência da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas. IV. Título

CDD – 611.718 21. ed.

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE



TERMO DE APROVAÇÃO

DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO

ANA FLÁVIA CALMON DALTRO

Efeitos das Ondas Mecânicas Vibratórias na Regeneração de Defeito Ósseo Crítico

Salvador, Bahia, 22 de fevereiro de 2018

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof.^a Dr.^a Fabiana Paim Rosa – Universidade Federal da Bahia-

Prof.^a Dr.^a Eliana dos Santos Câmara Pereira – Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Tarcísio Fulgêncio Alves da Silva – Universidade Pernambuco - UPE

A Deus, por me ter permitido realizar mais este sonho, por ter me concedido coragem, força, sabedoria, inteligência em mais uma etapa da minha vida.

À minha mãe Marta Calmon e à minha avó Edelzuita Pureza, por sempre terem me amado, apoiado, investido em mim e dividido comigo cada momento da minha vida, por terem sonhado comigo cada sonho e repartido cada conquista ao meu lado.

A Alberoni, meu eterno Namorado, por dividir comigo mais esta conquista. Juntos ingressamos e concluímos o mestrado, e este foi mais um sonho compartilhado. Obrigada por caminhar comigo, pelas orações, paciência, incansáveis palavras de incentivo, por compreender as ausências e partilhar os inúmeros momentos de estudos. Você foi meu grande apoio nesta caminhada. Palavras não conseguirão demonstrar a gratidão que tenho por tê-lo ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

À Prof.^a Dr.^a. Fabiana Paim Rosa, pela confiança, dedicação, orientação, conselhos. Obrigada pela oportunidade de convivência e de ter permitido que um pouco do seu brilho refletisse na minha jornada acadêmica.

À Prof.^a. Dr.^a. Isabela Cerqueira Barreto, pela grande amizade construída ao longo desses anos de convivência, pelos inúmeros conselhos, palavras otimistas, carinho, paciência, confiança e oportunidade de me ensinar a desenvolver a arte de ser professora.

A Renata Almeida, Iorrana Ribeiro e Anderson Cunha, amigos que levarei eternamente na memória, por terem sido fundamentais nesta jornada, por todos os momentos compartilhados juntos, principalmente pelos conselhos e colaboração na execução desta dissertação.

Aos colegas do Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais (LBTB), pelo acolhimento, amizade, palavras de incentivo e auxílio no desenvolvimento da pesquisa.

À Thayana Santos, pela colaboração no desenvolvimento desta pesquisa, principalmente no apoio durante as etapas cirúrgicas e coleta dos dados quantitativos.

Ao Instituto de Patologia Geral e Cutânea (IPAC), pelo apoio no processamento e na confecção das lâminas histológicas, em especial às técnicas Cristina e Elisângela.

Ao Prof. Dr. Aryon de Almeida Barbosa Júnior, pela prestatividade e auxílio na análise das lâminas histológicas.

À Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), por ter permitido o desenvolvimento dos procedimentos cirúrgicos.

Aos funcionários do Biotério Central da UEFS, Júnior e Orestes, pela prontidão e disposição no auxílio prestado durante a fase experimental.

Aos colegas da Pós-Graduação, pela amizade e apoio nesta jornada acadêmica, em especial a Michelli Novais, Fabiane Carrijo, Neide Lisboa, Nilo Barreto e Maria Eduarda Vilar.

Ao Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, pela oportunidade de aprendizado e capacitação.

Aos secretários da Pós-Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, Marcelo, Célia e Carlos, pela atenção, paciência e prontidão no atendimento às solicitações realizadas ao longo desses vinte e quatro meses.

À CAPES, pelo apoio financeiro que permitiu a execução deste trabalho.

*Eu reconheço que para Ti [Senhor] nada é impossível
E que nenhum dos Teus planos pode ser impedido.*

Jó 42: 2

DALTRO, Ana Flávia Calmon. **Efeito das ondas mecânicas ultrassônicas vibratórias na regeneração de defeito ósseo crítico.** 2018. 64 f., 17 il. Dissertação (Mestrado em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas) – Instituto de Ciências de Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador.

RESUMO

Introdução: O tecido ósseo pode sofrer lesões extensas e críticas que limitam o reparo e levam ao comprometimento da estrutura, função e estética, devido à formação de um tecido não funcional. Na tentativa de estimular a regeneração, podem-se utilizar recursos terapêuticos que emitem ondas mecânicas, como o ultrassom, cujos efeitos se baseiam nas propriedades biomecânicas do tecido ósseo. **Objetivo geral:** Analisar o efeito das ondas mecânicas vibratórias na regeneração de defeito ósseo crítico. **Objetivo específico:** Comparar o efeito de dois protocolos de diferentes tempos de exposição do ultrassom terapêutico na regeneração tecidual. **Materiais e métodos:** Foram utilizados 45 ratos, machos, distribuídos em três grupos: grupo ultrassom terapêutico cinco minutos (GUS 5); grupo ultrassom terapêutico dez minutos (GUS 10); e grupo controle (GC). Em todos os grupos, confeccionou-se um defeito ósseo crítico, com 8,5 mm de diâmetro, na região da calvária. O protocolo foi iniciado no primeiro dia do pós-operatório, no GUS 5 e no GUS 10, com ultrassom terapêutico na frequência de 1,0 MHz, modo pulsado, cinco vezes por semana, nos períodos de 15, 30 e 60 dias. **Resultados:** Dentre os grupos experimentais, houve maior neoformação de matriz osteoide no GUS 10, seguido do GUS 5, quando comparados com o GC, no qual a neoformação foi restrita à região da borda óssea. O ultrassom promoveu aumento na espessura da matriz conjuntiva, proliferação de capilares, alinhamento das fibras colágenas, redução do edema e do processo inflamatório, tendo sido mais significativo no tempo de 10 minutos. **Conclusão:** O ultrassom terapêutico estimulou o reparo do defeito ósseo crítico, e o maior tempo de exposição promoveu maior estímulo osteogênico.

Palavras-chave: Osso. Regeneração óssea. Ultrassom. Terapia por ultrassom.

DALTRO, Ana Flávia Calmon. **Effect of vibrational ultrasonic waves on the regeneration of critical bone defect**. 2018. 64 f., 17 il. Dissertação (Masters degree in Interactive Processes of Systems and Organs) – Health Science Institute, Federal University of Bahia, Salvador.

ABSTRACT

Introduction: Bone tissue can undergo extensive and critical lesions that hinder its healing and lead to structural, functional and aesthetic impairment due to the formation of non-functional tissue. In an attempt to stimulate regeneration, therapeutic resources that emit mechanical waves, such as ultrasound, can be used. Their effects are based on the biomechanical properties of the bone tissue. **Objective:** To analyze the effect of vibratory mechanical waves on the regeneration of a critical bone defect. **Specific Objective:** To compare the effect of two protocols of different times of therapeutic ultrasound exposure on tissue regeneration. **Materials and methods:** 45 male rats were used in three experimental groups: therapeutic ultrasound group five minutes (TUG 5); therapeutic ultrasound group 10 minutes (TUG 10); and control group (CG). In all groups, a critical bone defect of 8.5 mm diameter was created in the calvaria region. The protocol was initiated on the first post-surgery day, in both TUG 5 and 10. Therapeutic ultrasound was used at the frequency of 1.0 MHz, pulsed mode, five times a week, within periods of 15, 30 and 60 days. **Results:** Among the experimental groups, the highest volume of osteoid assembly in the 10 TUG, followed by the 5 TUG when compared to the GC, where it is neo-converted to restriction in the border region. The use of ultrasound promoted an increase in the thickness of the conjunctive matrix, proliferation of capillaries, alignment of the collagen fibers, reduction of edema and inflammatory process, being more significant in the time 10 minutes. **Conclusion:** Therapeutic ultrasound stimulated the repair of a critical bone defect, and the longer exposure time promoted greater osteogenic stimulation.

Keywords: Bone. Bone regeneration. Ultrasonics. Ultrasonic therapy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Tecido ósseo compacto e esponjoso e sua microestrutura	19
Figura 2	Diferenciação de osteoblasto maduro em osteócito maduro	20
Figura 3	Fotomicrografia de osteócitos com seus prolongamentos citoplasmáticos interconectados	21
Figura 4	Estrutura morfológica do osteoclasto e representação esquemática do processo de degradação da matriz óssea com liberação do produto por exocitose	22
Figura 5	Representação esquemática do mecanismo de remodelação óssea	23
Figura 6	Diferenciação e fusão dos precursores de osteoclastos até a ativação de osteoclastos, com influência do RANKL expresso pelos osteoblastos	25
Figura 7	Escala do espectro acústico do som	28
Figura 8	Representação esquemática do ciclo de compressão e rarefação da onda ultrassônica	29
Figura 9	Gráficos da onda acústica sinusoidal: (a) amplitude x distância; (b) amplitude x tempo	30
Figura 10	Penetração das ondas ultrassônicas de 1 e 3 MHz nos tecidos biológicos	31
Figura 11	Representação esquemática do efeito da interação da onda ultrassônica com os tecidos biológicos	33
Figura 12	Eventos que ocorrem em nível celular, a partir da emissão de ondas ultrassônicas até a expressão de genes osteogênicos	36
Figura 13	Etapa do procedimento cirúrgico. Remoção do tecido subcutâneo, dos músculos e marcação do defeito (A); remoção do fragmento ósseo (B)	44
Figura 14	Utilização do ultrassom terapêutico	45
Figura 15	GUS 5 - Fotomicrografia do defeito ósseo crítico com presença de neoformação de matriz osteoide (*). (A) Aos 15 dias, presença de osteoblastos ativos e diversos espaços capilares (HE). (B) Alinhamento das fibras colágenas aos 30 dias (PIFG). (C) Redução do espessamento do tecido conjuntivo frouxo aos 60 dias (HE)	46

- Figura 16 GUS 10 - Fotomicrografia da região do defeito ósseo crítico com presença de neoformação de matriz osteoide (*). **(A)** Presença de osteoblastos ativos e diversos espaços capilares aos 15 dias (HE). **(B)** Organização das fibras colágenas em paralelo aos 30 dias (PIFG). **(C)** Neoformação de matriz osteoide em direção centrípeta aos 60 dias (HE) 47
- Figura 17 GC - Fotomicrografia da região do defeito ósseo crítico com presença de neoformação de matriz osteoide (*). **(A)** Osteoblastos ativos e poucos espaços capilares aos 15 dias (HE). **(B)** Preenchimento do defeito com delgado tecido conjuntivo frouxo aos 30 dias (PIFG). **(C)** Neoformação de matriz osteoide restrita às bordas ósseas aos 60 dias (HE) 48

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

BMPs	Proteínas ósseas morfogenéticas
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
Cm	Centímetros
CONCEA	Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal
COX 2	Ciclo-oxigenase 2
DC-STAMP	Proteína transmembrana específica de células dendríticas
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetracético
ERA	Área efetiva de radiação
et al.	Et alii (e outros)
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
GC	Grupo controle
GUS 5	Grupo ultrassom terapêutico cinco minutos
GUS 10	Grupo ultrassom terapêutico dez minutos
HE	Hematoxilina-eosina
Hz	Hertz
ICS	Instituto de Ciências da Saúde
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-11	Interleucina 11
kg	Quilograma
kHz	Kilohertz
LIPUS	Ultrassom pulsado de baixa intensidade
M-CSF	Fator estimulador de colônia de macrófago
mg	Miligrama
MHz	Megahertz
mm	Milímetros
OC-STAMP	Proteína transmembrana estimulante de osteoclasto
OPG	Osteoprotegerina
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PIFG	<i>Picrosirius red</i>
PZT	Titanato zirconato de chumbo
RANK	Receptor do ativador do fator nuclear kappa- β

RANKL	Ligante do receptor do ativador do fator nuclear kappa- β
T	Período
TGF- β	Fator de crescimento transformante
TNF	Fator de necrose tumoral
TNFR	Receptores do fator de necrose tumoral
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UEFS	Universidade Estadual de Feira de Santana
UST	Ultrassom terapêutico
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial
W/cm ²	Watts/ centímetro quadrado
λ	Comprimento de onda
μm	Micrômetro
%	Porcentagem
®	Registrado

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	TECIDO ÓSSEO	18
2.1.1	Remodelação e reparo ósseo	23
2.1.2	Comportamento ósseo após cargas mecânicas	26
2.1.2.1	Mecanotransdução	27
2.1.2.2	Piezoelectricidade	27
2.2	ULTRASSOM	28
2.2.1	Ultrassom terapêutico no reparo ósseo	34
3	OBJETIVOS	37
3.1	OBJETIVO GERAL	38
3.2	OBJETIVO ESPECÍFICO	38
	ARTIGO	39
	INTRODUÇÃO	41
	MATERIAIS E MÉTODOS	42
	Protocolo de aplicação do ultrassom terapêutico	44
	RESULTADOS	46
	DISCUSSÃO	48
	CONCLUSÃO	50
	REFERÊNCIAS GERAIS	51
	APÊNDICE A – Etapas dos procedimentos cirúrgicos	60
	APÊNDICE B – Etapa da clivagem das amostras (calvárias)	61
	ANEXO A – Certificado de aprovação do CEUA	63
	ANEXO B – Folha de submissão do artigo a revista científica	64

1 Introdução Geral

Certas condições clínicas podem causar extensas lesões teciduais ósseas, como em doenças crônico-degenerativas, deficiências metabólicas, eventos traumáticos, complicações pós-operatórias de enxertos ósseos e cirurgias craniofaciais. Essas condições limitam e comprometem o processo fisiológico de regeneração óssea cujo resultado é o reparo tecidual, com formação de tecido conjuntivo fibroso. Tal situação caracteriza o defeito ósseo crítico que compromete a estrutura, a função e a estética, pode ocasionar redução da qualidade de vida dos indivíduos, impactar o desempenho das suas atividades de vida diária e laboral, com possíveis consequências psicológicas e econômicas. Nesse contexto, os profissionais envolvidos no processo de tratamento e de reabilitação desses pacientes encontram grande desafio ao eleger uma terapêutica eficaz para a promoção da regeneração óssea. Assim, a medicina regenerativa busca desenvolver melhores estratégias para o reparo, a regeneração ou a substituição dos tecidos lesionados.^[1]

O osso apresenta reações biológicas frente a um estímulo mecânico, como a mecanotransdução e a piezoelectricidade. A mecanotransdução é a transformação do estímulo mecânico, imposto ao tecido ósseo sob a forma de carga, em um sinal local perceptível às células que o compõem. Essa transformação potencializa a síntese de substâncias parácrinas, que são transmitidas às demais células, e estimula a neoformação óssea. A piezoelectricidade representa a conversão do estímulo produzido por uma carga mecânica em potencial elétrico, que será sinalizado às células do tecido ósseo, com produção de efeito osteogênico.^[2,3] Esses processos fisiológicos podem ser intensificados com a utilização de recursos físicos, como os mecânicos e os eletromagnéticos, para incrementar o reparo ósseo.

Dessa forma, o fisioterapeuta pode reabilitar pacientes com lesões ósseas por meio da utilização de equipamentos que emitam ondas mecânicas que atuarão como coadjuvante da regeneração óssea e da angiogênese. Além disso, essa terapia restabelece as forças de tensões biomecânicas para organizar as fibras de colágeno do segmento corporal lesionado.^[4] O uso precoce desses recursos auxilia na redução do risco de complicações no período pós-operatório e acelera o ganho de independência funcional, o que permite aos indivíduos a retomada de suas atividades de vida diária e laboral.

Entre os recursos fisioterapêuticos que emitem ondas mecânicas e geram vibração tecidual está o ultrassom terapêutico (UST). As ondas emitidas por esse equipamento se propagam pelos tecidos corporais e, ao atingir o tecido ósseo, promovem alterações micromecânicas que estimulam a sinalização celular e resultam no estímulo à remodelação e à neoformação óssea.

Diversos trabalhos científicos evidenciam o efeito do ultrassom terapêutico em modelo

animal^[5-7] com o objetivo de promover a consolidação de fraturas, em razão do seu potencial osteogênico, além de ser uma terapia não invasiva.^[8] Não há, porém, um consenso na literatura em relação aos parâmetros empregados nesse equipamento, principalmente quanto ao tempo de aplicação capaz de estimular a neoformação óssea. Dessa forma, a inovação proposta por este estudo consiste em analisar o efeito das ondas mecânicas ultrassônicas vibratórias na regeneração de defeito ósseo crítico, com diferentes protocolos de tempo de exposição, devido à ausência de relato na literatura que avalie esse recurso nessa condição clínica.

Esta dissertação contém três sessões e se inicia com uma breve revisão de literatura em que se aborda a temática do tecido ósseo, se destacam as células que o constituem, aspectos da sua fisiologia e seu comportamento tecidual após sofrer estímulo por meio das ondas mecânicas vibratórias; em seguida, introduz o tema ultrassom, seus princípios biofísicos e os efeitos que promove ao tecido ósseo. A segunda sessão apresenta os objetivos geral e específico da pesquisa. Por fim, a última sessão retrata, sob a forma de um artigo científico, o produto do experimento realizado.

2 Revisão de Literatura

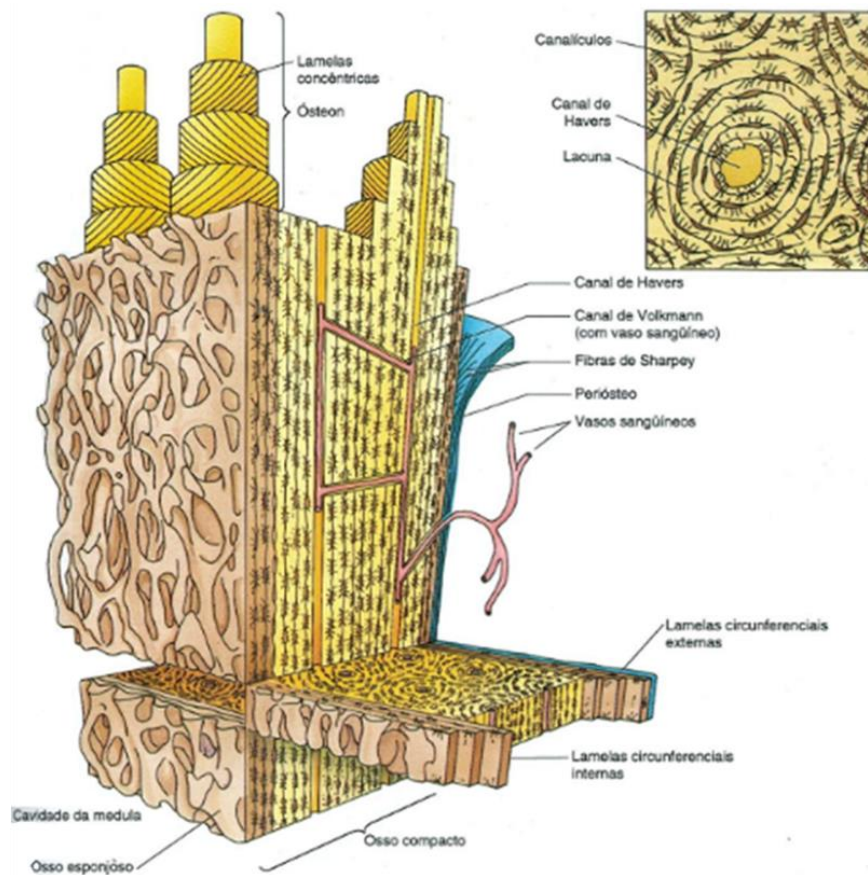
2.1 TECIDO ÓSSEO

O tecido ósseo é o arcabouço estrutural primário de sustentação e de proteção de órgãos vitais, como cérebro, coração e pulmões. Aloja e protege a medula óssea, é responsável pela produção das células do sangue, participa do sistema de alavanca para os músculos esqueléticos a ele fixados, multiplica a força desses músculos para realizar o movimento e constitui a base biomecânica para a locomoção.^[9,10]

O osso é um tecido conjuntivo especializado, cuja matriz extracelular é mineralizada e serve de reserva de minerais, sendo constituído por 30% de componente orgânico e 70% de componente inorgânico.^[11] A fração orgânica proporciona elasticidade ao tecido, permite absorção e dissipação da energia (tenacidade) que antecede a fratura. Esse componente é constituído por água, proteínas colagênicas, principalmente do tipo I, e por proteínas não colagênicas, como osteopontina, osteocalcina, osteonectina, sialoproteína óssea e osteoprogerina, que regulam a adesão e a atividade celular durante a formação e a reabsorção óssea e auxiliam a mineralização.^[9-13] O componente inorgânico é composto, principalmente, por íons de cálcio e de fosfato que formam cristais nanométricos de hidroxiapatita, o que confere propriedade de rigidez e dureza ao tecido ósseo.^[10,13]

As superfícies ósseas externa e interna são revestidas por duas membranas de tecido conjuntivo. Na superfície externa, o tecido conjuntivo é denso modelado e se denomina periósteo e, na superfície interna, é especializado e denominado endósteo. Macroscopicamente, o osso apresenta uma camada compacta constituída por um tecido mais denso localizado na sua periferia, responsável pela maioria das propriedades mecânicas, e uma camada esponjosa ou trabecular, presente na região central que reveste a cavidade medular e se projeta em direção ao osso compacto. A microestrutura do tecido ósseo compacto é constituída pelo sistema de Havers ou *osteon*, que se apresenta em forma de cilindro, contendo vários cilindros no seu interior, dispostos de modo longitudinal.^[10,11,14] Cada sistema de Havers é delimitado por uma camada hipermineralizada, denominada linha cimentante, e é constituído por até 20 lamelas concêntricas em torno do vaso sanguíneo; perpendicular a cada sistema, há uma comunicação, o chamado canal de Volkmann.^[10,14,15] (FIGURA 1).

Figura 1 - Tecido ósseo compacto e esponjoso e sua microestrutura



Fonte: Gartner e Hiatt.^[16]

Compõem o tecido ósseo as células osteoprogenitoras, os osteoblastos, os osteócitos e os osteoclastos. As primeiras são responsáveis pela síntese, os osteoblastos e os osteócitos pela manutenção, e as últimas pela reabsorção óssea. Essas células se derivam de linhagens celulares distintas: as osteoprogenitoras, os osteoblastos e os osteócitos possuem origem mesenquimal e são provenientes da medula óssea; os osteoclastos advêm da linhagem mononuclear fagocítica.^[17]

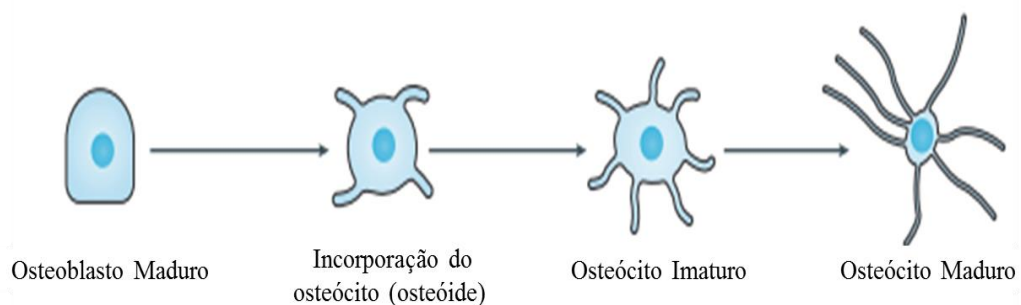
As células osteoprogenitoras, que se localizam no endóstio e no perióstio, têm a capacidade de realizar mitose e possuem potencial para diferenciar-se em osteoblastos.

Os osteoblastos apresentam, em sua morfologia, pequenos prolongamentos na extensão da sua membrana citoplasmática que permitem a comunicação com os osteoblastos adjacentes. São responsáveis pela síntese da matriz orgânica, pelo controle da mineralização

do tecido ósseo e possuem alta capacidade para realizar migração, após sinalização. Essas células contêm receptores para o hormônio da paratireoide que, após sua ligação, por meio de sinalização celular, induz a diferenciação dos pré-osteoclastos em osteoclastos que recrutam mais osteoclastos e influenciam o metabolismo ósseo por meio da regulação da reabsorção óssea.^[11] Conforme a necessidade metabólica, alguns osteoblastos são sinalizados e sofrem alteração na expressão gênica, geram alterações morfológica e funcional e diferenciam-se em osteócitos. Entretanto, esse mecanismo regulatório que diferencia osteoblastos em osteócitos ainda não está completamente elucidado.^[18]

Os osteócitos são as células mais abundantes do tecido ósseo, correspondem a mais de 95% das células desse tecido e apresentam baixa atividade metabólica, porém, não são inertes. São fundamentais para a manutenção da homeostase óssea, além de ser a principal fonte de fatores parácrinos, como, por exemplo, o fator de crescimento de fibroblastos.^[17-19] Além da manutenção da densidade mineral óssea, os osteócitos participam da remodelação óssea e da mecanotransdução ou função mecanossensorial.^[19] Essas células estão aprisionadas em lacunas, no interior da matriz óssea mineralizada, e se dispõem em lamelas (FIGURA 1). A estrutura celular dos osteócitos apresenta projeções citoplasmáticas que lhe conferem morfologia semelhante à de uma estrela (FIGURA 2).

Figura 2 - Diferenciação de osteoblasto maduro em osteócito maduro



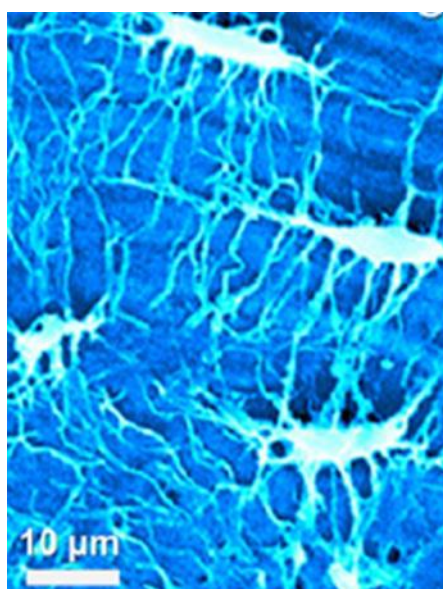
Fonte: Plotkin e Bellido^[18], com modificações.

Os osteócitos ficam alojados no interior dos canalículos e constituem uma rede complexa lacunocanalicular que conecta toda a extensão do osso para favorecer a troca metabólica e de informações entre osteócitos adjacentes, osteoblastos, células de revestimento ósseo presentes no endóstio e no perióstio e células endoteliais (FIGURA 3). Essa rede contém o fluido canalicular, que garante rápida condução de oxigênio, nutrientes, moléculas

sinalizadoras, metabólitos, além de mobilizar e transportar cálcio e outros íons da matriz. Além disso, o fluido canalicular pode ser movimentado após o tecido ósseo sofrer uma deformação, o que contribui para produção do estímulo mecânico em nível celular. ^{[10,11,14,17,20-}

^{22]} A união entre cada projeção citoplasmática ocorre por meio das junções *gap*, que são canais intramembranosos formados por proteínas conexinas, junções essas que participam da captação dos sinais bioquímicos e mecânicos que atingem o osso. ^[18,20,23]

Figura 3 - Fotomicrografia dos osteócitos com seus prolongamentos citoplasmáticos interconectados



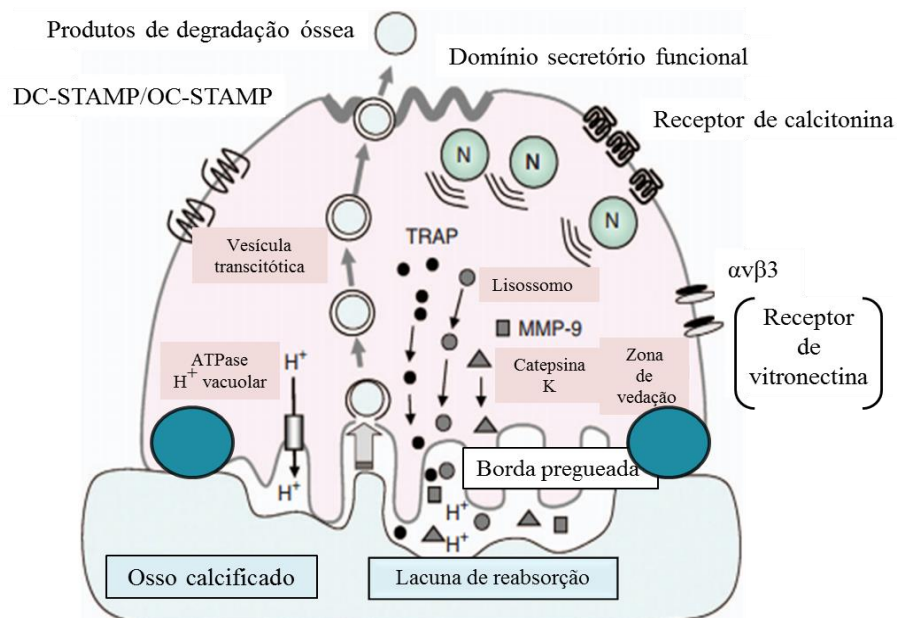
Fonte: Milovanovic et al. ^[15], com modificações.

Os osteoclastos, células gigantes multinucleadas, formadas a partir da fusão de macrófagos, unidos por meio da proteína transmembrana específica de células dendríticas (DC-STAMP) e da proteína transmembrana estimulante de osteoclastos (OC-STAMP), apresentam quatro regiões distintas: zona basal, borda pregueada, zona clara e zona vesicular (FIGURA 4). A zona basal corresponde à região que contém a maior quantidade de organelas. A borda pregueada ou borda em escova apresenta ondulações que estão em contato com o tecido ósseo; seu ambiente ácido favorece a degradação de minerais e é responsável por promover a reabsorção da matriz óssea. A zona clara ou zona de adesão não contém organelas, porém, possui filamentos de actina que permitem a adesão dos osteoclastos à matriz óssea. Por fim, a zona vesicular está localizada em região intermediária, entre a zona basal e a borda

pregueada.^[24]

Os osteoclastos ativos realizam a desmineralização da fração inorgânica e reabsorvem o componente orgânico. Durante a atividade de reabsorção, essas células ocupam a região denominada lacuna de Howship, que se caracteriza pelas escavações na superfície óssea. [10,11,14,22,24] Essa região apresenta pH ácido em razão da presença de enzimas que favorecem a dissolução do componente inorgânico, representado pelos cristais de hidroxiapatita, ao passo que o componente orgânico é degradado por meio da ação das hidrolases lisossômicas, metaloproteinases e catepsinas, o que ocorre após a descalcificação da matriz óssea. O produto da degradação é endocitado pelo osteoclasto, na porção central da borda em escova, por meio de vesículas e, por fim, é liberado nos capilares adjacentes. O estado de atividade do osteoclasto se caracteriza pela presença da zona clara e da borda em escova, regiões responsáveis, respectivamente, pela adesão e pela reabsorção óssea. Após a reabsorção, os osteoclastos podem sofrer destinos distintos, seja a inativação, seja a migração para outra região na qual serão reabsorvidos.^[17]

Figura 4 - Estrutura morfológica do osteoclasto e representação esquemática do processo de degradação da matriz óssea com liberação do produto por exocitose

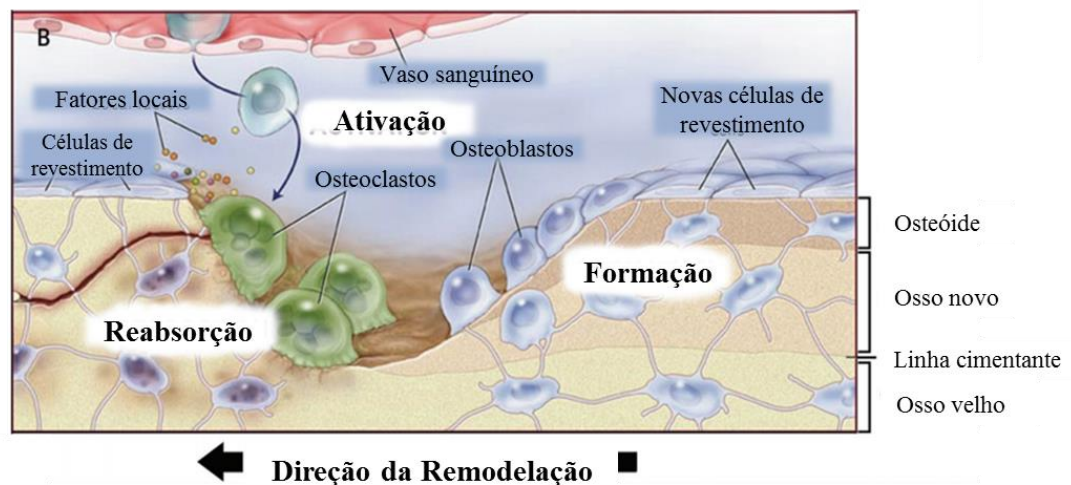


Fonte: Takahashi, Udagawa e Suda.^[24]

2.1.1 Remodelação e reparo ósseo

O osso apresenta-se em constante remodelação, o que permite renovação e manutenção de sua densidade mineral em consequência do equilíbrio entre as atividades de reabsorção e de síntese, mecanismos esses regulados pelo sistema imune.^[17] Nesse processo, a fração orgânica do tecido ósseo é continuamente renovada e serve de arcabouço durante a mineralização.^[13] O equilíbrio entre as atividades de reabsorção e de síntese são fundamentais para preservação da qualidade óssea, reparação de lesões da microarquitetura, manutenção da densidade mineral óssea e redução do risco de fratura. A remodelação é uma característica biológica que promove regeneração óssea espontânea, quando há lesão, e possibilita a reposição da porção tecidual perdida ou a substituição do tecido ósseo antigo por osso novo (FIGURA 5). Esse processo é regulado por fatores hormonais e locais, cujo mecanismo de reparo ocorre por meio de regeneração.^[13,25-27]

Figura 5 - Representação esquemática do mecanismo de remodelação óssea



Fonte: Warden, Davis e Fredericson^[28], com modificações.

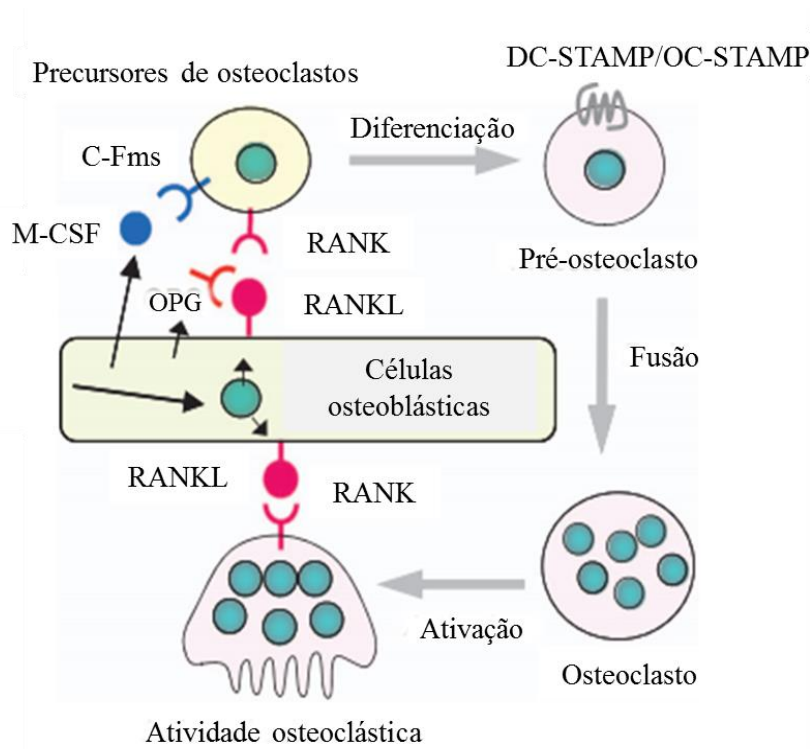
A remodelação envolve a remoção de porções do tecido ósseo pelos osteoclastos, que se originam a partir da diferenciação dos monócitos e macrófagos, após a sinalização bioquímica do fator estimulador de colônia de macrófago (M-CSF), do ligante do receptor do ativador do fator nuclear kappa- β (RANKL) e da osteopogrerina (OPG). O RANKL é uma

citocina da família do fator de necrose tumoral (TNF) expressa pelas células T ativadas e por osteoblastos e é considerada essencial para a indução da osteoclastogênese. O receptor do ativador do fator nuclear kappa- β (RANK), membro da superfamília dos receptores do fator de necrose tumoral (TNFR), é uma proteína transmembrana, presente nos monócitos, macrófagos, osteoclastos e nas células T e B. A OPG, membro da superfamília dos TNFR, é secretada pelos osteoblastos, pelas células osteoprogenitoras, células B e células dendríticas; é estimulada na presença de IL-1, IL-6, IL-11, TNF, estrogênio e fator de crescimento transformante (TGF- β), e é inibida pelo paratormônio.^[17,26]

A osteoclastogênese inicia-se a partir da ligação do M-CSF com o receptor do macrófago, que o induz a tornar-se precursor de osteoclasto em proliferação, o que resulta na expressão de RANK nessa célula. Isso se deve à presença dos receptores RANK e dos receptores para M-CSF na membrana plasmática dos precursores de osteoclastos. O RANKL liga-se ao RANK e estimula a fusão de outros macrófagos, por meio dos receptores DC-STAMP / OC-STAMP, que irá originar os osteoclastos multinucleados (FIGURA 6). O RANKL desempenha papel na diferenciação dos osteoclastos, promove aumento da atividade e da sobrevivência dessas células, em consequência de seu efeito antiapoptótico que gera a permanência da reabsorção óssea, mecanismo esse responsável por ativar ou aumentar a reabsorção óssea.^[26,29,30]

O RANK possui sítio de ligação para a OPG e o RANKL, que competem entre si. Após a ligação da OPG com o sítio de ligação do RANK no macrófago, há inibição da maturação e da ativação dos osteoclastos, o que suprime a capacidade de reabsorção da matriz óssea. O equilíbrio entre essas moléculas sinalizadoras regula o desenvolvimento e a ativação dos osteoclastos e o metabolismo ósseo. Outras citocinas, fatores e hormônios, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), a interleucina-1 (IL-1), o paratormônio e a calcitonina, estão envolvidos na diferenciação do precursor de osteoclastos e no controle da reabsorção óssea^[26,29,30] (FIGURA 6). Além disso, os osteoblastos podem produzir C-MSF e, após indução dos fatores estimuladores de reabsorção, expressar RANKL em sua membrana e estimular, dessa forma, a osteoclastogênese.^[24] (FIGURA 6).

Figura 6 - Diferenciação e fusão dos precursores de osteoclastos até a ativação de osteoclastos, com influência do RANKL expresso pelos osteoblastos



Fonte: Takahashi, Udagawa e Suda^[24], com modificações.

Durante a formação óssea, originada no desenvolvimento fetal ou em resposta a lesão óssea, ocorre o mecanismo de mitose e migração das células osteoprogenitoras e diferenciação dos osteoblastos por meio da osteoblastogênese. Esse processo é dependente da liberação de proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs), de citocinas e fatores de crescimento tais como o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), o fator de crescimento de fibroblastos (FCF), o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF).^[11,17,31]

Durante o reparo após uma fratura, há remoção dos restos celulares e de fragmentos ósseos pela ação de macrófagos. Simultaneamente, o periósteo e o endósteo iniciam intensa proliferação e proporcionam um tecido rico em células osteoprogenitoras, que envolvem a fratura e penetram entre as extremidades ósseas fraturadas. Em seguida, há formação do calo ósseo e substituição por osso secundário, com a restituição da forma e da força do osso original.^[32] A consolidação do reparo ósseo está, porém, condicionada a certos fatores, como amplo suprimento sanguíneo, estabilidade mecânica, presença de arcabouço tridimensional e tamanho do sítio lesionado.^[33]

Em condições clínicas que promovem a formação de fragmentos ósseos instáveis — os que decorrem de eventos traumáticos, de deficiências metabólicas, como, por exemplo, a osteoporose, e de procedimentos cirúrgicos em que há ressecção óssea —, o reparo ósseo pode não ocorrer espontaneamente. Nesses casos, a capacidade de reparo é limitada e, muitas vezes, há formação de tecido conjuntivo fibroso, que se perpetua ao longo da vida do indivíduo e caracteriza o defeito ósseo crítico.^[34,35] Tais condições clínicas podem comprometer a estrutura, a função e a estética^[36], além de impactar o desempenho e a realização das atividades de vida diárias.

Dessa forma, a fim de acelerar e potencializar a regeneração óssea, é possível utilizarem-se terapias, como, por exemplo, estimulação química com hormônios ou fatores de crescimento, enxerto ósseo e estimulação física por meio de recursos mecânicos e eletromagnéticos, que possuem efeitos baseados nas propriedades biomecânicas do tecido ósseo.^[3]

2.1.2 Comportamento ósseo após cargas mecânicas

O osso é dependente de estímulo hormonal e mecânico para a manutenção de sua arquitetura e funcionalidade. Existem diversas modalidades de estímulos mecânicos, tais como descarga de peso, campo eletromagnético, vibração, ultrassom de baixa intensidade, dentre outros. Esses estímulos, quando aplicados ao osso, promovem deformação tecidual que gera efeito anabólico, pela presença de células mecanossensoras, que são os osteoblastos e os osteócitos. Todavia, esse efeito pode ocorrer em uma região distante do local que sofreu maior deformação, por meio da ativação de uma cascata de reações bioquímicas, e pode ser propagado pelas junções *gap* e pelos canais iônicos, vez que permitem a troca de íons e de pequenas moléculas entre osteócitos e osteoblastos.^[20,37]

As principais células mecanossensoras são os osteócitos, pois amplificam e transmitem os estímulos para toda a estrutura óssea, por meio do sistema canalicular. Apesar de os osteoblastos serem células mecanossensíveis, acredita-se que são menos solicitados do que os osteócitos, visto que estão localizados no periósteo.^[19,20]

Os osteócitos dependem da estimulação mecânica para manter sua sobrevivência e viabilidade, de forma que a ausência da força mecânica pode gerar apoptose, que é mediada pela redução dos níveis de óxido nítrico ou prostaglandinas E2.^[38] Ademais, os osteócitos, além de ser mecanossensíveis, são fundamentais na detecção de microlesões do tecido ósseo e participam do processo de reparo, por meio da secreção de fatores osteoclastogênicos.^[15,38]

Segundo Gusmão e Belangero^[20], os osteócitos secretam proteínas osteogênicas semelhantes às excretadas pelos osteoblastos, após a captação do estímulo mecânico.

2.1.2.1 Mecanotransdução

Após o osso ser submetido a um estímulo mecânico, ocorre a sua deformação, em nível estrutural e celular, que produz estímulo local e será detectado e convertido em produto bioquímico pelos osteócitos e, em seguida, transmitido, por meio dos canalículos, às demais células que compõem esse tecido, o que origina a neoformação óssea, mecanismo esse denominado mecanotransdução. A deformação altera a regulação da divisão e da diferenciação celular, a morfogênese e a expressão genética. Ademais, o estímulo promove o aumento dos prolongamentos citoplasmáticos, a que se segue a ampliação da comunicação entre as células do tecido ósseo.^[2,3,18,38,39]

2.1.2.2 Piezoelectricidade

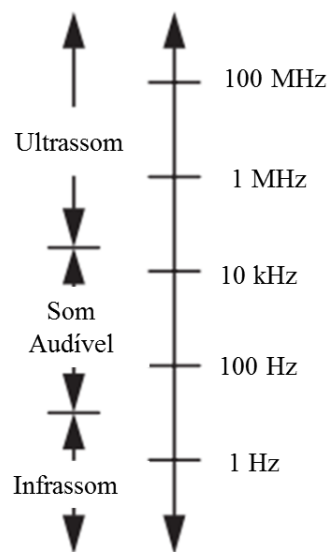
A piezoelectricidade é uma característica presente em alguns materiais, como moléculas e cristais, que podem sofrer polarização elétrica em resposta ao estímulo mecânico. O tecido ósseo apresenta efeito piezoelectrico consequente à deformação mecânica, em razão da estrutura das fibras de colágeno que, após a modificação espacial (compressão e tensão), sofrem polarização elétrica. Há dois tipos de efeito piezoelectrico. O efeito direto é oriundo da conversão da energia mecânica em elétrica, de modo que cargas compressivas geram potencial negativo (hiperpolarização), e cargas tensivas, potencial positivo (despolarização).^[3,40] Segundo Gusmão e Belangero^[20], a hiperpolarização é responsável pela estimulação da osteogênese, e a despolarização ocasiona sua reabsorção. No efeito inverso, após a aplicação do campo elétrico, um material piezoelectrico sofre deformação mecânica que estimula a atividade celular e promove o aumento do aporte de nutrientes e metabólitos.^[3,40,41]

Em vista das características do tecido ósseo ante um estímulo mecânico, como a mecanotransdução e a piezoelectricidade, é possível utilizarem-se recursos mecânicos na reabilitação fisioterapêutica, como, por exemplo, o ultrassom terapêutico, a fim de auxiliar os mecanismos de remodelação e de reparo ósseo.^[3,40,41]

2.2 ULTRASSOM

O ultrassom é uma forma de energia mecânica que se propaga com onda de alta pressão acústica e emite frequência superior ao limite da audição humana, que é de aproximadamente 20.000 Hz ou 20 kHz^[39,42,43] (FIGURA 7).

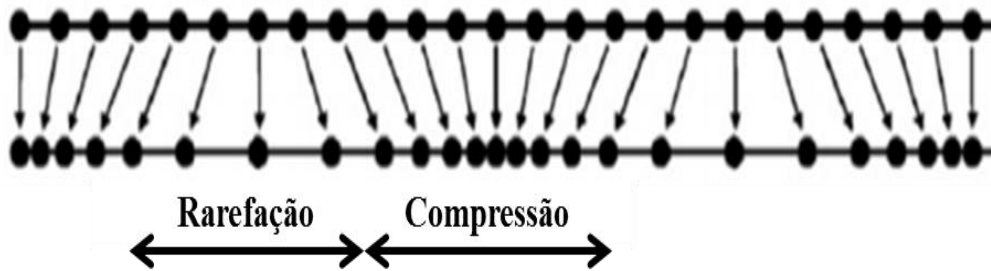
Figura 7 - Escala do espectro acústico do som



Fonte: O'Brien^[44], com modificações.

A energia propagada pela onda ultrassônica promove os movimentos de aproximação e afastamento molecular, conhecidos, respectivamente, como compressão e rarefação (FIGURA 8), movimentos esses que caracterizam a onda ultrassônica como mecânica ou de propagação mecânica.^[44]

Figura 8 - Representação esquemática do ciclo de compressão e rarefação da onda ultrassônica

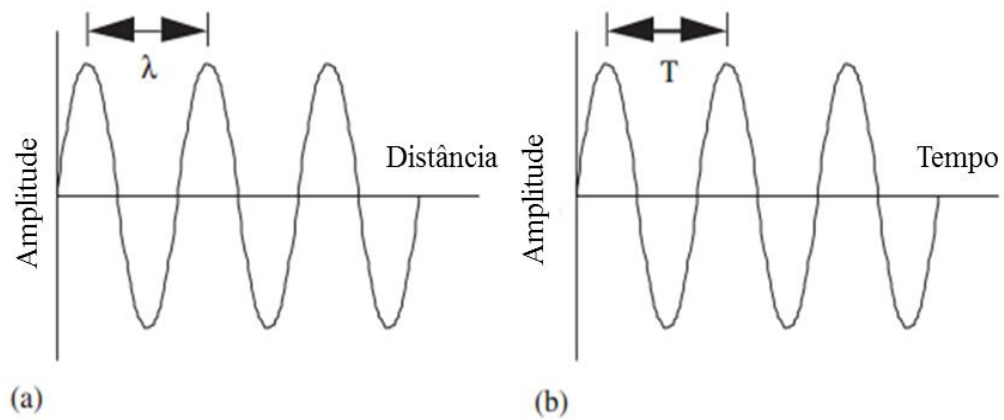


Fonte: Leighton^[45], com modificações.

São três as características biofísicas fundamentais na onda ultrassônica: frequência, comprimento e velocidade. A frequência corresponde ao número de vezes em que a partícula completa um ciclo de compressão e de rarefação durante um segundo; o comprimento de onda é a distância entre dois pontos equivalentes na forma de onda em um meio; e a velocidade é a distância com a qual a onda viaja através do meio em determinado tempo. Ademais, a energia da onda ultrassônica se caracteriza pela intensidade, que é expressa em $watts/cm^2$. Quando emitida, a energia atravessa uma unidade de área, que é perpendicular à onda em um determinado tempo.^[43,44]

A onda ultrassônica é emitida por um transmissor ou fonte que segue em direção ao receptor ou tecido-alvo como o muscular ou o ósseo, por exemplo, e estimula a movimentação molecular. Esse movimento é suscitado a partir da vibração sinusoidal da energia ultrassônica em função do tempo, e promove o deslocamento molecular para ambos os lados no espaço em torno da posição inicial ou posição de equilíbrio.^[43,44] Na representação gráfica da onda sinusoidal (FIGURA 9), as cristas altas e baixas representam os valores específicos da amplitude da onda ultrassônica, o que corresponde aos valores dos picos de compressão e de rarefação. O comprimento de onda (λ) é a distância de uma crista para a seguinte, e o tempo que leva para ocorrer um ciclo é considerado o período (T). O eixo horizontal da representação gráfica pode representar a distância (FIGURA 9 (a)) ou o tempo (FIGURA 9 (b)).

Figura 9 - Gráficos da onda acústica sinusoidal: (a) amplitude x distância; (b) amplitude x tempo



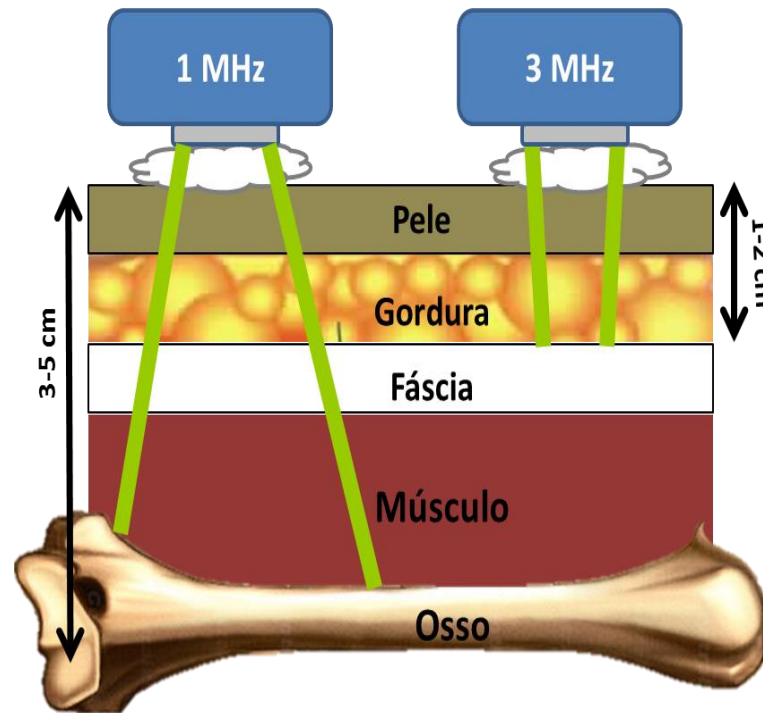
Fonte: O'Brien.^[44]

O ultrassom é uma modalidade física amplamente utilizada nas áreas biomédicas da medicina e da fisioterapia, e seu uso deve ser determinado pela frequência e pela intensidade de que dispõem os equipamentos.

Na medicina, o ultrassom é empregado para realizar diagnósticos, tratamentos e procedimentos cirúrgicos. Todavia, dentre essas modalidades, é largamente utilizado na prática clínica médica com o objetivo de auxiliar no diagnóstico clínico, pois integra os exames complementares de imagem que possibilitam a visualização morfológica dos tecidos moles e favorecem sua descrição clínica. As frequências utilizadas nos equipamentos de ultrassom para uso médico variam em torno de 1 a 15 MHz, e as intensidades, entre 0,03 e 1 W/cm².^[44,46-49]

Na prática clínica fisioterapêutica, a utilização do ultrassom tem a finalidade de auxiliar na reabilitação de tecidos lesionados, de modo a acelerar e potencializar sua regeneração. O ultrassom terapêutico (UST) apresenta frequências de 1 e 3 MHz e intensidades que variam de 0,01 a 3 W/cm², frequências essas de que pode dispor um mesmo aparelho ou não.^[44,46-49] A frequência de 1 MHz atinge tecidos profundos, de 3 a 5 cm, e é utilizada em ortopedia para tratar distúrbios musculoesqueléticos; por outro lado, a frequência de 3 MHz penetra tecidos superficiais, de 1 a 2 cm, e é amplamente empregada em tratamento dermatofuncional, para auxiliar na cicatrização de lesões da derme e da epiderme^[46,50-52] (FIGURA 10).

Figura 10 - Penetração das ondas ultrassônicas de 1 e 3 MHz nos tecidos biológicos



Fonte: Elaboração da autora.

O UST pode emitir onda pulsada ou contínua, que realizam ou não, respectivamente, a interrupção da energia propagada.^[46,50-52]

O equipamento de UST possui um transdutor que contém, no cabeçote, um cristal piezoelétrico, confeccionado com cerâmica de alta potência, como o titanato zirconato de chumbo (PZT), responsável por converter energia eletromagnética em energia mecânica. Esse cristal vibra na presença de campo elétrico e emite ondas mecânicas de alta frequência de pressão acústica que penetram na pele e se propagam pelos tecidos.^[53] Essas ondas geram vibrações moleculares, aceleram a velocidade de difusão de íons e a troca de fluidos através da membrana celular, o que favorece a difusão e promove o restabelecimento do metabolismo celular local.^[8,54]

Os equipamentos de UST são de baixa intensidade, ou seja, apresentam intensidade inferior a 3 W/cm^2 , e podem ser de baixa dose ($< 1 \text{ W/cm}^2$), de média dose ($1-2 \text{ W/cm}^2$) e de dose elevada ($2-3 \text{ W/cm}^2$). Nas últimas décadas, foi desenvolvido, nos Estados Unidos, o ultrassom pulsado de baixa intensidade, conhecido na literatura como LIPUS, que emite frequência de 1,5 MHz e intensidade com baixa dose equivalente a 30 mW/cm^2 . Supõe-se que essa modalidade de ultrassom promova o reparo de fratura óssea, iniba as respostas

inflamatórias e acelere a regeneração de tecidos moles.^[43]

A energia propagada no feixe da onda ultrassônica, ao penetrar os tecidos biológicos e com eles interagir, sofre absorção e dispersão. O fenômeno da absorção ocorre em nível molecular, onde a energia vibracional, proporcionada pelo feixe ultrassônico, é convertida em energia cinética molecular ou em movimentos aleatórios, movimentos esses que produzem calor, originando aquecimento tecidual. Os tecidos ricos em colágeno, como o osso cortical, o periósteo, as cicatrizes e os músculos fibróticos, são os que mais absorvem a energia ultrassônica. Dessa forma, o ultrassom é o recurso utilizado pelo fisioterapeuta para tratar ossos, tendões e fâscias, dentre outros.^[43,55-57] Destarte, a quantidade de absorção é dependente das características teciduais, bem como da vascularização e, ainda, da frequência emitida pelo ultrassom.^[58] Na dispersão, parte da energia do feixe da onda é dissipada e será absorvida em outra porção tecidual, diferente daquela em que houve a incidência do feixe da onda ultrassônica.^[43,55,57]

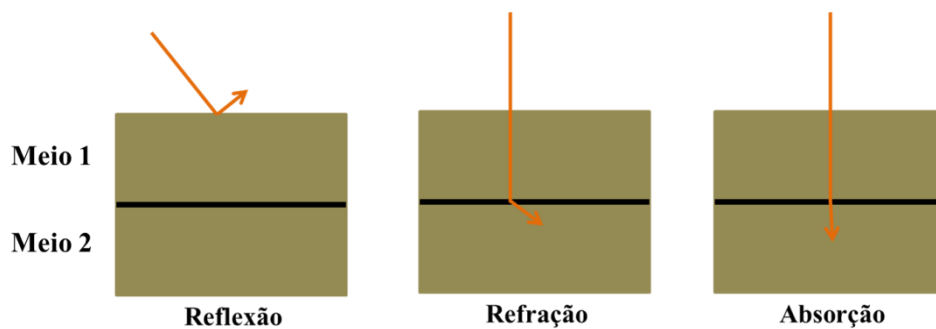
Ademais, o feixe da onda sofre atenuação, refração e reflexão.^[43,55,57] (FIGURA 11).

A atenuação representa a perda da intensidade da onda ultrassônica após a penetração nos tecidos e está diretamente relacionada com a frequência: se ela for de 1 MHz, apresentará redução de 50% da intensidade na profundidade de 4 cm, e de 10% aos 12 cm; na frequência de 3 MHz, há redução de 50% da intensidade na espessura de 1,5 cm e é mínima aos 5 cm.^[56,57]

A refração é o desvio da onda ultrassônica em ângulo diferente daquele do local em que houve a incidência e pode ser reduzida pelo posicionamento perpendicular do transdutor à superfície a ser tratada.^[57,59]

Reflexão é o retorno do feixe de ultrassom ao local de origem, após sua emissão. Ela pode variar de acordo com cada tecido, de modo que tecidos moles sofrem menos reflexão quando comparados, por exemplo, com a superfície óssea, que reflete cerca de 40% da onda ultrassônica. A reflexão é proveniente da diferença de impedância acústica, ou seja, da resistência acústica existente entre dois meios, como ocorre entre o ar e o tecido cutâneo, que apresenta alta impedância. Assim sendo, para reduzir a diferença da resistência desses dois meios, é fundamental utilizar-se um meio acoplador, como o gel hidrossolúvel.^[56-58] Entretanto, em regiões anatômicas irregulares, não é possível realizar-se o acoplamento diretamente com o transdutor; nesses casos, a terapia pode ser executada submergindo-se a região e o transdutor na água, o que evita a formação de bolhas instáveis.^[60]

Figura 11- Representação esquemática do efeito da interação da onda ultrassônica com os tecidos biológicos



Fonte: Elaboração da autora.

Os efeitos do ultrassom podem ser térmicos e mecânicos ou não térmicos.

Os efeitos térmicos derivam-se da energia ultrassônica absorvida pelos tecidos, o que gera aquecimento tecidual causado pela emissão ininterrupta das ondas, e provoca aumento da extensibilidade das estruturas colagenosas, aumento da atividade metabólica tecidual e do fluxo sanguíneo, promoção do efeito analgésico, redução da rigidez articular e espasmo muscular. Esse aquecimento é causado pelas diferentes densidades de cada tecido que recebe a onda ultrassônica.^[55,61-64]

Os efeitos mecânicos ou não térmicos são descritos na literatura como uma combinação de micromassagem, fluxo acústico e cavitação.^[43,55] A micromassagem é o efeito da vibração molecular quando a onda sonora transita pelo meio e pode afetar as trocas dos fluidos e a mobilidade tecidual. O fluxo acústico é definido como a emulsão de pequenos fluidos perto de uma estrutura vibratória que pode alterar as taxas de difusão e a permeabilidade da membrana, o que leva à modificação da síntese proteica e de secreções celulares. A cavitação é a formação de pequenas bolhas de gás nos tecidos ou fluidos, decorrente da vibração ultrassônica e da agitação e pode apresentar-se sob duas formas. A forma estável ocorre em doses terapêuticas, ou seja, apresenta efeito benéfico que pode gerar modificação celular e induzir alteração no gradiente de concentração, afetar a difusão de íons e de moléculas e alterar as concentrações dos íons de cálcio e de potássio das células expostas às ondas ultrassônicas. A cavitação instável produz efeito terapêutico indesejado, pois promove a necrose tecidual instantânea e o rompimento das bolhas de gás, o que libera alta quantidade de energia.^[43,55]

O efeito não térmico é proveniente do feixe de ultrassom pulsado, quando ocorre

intervalo terapêutico, o que não permite o aquecimento tecidual como se dá com o efeito térmico. Durante o efeito não térmico, há estímulo à proliferação de osteoblastos e à neoformação óssea, estímulo e síntese de fatores angiogênicos, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento básico de fibroblastos (FGF) e interleucina-8 (IL-8). A propagação do feixe de ultrassom pulsado promove estresse mecânico que gera sucessivos eventos e sinais elétricos que estimulam o metabolismo ósseo.^[42,61,62,64] Segundo Reher, Harris, Whiteman, Hai e Meghji^[42], prostaglandinas e óxido nítrico são necessários para a neoformação e a remodelação óssea, e sua produção é induzida pelo estresse mecânico. Outro efeito do ultrassom descrito na literatura é o químico, que promove aceleração da atividade enzimática, aumento da permeabilidade da membrana, elevação da respiração e oxidação celular.^[61,62]

Os parâmetros utilizados no UST são fundamentais para determinar-se o resultado terapêutico. Dessa forma, é essencial que o fisioterapeuta tenha conhecimento da dosimetria a ser empregada em cada protocolo, por ser fundamental eleger-se a dosimetria ideal, assim como o modo de emissão, a frequência, a intensidade e o tempo.^[51]

2.2.1 O ultrassom terapêutico no reparo ósseo

O UST é utilizado amplamente na prática clínica fisioterapêutica com o objetivo de auxiliar o reparo tecidual do sistema musculoesquelético, tais como consolidação de fraturas e lesões musculares, ligamentares, tendinosas e nervosas.^[51]

No tecido ósseo, a resposta que se segue à exposição às ondas ultrassônicas é similar àquela sob carga mecânica fisiológica, como, por exemplo, suporte do próprio corpo, deambulação e corrida.^[39] A interação das ondas ultrassônicas com o tecido ósseo promove deformações micromecânicas que estimulam osteócitos e células mesenquimais e gera eventos bioquímicos em nível celular, que pode iniciar ou acelerar a neoformação óssea.^[62,65-69]

As propriedades biomecânicas do tecido ósseo são a base fisiológica para o uso do ultrassom. Quando de baixa intensidade, o UST acelera o reparo ósseo, visto que promove a aceleração do metabolismo e a redução do processo inflamatório, com ampliação da síntese de colágeno. Além disso, aumenta a atividade osteoblástica, estimula a produção de matriz celular e de fatores de crescimento que participam da consolidação de fraturas, amplia a extensibilidade das fibras de colágeno, reduz a dor e a rigidez articular.^[49, 51,70]

Em estudo realizado por Acar et al.^[7], avaliou-se a eficácia do ultrassom para

promover a neoformação óssea, após confecção de defeito ósseo não crítico, de 6 mm, em calvária de coelhos. A terapia ultrassônica teve início no segundo dia do pós-operatório, com utilização de frequência de 1 MHz, intensidade de 30 mW/cm² e frequência de repetição de 1 kHz, por 20 minutos diários, no período de duas semanas, tendo-se concluído que o ultrassom se mostrou eficaz na regeneração óssea.

Angle, Sena, Sumner, Virkus e Viridi^[6] confeccionaram defeito ósseo de 5,0 mm em fêmur de ratos e observaram que, após o uso do ultrassom durante 20 minutos diários, combinado com proteína morfogenética óssea humana -2, houve incremento da angiogênese e neoformação óssea com presença de regiões mineralizadas.

Aonuma et al.^[71] realizaram estudo randomizado com 64 ratos, para avaliar o efeito do ultrassom após osteotomia na região proximal da tíbia. Os parâmetros utilizados na terapia ultrassônica consistiram em frequência de 1,5 MHz, frequência de repetição de 1,0 kHz, intensidade de 30 mW/cm², durante 20 minutos por dia. Após o período de duas e quatro semanas de terapia, constatou-se que o UST acelerou o reparo do osso esponjoso, contribuiu para o aumento da densidade mineral óssea e facilitou a mineralização do osso neoformado.

Albertin^[72] avaliou o efeito de quatro tempos de estimulação diária de ondas ultrassônicas em antebraço de coelhos, no período de 15 dias, e verificou que os tempos de 10, 20 e 40 minutos aumentaram a consolidação do calo ósseo.

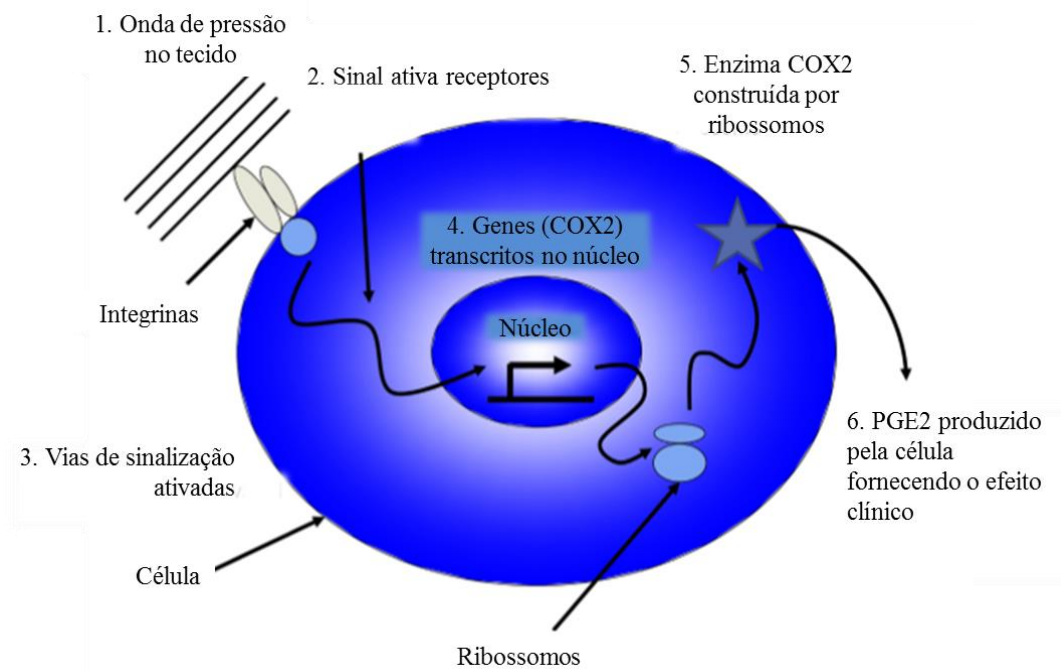
A terapia por UST é indicada em todas as fases do reparo, tanto na fase aguda, por acelerar a fase inflamatória e iniciar precocemente a fase proliferativa, quanto na fase crônica, por promover angiogênese, atividade dos fibroblastos e estímulo ao miofibroblasto na contração da ferida.^[58]

Pesquisa realizada por Azuma et al.^[73] buscou investigar se o reparo ósseo promovido pelo ultrassom era baseado na estimulação de uma reação celular específica. Para tanto, foi confeccionado defeito ósseo em fêmur de ratos, e utilizou-se o ultrassom com frequência de 1,5 MHz, frequência de repetição de 1,0 kHz, intensidade de 30 mW/cm², durante 20 minutos diários, no período de 25 dias, o que permitiu concluir que o ultrassom acelerou a cicatrização tecidual e atuou em diversas reações celulares no processo de reparo.

Apesar de a literatura disponibilizar diversos estudos que comprovam o efeito do ultrassom terapêutico no reparo ósseo, ainda não estão elucidados todos os mecanismos de interação das ondas ultrassônicas com os tecidos biológicos.^[74,75] Entretanto, segundo Harrison, Lin, Pounder e Takagaki^[76], o mecanismo que pode explicar o estímulo osteogênico do ultrassom está relacionado com mecanorreceptores em nível celular. As ondas ultrassônicas atravessam os tecidos biológicos e geram sinal mecânico no local da lesão óssea.

Este sinal é detectado pelas integrinas e convertido em sinal bioquímico no meio intracelular, que gera reações em cascata com transcrição de genes no núcleo e transcrição para produção de ciclo-oxigenase 2 (COX 2). Supõe-se que a produção de prostaglandina E 2 (PGE 2) estimule o aumento da produção de COX 2, o que fomenta a expressão de genes osteogênicos (FIGURA 12), com neoformação e mineralização óssea do sítio lesionado.^[76]

Figura 12 - Eventos que ocorrem em nível celular, a partir da emissão de ondas ultrassônicas até a expressão de genes osteogênicos



Fonte: Harrison, Lin, Pounder e Takagaki^[76], com modificações.

3 Objetivos

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar o efeito das ondas mecânicas vibratórias na regeneração de defeito ósseo crítico.

3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Comparar o efeito de dois protocolos de diferentes tempos de exposição do ultrassom terapêutico na regeneração tecidual.

Análise comparativa do efeito de dois protocolos de ultrassom terapêutico para regeneração de defeito ósseo crítico

Comparative analysis of the effect of two therapeutic ultrasound protocols for regeneration of a critical bone defect

Ana Flávia Calmon Daltro¹; Isabela Cerqueira Barreto²; Renata dos Santos Almeida³; Iorrana Índira dos Anjos Ribeiro³; Aryon de Almeida Barbosa Jr⁴; Fabiana Paim Rosa⁵

¹Fisioterapeuta, Universidade Federal da Bahia; ²Doutora em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, Universidade Federal da Bahia; ³Mestre em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, Universidade Federal da Bahia; ⁴Doutor em Medicina, Fundação Oswaldo Cruz; ⁵Doutora em Odontologia, Universidade Federal da Bahia.

RESUMO

Introdução: Extensas lesões ósseas comprometem o reparo tecidual e levam a alterações estruturais e funcionais; nesse contexto, o ultrassom terapêutico pode ser utilizado para potencializar o reparo da região lesionada. **Objetivo:** Comparar o efeito de dois protocolos de ultrassom terapêutico com diferentes tempos de exposição para regeneração de defeito ósseo crítico. **Materiais e Métodos:** Foram utilizados 45 ratos, machos, distribuídos em três grupos: grupo ultrassom terapêutico cinco minutos (GUS 5); grupo ultrassom terapêutico dez minutos (GUS 10); e grupo controle (GC). Em todos os grupos, confeccionou-se um defeito ósseo crítico, com 8,5 mm de diâmetro, na região da calvária. O protocolo foi iniciado no primeiro dia do pós-operatório, no GUS 5 e no GUS 10, com ultrassom terapêutico na frequência de 1,0 MHz, modo pulsado, cinco vezes por semana, nos períodos de 15, 30 e 60 dias. **Resultados:** Dentre os grupos experimentais, houve maior neoformação de matriz osteoide no GUS 10, seguido do GUS 5 quando comparados ao GC, no qual a neoformação foi restrita à região de borda. O uso do ultrassom promoveu aumento na espessura da matriz conjuntiva, proliferação de capilares, alinhamento das fibras colágenas, redução do edema e do processo inflamatório, tendo sido mais significativo no tempo de 10 minutos. **Conclusão:** O ultrassom terapêutico estimulou o reparo do defeito ósseo crítico, e o maior tempo de exposição promoveu maior estímulo osteogênico.

Palavras-chave: Osso. Regeneração óssea. Ultrassom. Terapia por ultrassom.

¹Correspondente / Corresponding: Ana Flávia Calmon Daltro. Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia (ICS-UFBA). Av. Reitor Miguel Calmon s/n, Vale do Canela, Salvador, Bahia, Brasil. 1º andar, sala 100. CEP: 40.110-100. Tel: (+55) (71) 3382 - 8889. E-mail: flavia_afcd@hotmail.com

ABSTRACT

Introduction: Extensive bone lesions compromise tissue repair and lead to structural and functional alterations and, in this context, therapeutic ultrasound can be used to potential the repair of the injured region. **Objective:** To compare the effect of two protocols of different times of treatment of the therapeutic ultrasound in the regeneration of critical bone defect. **Materials and methods:** 45 male rats were distributed in three experimental groups: therapeutic ultrasound group five minutes (5 TUG); therapeutic ultrasound group ten minutes (10 TUG); and control group (CG). In all groups, a critical bone defect of 8.5 mm diameter was made in the calvaria region. The protocol was initiated on the first postoperative day, in GUS 5 and 10, with therapeutic ultrasound at the frequency of 1.0 MHz, pulsed mode, five times a week, at periods of 15, 30 and 60 days. **Results:** Among the experimental groups, the highest volume of osteoid assembly in the 10 TUG, followed by the 5 TUG when compared to the GC, where it is neo-converted to restriction in the border region. The use of ultrasound promoted an increase in the thickness of the conjunctive matrix, proliferation of capillaries, alignment of the collagen fibers, reduction of edema and inflammatory process, being more significant in the time 10 minutes. **Conclusion:** Therapeutic ultrasound stimulated the repair of a critical bone defect, and the longer exposure time promoted greater osteogenic stimulation.

Keywords: Bone. Bone regeneration. Ultrasonics. Ultrasonic therapy.

INTRODUÇÃO

O tecido ósseo se caracteriza por possuir propriedades de resistência e dureza decorrentes da combinação dos seus componentes orgânicos e inorgânicos. Apesar de tais propriedades, esse tecido pode sofrer lesões extensas, denominadas defeitos ósseos críticos, que comprometem a integridade estrutural e a fisiologia do reparo ósseo.^[17,77]

Os defeitos ósseos críticos são causados por condições clínicas como, por exemplo, traumas e procedimentos cirúrgicos em que há ressecção óssea que comprometem o processo fisiológico da regeneração óssea, cujo resultado é o reparo com formação de tecido conjuntivo fibroso.^[34,35] Esse tecido compromete a estrutura, a função e a estética^[36], pode ocasionar redução da qualidade de vida do indivíduo, impactar o desempenho das suas atividades de vida diária e laboral, com possíveis consequências psicológicas e econômicas. Nesse contexto, o fisioterapeuta, inserido na equipe multiprofissional, participa da reabilitação de indivíduos que apresentam esse quadro clínico.

Durante o processo de reabilitação, podem ser empregados recursos terapêuticos que emitem ondas mecânicas vibratórias, a fim de auxiliar o reparo e estimular a osteogênese.^[3]

Entre esses recursos, inclui-se o ultrassom terapêutico, utilizado há anos na prática clínica fisioterapêutica^[78], equipamento esse que emite ondas de alta frequência de pressão acústica que, ao interagir com os tecidos biológicos, promovem alterações micromecânicas. Essas alterações geram eventos bioquímicos capazes de acelerar a consolidação de fraturas, estimular o reparo de tecidos lesionados, como o tecido ósseo e o muscular, inibir respostas inflamatórias e participar do processo de modulação da dor.^[51,53,78,79]

A resposta tecidual e a eficácia dessa terapia têm estreita relação com os parâmetros selecionados antes de iniciar-se o tratamento. Assim, é de fundamental importância elegerem-se adequadamente a frequência, a intensidade, o modo de emissão da corrente, o tempo de aplicação e o meio acoplador indicados para cada lesão.^[51,78] A literatura disponibiliza uma diversidade de parâmetros, principalmente quanto ao tempo de exposição à onda ultrassônica, empregados no processo de cicatrização de fraturas ósseas.

Albertin^[72] confeccionou defeito ósseo de 2,0 cm em rádio de coelhos e estimulou a região com onda ultrassônica por 5, 10, 20 e 40 minutos, no período de 15 dias, tendo observado que os maiores tempos promoveram maior estímulo à consolidação óssea quando comparados com o tempo de 5 minutos. Entretanto, Pereira e outros^[77], após induzir fratura em tíbia de ratos e estimular a região com ultrassom por 10 minutos, no período de 13 dias, constatou que o protocolo utilizado não promoveu diferença estatística significativa entre o grupo no qual se realizou a terapia e o grupo controle, apesar do aumento da fosfatase alcalina e do diâmetro do tecido ósseo neoformado.

Azuma et al.^[73] realizaram fratura no fêmur de ratos e analisaram o efeito do ultrassom por 20 minutos diários, nos períodos de 8 e 24 dias, tendo concluído que o ultrassom acelerou a cicatrização independentemente do período de tratamento, com melhora na força de torção e aumento da neoformação óssea.

Diante da diversidade de protocolos envolvidos na reabilitação de lesões ósseas, este estudo tem como objetivo comparar o efeito de dois protocolos de ultrassom terapêutico com diferentes tempos de exposição para regeneração de defeito ósseo crítico.

MATERIAIS E MÉTODOS

Este experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências da Saúde (CEUA-ICS) da Universidade Federal da Bahia, sob protocolo nº 101/2016, e encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de

2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA) (ANEXO A).

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados no Biotério Central da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), onde os animais ficaram alocados durante a realização do experimento.

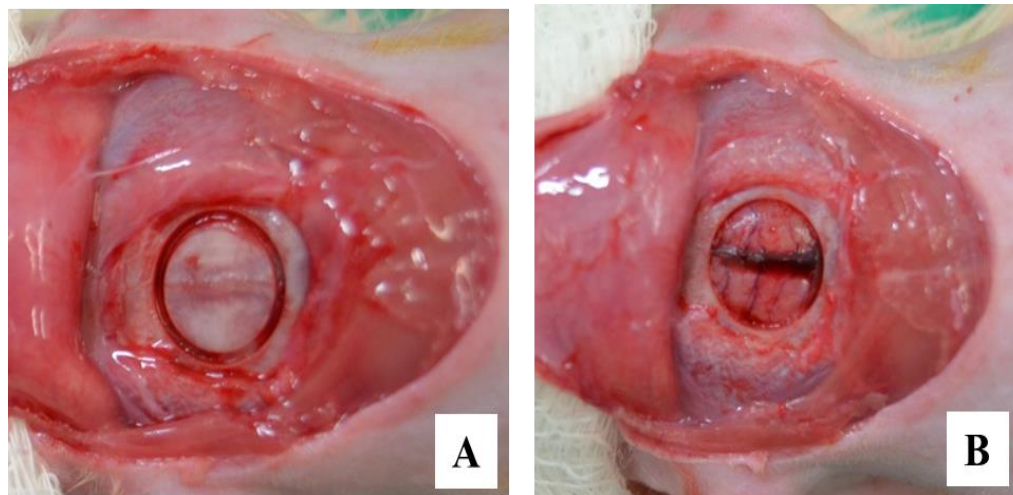
Foram utilizados 45 ratos, *Rattus norvegicus*, da linhagem *Wistar albinus*, jovens adultos, machos, com peso de 350 a 400 gramas.

A realização da técnica cirúrgica foi precedida, em todos os animais, pela anestesia geral e pela sedação com injeção intramuscular de cloridrato de cetamina (100 mg/kg) e de cloridrato de xilazina (40 mg/kg), respectivamente, a que se seguiu a tricotomia e a assepsia na região da calvária. Logo após, cada animal foi posicionado em decúbito ventral para realização do procedimento cirúrgico.

A metodologia do procedimento cirúrgico foi semelhante à dos trabalhos realizados por Almeida et al.^[35], Miguel et al.^[80], Câmara-Pereira et al.^[81], Ribeiro et al.^[82], Daltro et al.^[83] para confecção de defeito ósseo crítico, de 8,5 mm de diâmetro, na região da calvária (FIGURA 13).

Após a confecção do defeito ósseo crítico, os animais foram distribuídos em três grupos, com pontos biológicos de 15, 30 e 60 dias, para compor os seguintes grupos: grupo ultrassom terapêutico 5 minutos (**GUS 5**), com aplicação de ondas mecânicas emitidas pelo ultrassom terapêutico por cinco minutos sobre defeito ósseo preenchido por coágulo sanguíneo; grupo ultrassom terapêutico 10 minutos (**GUS 10**), com aplicação de ondas mecânicas emitidas pelo ultrassom terapêutico por dez minutos sobre defeito ósseo preenchido por coágulo sanguíneo; grupo controle (**GC**), sem aplicação das ondas mecânicas emitidas pelo ultrassom terapêutico. Para aquisição das imagens macroscópicas, foi utilizada uma câmera digital Nikon D 3100.

Figura 13 - Etapa do procedimento cirúrgico. Remoção do tecido subcutâneo, dos músculos e marcação do defeito (A); remoção do fragmento ósseo (B)



Fonte: Elaboração da autora.

Protocolo de aplicação do ultrassom terapêutico

Os protocolos foram iniciados no primeiro dia do pós-operatório. Em todos os animais do GUS 5 e do GUS 10 foram realizadas anestesia e sedação para permitir a aplicação da terapêutica, seguidas de, quando necessário, tricotomia na região da calvária. Posteriormente, cada animal foi posicionado individualmente, em decúbito ventral, na mesa de procedimentos, e foi aplicado gel hidrossolúvel nas regiões da calvária e na parte superior da bolsa de água (FIGURA 14).

Utilizou-se equipamento de ultrassom terapêutico de baixa intensidade, modelo Sonopulse III, marca Ibramed[®], previamente calibrado pelo fabricante, com frequência de 1 MHz, modo pulsado, intensidade 0,2 W/cm², 50% de ciclo de trabalho, frequência de repetição de pulso de 16 Hz e tamanho de área efetiva de radiação (ERA) de 7 cm². Durante a aplicação do ultrassom terapêutico, foram realizados movimentos lentos, circulares e contínuos com o transdutor, por 5 ou 10 minutos, a depender do grupo experimental. O protocolo foi realizado cinco vezes por semana, com pausa de 48 horas, nos pontos biológicos de 15, 30 e 60 dias, o que equivale, respectivamente, a 11, 22 e 44 aplicações do ultrassom.

Os protocolos foram estabelecidos após adaptação dos utilizados por Albertin^[72], Barreto^[84] e Skau et al.^[85] e realização de teste-piloto, por não se ter localizado, na literatura

disponível, relato de protocolo de terapia por ultrassom terapêutico, com equipamento nacional, para regeneração de defeito ósseo crítico. Após os protocolos terapêuticos, os animais foram mantidos em local aquecido para recuperação da narcose anestésica e, em seguida, colocados em gaiolas individuais.

Figura 14 - Utilização do ultrassom terapêutico



Fonte: Elaboração da autora.

Após os pontos biológicos de 15, 30 e 60 dias, os animais foram eutanasiados, as calvárias foram removidas e fixadas em formol tamponado a 10% e mantidas em coletores plásticos por 72 horas. Em seguida, as amostras foram clivadas nas regiões laterais e inferior, seguindo-se a divisão em duas porções, sendo de, aproximadamente, 2/3 a anterior e de 1/3 a posterior.

A porção anterior foi descalcificada em solução de ácido etileno-diamino-tetracético (EDTA) a 7%, durante sete dias, com troca do ácido a cada 24 horas. As calvárias foram processadas, incluídas em parafina e cortadas de forma seriada em um micrótomo com espessura de 5,0 μm . Utilizou-se a técnica de coloração de rotina com hematoxilina-eosina (HE); para identificar proteínas colagênicas, empregou-se o *picrosirius red* (PIFG) e, para identificar a matriz óssea, o tricrômico Masson Goldner. Na análise histológica, foi utilizado o microscópio vertical digital Leica[®] DM6 B e o *software* LAS V4.12[®].

RESULTADOS

• GUS 5

Aos 15 dias, houve formação de matriz osteoide reacional e inespecífica (FIGURA 15 A), que foi incrementada aos 30 dias (FIGURA 15 B) e estabilizada aos 60 dias (FIGURA 15 C), embora restrita às regiões de borda óssea, com ausência do restabelecimento do volume ósseo original. Os osteoblastos ativos estavam presentes em todos os pontos biológicos. A extensão do defeito foi preenchida pela matriz de tecido conjuntivo frouxo, que apresentou menor espessura na região central do defeito aos 15 dias, evoluiu para o espessamento contínuo aos 30 dias, porém, aos 60 dias, sofreu redução (FIGURA 15 C). Em todos os pontos biológicos, notou-se a presença de fibras colágenas, que, aos 30 dias, apresentaram-se em paralelo (FIGURA 15 B), e proliferação difusa de capilares. Aos 15 dias o edema apresentava-se moderado, e havia presença de infiltrado inflamatório mononuclear difuso, que se reduziu aos 30 dias e tornou-se inconspícuo aos 60 dias.

Figura 15 - GUS 5 - Fotomicrografia do defeito ósseo crítico com presença de neoformação de matriz osteoide (*). **(A)** Aos 15 dias, presença de osteoblastos ativos e diversos espaços capilares (HE). **(B)** Alinhamento das fibras colágenas aos 30 dias (PIFG). **(C)** Redução do espessamento do tecido conjuntivo frouxo aos 60 dias (HE)



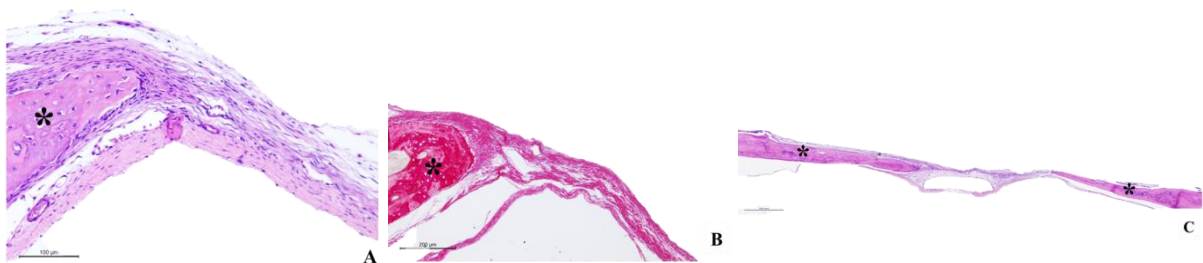
Fonte: Elaboração da autora.

• GUS 10

Aos 15 dias, a neoformação da matriz osteoide apresentava-se restrita à borda óssea (FIGURA 16 A) e evoluiu, a partir dos 30 dias (FIGURA 16 B), para a formação em direção centrípeta (FIGURA 16 C), com ausência do restabelecimento do volume ósseo original. Os osteoblastos permaneceram presentes e ativos em todos os pontos biológicos, e o

preenchimento da área do defeito ocorreu com tecido conjuntivo frouxo que apresentou aumento da espessura em toda a extensão. Em todos os pontos biológicos, as fibras colágenas estavam organizadas em paralelo (FIGURA 16 B), houve proliferação de vasos sanguíneos, com estabilização da angiogênese aos 60 dias. O edema e o infiltrado inflamatório mononuclear apresentaram-se reduzidos e tornaram-se ausentes aos 60 dias.

Figura 16 - GUS 10 - Fotomicrografia da região do defeito ósseo crítico com presença de neoformação de matriz osteoide (*). (A) Presença de osteoblastos ativos e diversos espaços capilares aos 15 dias (HE). (B) Organização das fibras colágenas em paralelo aos 30 dias (PIFG). (C) Neoformação de matriz osteoide em direção centrípeta aos 60 dias (HE)

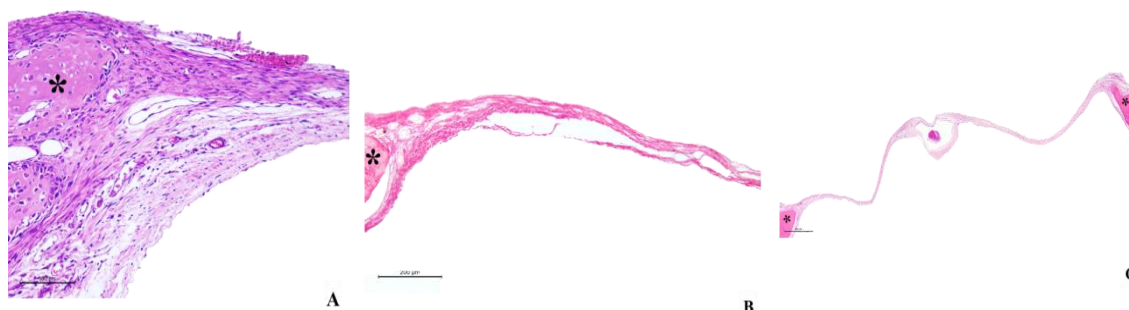


Fonte: Elaboração da autora.

- **GC**

A neoformação de matriz osteoide reacional apresentou-se restrita à borda óssea em todos os pontos biológicos (FIGURAS 17 A, B e C), e o volume ósseo original não foi reestabelecido. Apenas aos 15 dias, houve presença de osteoblastos ativos. O preenchimento do defeito, em todos os pontos biológicos, ocorreu com tecido conjuntivo frouxo, que se apresentou delgado aos 15 dias e ainda mais delgado aos 60 dias (FIGURA 17 C), com espessura menor que a borda óssea. Constataram-se poucos capilares, e aos 30 e 60 dias, estabilização da angiogênese, discreto edema e infiltrado inflamatório mononuclear difuso que se tornaram ausentes posteriormente.

Figura 17- GC - Fotomicrografia da região do defeito ósseo crítico com presença de neoformação de matriz osteoide (*). (A) Osteoblastos ativos e poucos espaços capilares aos 15 dias (HE). (B) Preenchimento do defeito com delgado tecido conjuntivo frouxo aos 30 dias (PIFG). (C) Neoformação de matriz osteoide restrita às bordas ósseas aos 60 dias (HE)



Fonte: Elaboração da autora.

DISCUSSÃO

A ausência da padronização de protocolos de ultrassom terapêutico com a finalidade de auxiliar a regeneração tecidual pode comprometer o resultado terapêutico desejado. Desse modo, é necessário que sejam eleitos com cautela e que se unifiquem os parâmetros a serem utilizados na reabilitação.^[51] Dentre os diversos parâmetros está a variável tempo, pouco estudada nos artigos científicos disponíveis, impondo-se, portanto, a necessidade de definir o tempo de tratamento a ser empregado em cada lesão.^[51] Sendo assim, o experimento buscou comparar o efeito de dois protocolos de diferentes tempos de tratamento do ultrassom terapêutico na regeneração de defeito ósseo crítico.

A realização da terapia com ondas ultrassônicas na fase inicial incrementou o reparo tecidual, pois o efeito do ultrassom está relacionado, principalmente, com o intervalo de tempo entre o início da lesão e o início do tratamento, de modo que, quanto mais precocemente se iniciar a terapia, mais rápida será a recuperação tecidual.^[7,77,86,87]

No presente estudo, os resultados obtidos na fase inicial do reparo mostraram que os tempos de cinco e dez minutos não foram suficientes para estimular o aumento da neoformação no defeito ósseo crítico.^[79] A evolução apresentada nos demais pontos biológicos do GUS 5 pode ter sido motivada pelo prolongamento do estímulo no tecido ósseo, que é capaz de promover regiões de remodelação^[79], sendo considerado um tempo suficiente para promover a consolidação óssea.^[85] Entretanto, alguns autores^[57,72,88] afirmam que o tempo ideal para promover o estímulo osteogênico e a organização tecidual é a partir de dez minutos, o que sugere que o ultrassom possui efeito dose-dependente quanto ao tempo de

estimulação.

O incremento constatado nos pontos biológicos tardios do GUS 10 pode ter ocorrido em consequência do prolongamento do estímulo na via de mecanotransdução, que potencializa o estímulo osteogênico e gera aumento da taxa de neoformação óssea.^[89] Entretanto, no GC houve manutenção da limitação da neoformação^[89] em razão da ausência de estímulo adicional.

O padrão celular encontrado nos grupos experimentais em que se realizou a terapia com ultrassom demonstrou que as ondas ultrassônicas são capazes de induzir e fomentar a ativação e a diferenciação de células mesenquimais e osteoprogenitoras.^[7,89] Apesar de não estar elucidado esse mecanismo de indução à osteogênese por meio desse recurso terapêutico^[89], sabe-se que o ultrassom estimula as células mesenquimais a se diferenciar em osteoblastos, que, por sua vez, têm sua atividade celular estimulada. Além disso, o ultrassom acelera a diferenciação dos osteoblastos e promove aumento da mineralização óssea.^[90, 91]

O tecido de reparo que preencheu o defeito no GUS 5 e no GUS 10 foi estimulado pelas ondas ultrassônicas que, além de fomentar a síntese de células mesenquimais, estimulam colágeno e fibroblastos, principalmente quando utilizadas na fase inicial do reparo^[7,79,86,89], como se procedeu neste experimento. A partir de dois minutos de emissão das ondas ultrassônicas, ocorre o estímulo ao crescimento de fibroblastos^[92] e o alinhamento das fibras de colágeno acontece a partir de três minutos.^[51]

Neste estudo, o ultrassom mostrou-se promissor no estímulo à angiogênese tanto aos cinco quanto aos dez minutos de terapia, quando ocorre a vascularização a partir da fase inicial do reparo^[79] e torna-se evidente na fase tardia, o que favorece o processo de reparo ósseo.^[90]

Há duas hipóteses para justificar a angiogênese promovida pelo ultrassom: o estímulo ao aumento da secreção de interleucina-8 (IL-8) e a produção do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Supõe-se que as ondas ultrassônicas regulam a secreção da IL-8 pelos osteoblastos, por ser uma citocina responsável por induzir a proliferação e a migração de células endoteliais, o que leva à angiogênese. A segunda hipótese sugere que o ultrassom estimula a produção de VEGF também pelos osteoblastos, um fator fundamental para a angiogênese, que atua na regulação da mitose e no recrutamento das células endoteliais.^[93]

As ondas ultrassônicas promoveram a redução do tempo do processo inflamatório após os tempos de cinco e dez minutos de terapia, por favorecer a aceleração da fase inflamatória, decorrente do aumento e da liberação de células mononucleares, assim como da liberação de histaminas, que fomenta uma rápida resolução do processo inflamatório.^[86,94]

Devido a esse mecanismo, o ultrassom é capaz de eliminar o processo inflamatório a partir da fase inicial do reparo.^[88]

O ultrassom terapêutico, apesar de apresentar efeito osteogênico e possibilitar seu uso em situações em que o reparo é crítico, não mostrou eficácia quanto ao restabelecimento do volume e da morfologia do tecido ósseo original em ambos os protocolos. Dessa forma, a fim de potencializar os efeitos das ondas ultrassônicas, sugere-se uma possível associação desse recurso terapêutico a um arcabouço tridimensional, que servirá de maior suporte estrutural e mecânico, potencializará o crescimento celular e induzirá a diferenciação celular.^[83,95]

CONCLUSÃO

O ultrassom terapêutico estimulou o reparo do defeito ósseo crítico, e o maior tempo de exposição promoveu maior estímulo osteogênico.

Referências Gerais

1. Costa MM, Queiroz PRM. Bioengenharia de tecido epitelial e cartilagenoso. *Univ Ciênc Saúde*. 2013; 11 (2): 107-19.
2. Nulend JK, Nijweide PJ, Burger EH. Osteocyte and bone structure. *Curr Osteoporos Rep*. 2003; 1 (1): 5-10.
3. Lirani APR, Castro ML. Evidências da ação de agentes físicos sobre o metabolismo do tecido ósseo e seus potenciais usos clínicos. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2005; 49 (6): 891-6.
4. Santos ML, Borges GF. Exercício físico no tratamento e prevenção de idosos com osteoporose: uma revisão sistemática. *Fisioter Mov*. 2010; 23 (2): 289-99.
5. Babuccu C, Keklikoglu N, Baydogan M, Kaynar A. Cumulative effect of low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasound on bone repair in rats. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2014; 43 (6): 769-76.
6. Angle SR, Sena K, Sumner DR, Virkus WW, Viridi AS. Combined use of low intensity pulsed ultrasound and rhBMP-2 to enhance bone formation in rat modelo f critical-size defect. *J Orthop Trauma*. 2014; 28 (10): 605-11.
7. Acar AH, Yolcu U, Altundis S, Gul M, Alan H, Malkoç S. Bone regeneration by low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasound therapy in the rabbit calvarium. *Arch Oral Biol*. 2016; 61: 60-5.
8. Olsson DC, Martins VMV, Pippi NL, Mazzanti A, Tognoli GK. Ultra-som terapêutico na cicatrização tecidual. *Ciênc. Rural*. 2008; 38 (4): 1199-207.
9. Moreira BS. A biomecânica da fratura e o processo de cicatrização. *Cadernos Unisuam*. 2013; 3 (1): 101-17.
10. Lin ZX, Xu ZH, An YH, Li X. In situ observation of fracture behavior of canine cortical bone under bending. *Mater Sci Eng C*. 2016; 62: 361-7.
11. Andrade AD, Marinho CD, Barcelos M, Zorzal MB, Conz MB, Vidigal GM. Biologia Óssea: uma revisão da literatura. *Revista Implant News*. 2007; 4 (6): 659-62.
12. Legeros RZ. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clin Orthop Relat Res*. 2002; 395: 81-98.
13. Martin RM, Correa PHS. Bone quality and osteoporosis therapy. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2010; 54 (2): 186-99.
14. Nganvongpanit K, Pradit W, Pitakarnnop T, Phatsara M, Chomdej S. Differences in osteon structure histomorphometry between puppyhood and adult stages in the Golden Retriever. *Anat Sci Int*. 2017; 92 (4): 483-92.

15. Milovanovic P, Zimmermann EA, Hahn M, Djonic D, Puschel K, Djuric M, et al. Osteocytic canalicular networks: morphological implications for altered mechanosensitivity. *ACS Nano*. 2013; 7 (9): 7542-51.
16. Gartner LP, Hiatt JL. *Tratado de histologia em cores*. 3.ed Rio de Janeiro: Elsevier; 2007. p. 134-58.
17. Andia DC, Cerri PS, Spolidorio LC. Tecido ósseo: aspectos morfológicos e histofisiológicos. *Rev Odont da UNESP*. 2006; 35 (2): 191-8.
18. Plotkin LI, Bellido T. Osteocytic signalling pathways as therapeutic targets for bone fragility. *Nat Rev Endocrinol*. 2016; 12 (10): 593-605.
19. Piemontese M, Onal M, Xiong J, Han L, Thostenson JD, Almeida M, et al. Low bone mass and changes in the osteocyte network in mice lacking autophagy in the osteoblast lineage. *Sci Rep*. 2016; 6 (24262): 1-13.
20. Gusmão CVB, Belangero WD. Como a célula reconhece o estímulo mecânico? *Rev Bras Ortop*. 2009; 44 (4): 299-305.
21. Lanske B, Densmore MJ, Erben RG. Vitamin D endocrine system and osteocytes. *BoneKey Rep*. 2014; 3 (494): 1-5.
22. Siddiqi JA, Partridge NC. Physiological bone remodeling: systemic regulation and growth factor involvement. *Physiology*. 2016; 31 (3): 233-45.
23. Ocarino NM, Serakides R. Efeito da atividade física no osso normal e na prevenção e tratamento da osteoporose. *Rev Bras Med Esporte*. 2006; 12 (3): 164-8.
24. Takahashi N, Udagawa N, Suda T. Vitamin D endocrine system and osteoclasts. *Bonekey Reports*. 2014; 3 (495): 1-9.
25. Sodek J, Mckee MD. Molecular and cellular biology of alveolar bone. *Periodontol* 2000; 24: 99-126.
26. Bezerra MC, Carvalho JF, Prokopowitsch AS, Pereira RM. RANK, RANKL and osteoprotegerin in arthritic bone loss. *Braz J Med Biol Res*. 2005; 38 (2): 161-70.
27. Zerbini CAF, Mcclung MR. Odanacatib in postmenopausal women with low bone mineral density: a review of current clinical evidence. *Ther Adv Musculoskelet Dis*. 2013; 5 (4) 199-209.
28. Warden SJ, Davis IS, Fredericson M. Management and prevention of bone stress injuries in long-distance runners. *J Orthop Sports Phys Ther*. 2014; 44 (10): 749-65.
29. Boyce BF, Xing L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Res Ther*. 2007; 9 (1): 1-7.
30. Boyce BF, Xing L. Function of RANK/RANKL/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys*. 2008; 437 (2): 139-46.

31. Carano RAD, Filvaroff EH. Angiogenesis and bone repair. *Drug Discov Today*. 2003; 8 (21): 980-9.
32. Rossi-Junior WC, Barbosa LCO, Esteves A. Evaluation of osteogenic capacity of the periosteum in combination with collagen membrane. *Acta Ortop Bras*. 2010; 18 (6): 327-30.
33. Kim SS, Park MS, Jeon O, Choi CY, Kim BS. Poly (lactide-coglycolide)/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2006; 27 (8): 1399-409.
34. Avramoglou DL, Anagnostou F, Petite RB. Engineering bone: challenges and obstacles. *J Cell Med*. 2005; 9 (1): 72-84.
35. Almeida RS, Ribeiro IIA, Silva MHP, Rocha DN, Miguel FB, Rosa FP. Avaliação da fase inicial do reparo ósseo após a implantação de biomateriais. *Rev Ciênc Méd Biol*. 2014; 13 (3): 331-6.
36. Colnot C. Skeletal cell fate decisions within periosteum and bone marrow during bone regeneration. *J Bone Miner Res*. 2009; 24 (2): 274-82.
37. Turner CH, Forwood MR, Otter MW. Mechanotransduction in bone: do bone cells act as sensors of fluid flow? *FASEB J* 1994; 8 (11): 875-8.
38. Galli C, Passeri G, Macaluso GM. Osteocytes and WNT: the mechanical control of bone formation. *J Dent Res*. 2010; 89 (4): 331-43.
39. Carvalho DCL, Carvalho MM, Cliquet AJ. Osteoporose por desuso: aplicação na reabilitação do lesado medular. *Acta Ortop Bras*. 2001; 9 (3) 34-43.
40. Ren L, Yang P, Wang Z, Zhang J, Ding C, Shang P. Biomechanical and biophysical environment of bone from the macroscopic to the pericellular and molecular level. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2015; 50: 104-22.
41. Waris CDA, Silva CKS, Matni INS, Bossini ES. A eficácia do ultrassom terapêutico pulsado na consolidação de fraturas. *Rev Paran Med*. 2013; 27 (3): 69-75.
42. Reher P, Harris M, Whiteman M, Hai HK, Meghji S. Ultrasound stimulates nitric oxide and prostaglandin E₂ production by human osteoblasts. *Bone*. 2002; 31 (1): 232-41.
43. Xin Z, Lin G, Lei H, Lue TF, Guo Y. Clinical applications of low-intensity pulsed ultrasound and its potential role in urology. *Transl Androl Urol*. 2016; 5 (2): 255-66.
44. O'Brien WDJ. Ultrasound-biophysics mechanisms. *Prog Biophys Mol Biol*. 2007; 93 (1-3): 212-55.
45. Leighton TG. What is ultrasound? *Prog Biophys Mol Biol*. 2007; 93: 3-83.

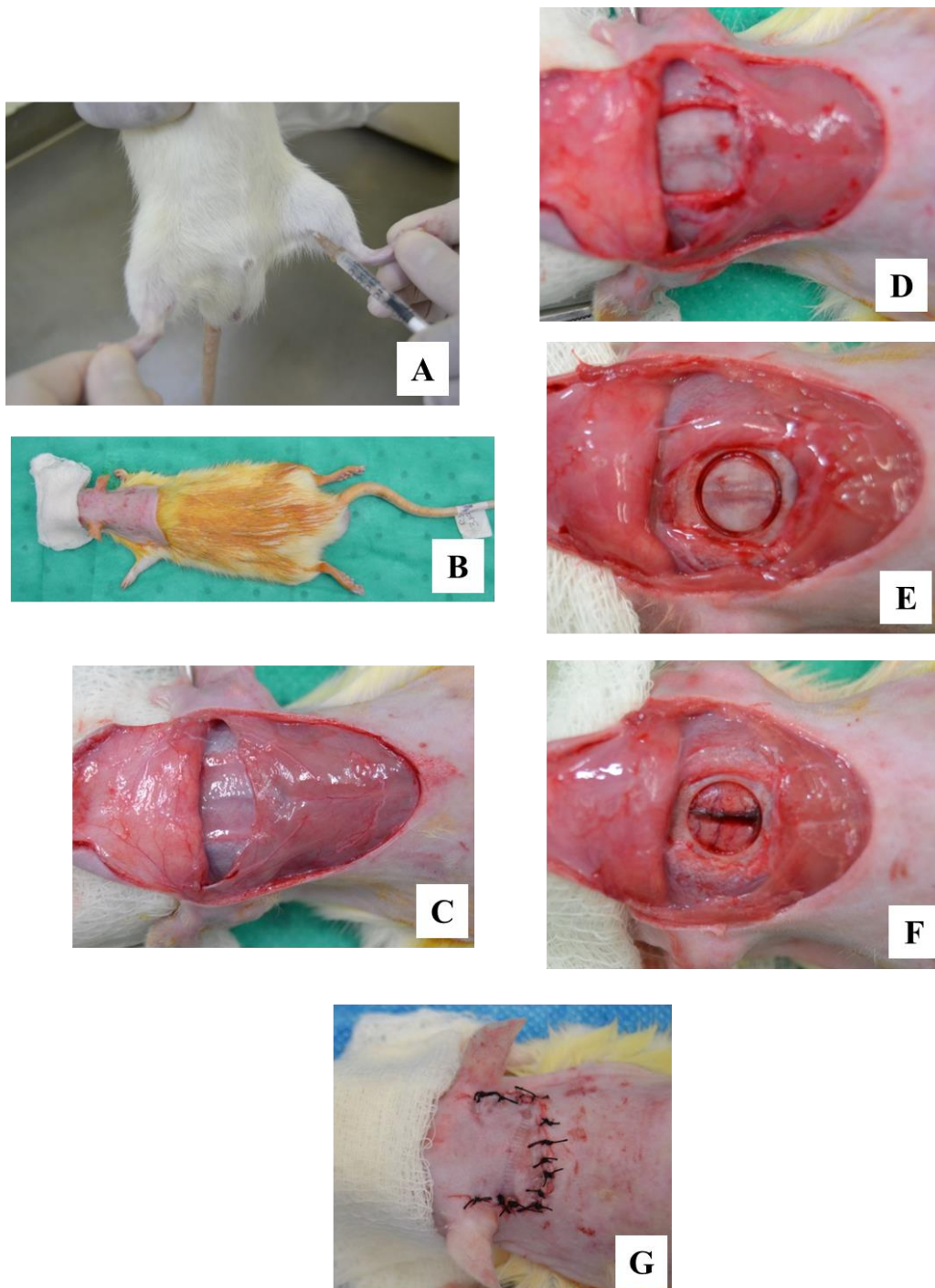
46. Guirro R, Santos SCB. A realidade da potência acústica emitida pelos equipamentos de ultra-som terapêutico: uma revisão. *Rev Fisioter.* 1997; 4 (2): 76-82.
47. Chen R, Zhu M, Sahn DJ, Ashraf M. Non-invasive evaluation of heart function with four-dimensional echocardiography. *Plos One.* 2016; 11 (5): 1-12.
48. Narouze S. Occipital neuralgia diagnosis and treatment: the role of ultrasound. *Headache.* 2016; 56 (4): 801-7.
49. Rai S, Ranjan V, Misra D, Panjwani S. Management of myofascial pain by therapeutic ultrasound and transcutaneous electrical nerve stimulation: a comparative study. *Eur J Dent.* 2016; 10 (1): 46-53.
50. Menezes RC, Silva SG, Ribeiro ER. Ultra-som no tratamento do fibro edema gelóide. *Rev Inspirar.* 2009; 1 (1): 9-14.
51. Farcic TS, Lima RMCB, Machado AFP, Baldan CS, Villicev CM, Esteves Junior I, et al. Aplicação do ultrassom terapêutico no reparo tecidual do sistema musculoesquelético. *Arq Bras Ciênc Saúde.* 2013; 37 (3): 149-53.
52. Martins CN, Moraes MB, Hauck M, Guerreiro LF, Rossato DD, Varela Junior AS, et al. "Effects of cryotherapy combined with therapeutic ultrasound on oxidative stress and tissue damage after musculoskeletal contusion in rats". *Physiotherapy.* 2016; 102 (4): 377-83.
53. Apolinario JC, Coleho WMD, Louzada MJQ. Análise da influência do ultrassom de baixa intensidade na região de reparo ósseo em ratos sob ausência de carga. *Fisioter Pesq.* 2011; 18 (3): 257-9.
54. Freitas TP, Freitas LS, Streeck EL. Ultra-som terapêutico no mecanismo de cicatrização: uma revisão. *ACM Arq Catarin Med.* 2011; 40 (1): 89-93.
55. Haar GT. Review therapeutic ultrasound. *Eur J Ultrasound.* 1999; 9: 3-9.
56. Agne JE. Eletrotermofototerapia teoria e prática. Santa Maria: Orium; 2004.
57. Silveira DS, Pippi NL, Costa FS, Vescovi LA, Conti LMC, Weiss A, et al. O ultra-som terapêutico de 1MHz, na dose de $0,5 \text{ Wcm}^2$, sobre o tecido ósseo de cães avaliado por densitometria óptica em imagens radiográficas. *Ciênc Rural.* 2008; 38 (8): 2225-31.
58. Kitchen S. Eletroterapia prática baseada em evidências. In: Young, S. *Ultra-Som: terapia com ultrasom.* São Paulo: Manole; 2003.
59. Borges FS. Ultra-som. In: Borges, F. S. *Dermato-Funcional: modalidades terapêuticas nas disfunções estéticas.* São Paulo: Phorte; 2006.
60. Haar GT. Therapeutic applications of ultrasound. *Prog Biophys Mol Biol.* 2007; 93: 111-29.

61. Rubin D. Ultrasonic therapy physiological basis and clinical application. *Calif Med.* 1958; 89 (5): 349-51.
62. Baker KG, Robertson VJ, Duck FA. A review of therapeutic ultrasound: biophysical effects. *Phys Ther.* 2001; 7 (81): 1351-8.
63. Wu J, Nyborg WL. Ultrasound, cavitation bubbles and their interaction with cells. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008; 60 (10): 1103-16.
64. Sousa VL, Alvarenga J, Padilha Filho JG, Canola JC, Ferrigno CRA, Alves JM, et al. Ultra-som pulsado de baixa intensidade em fraturas diafisárias: aplicação clínica em cães. *Cienc Rural.* 2008; 38 (4): 1030-7.
65. Naruse K, Mikuni-Takagaki Y, Azuma Pinhy, Ito M, Oota T, Kameyama K, et al. Anabolic response of mouse bone-marrow-derived stromal cell clone ST2 cells to low-intensity pulsed ultrasound. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 268 (1): 216-20.
66. Speed CA. Therapeutic ultrasound in soft tissue lesions. *Rheumatology.* 2001; 40 (12): 1331-6.
67. Fernandes KR, Oliveira P, Bertolo D, Andrade GN, Matsuda NY, Renno ACM. Efeitos dos recursos eletrofísicos na osteoporose: uma revisão da literatura. *Fioter Mov Curitiba.* 2010; 23 (2): 271-81.
68. Kasturi G, Adler RA. Mechanical means to improve bone strength: ultrasound and vibration. *Curr Rheumatol Rep.* 2011; 13 (3): 251-6.
69. Wei FY, Leung KS, Li G, Qin J, Chow SKH, Huang S, et al. Low intensity pulsed ultrasound enhanced mesenchymal stem cell recruitment through stromal derived factor-1 signaling in fracture healing. *PLoS ONE* 2014; 9 (9): 1- 13.
70. Frez AR, Ariza D, Ferreira JR, Alves EPB, Breda GR, Centenaro LA, et al. Efeito do ultra-som terapêutico contínuo em placas epifisárias de coelhos. *Rev Bras Med Esporte.* 2006; 12 (3): 150-2.
71. Aonuma H, Miyakoshi N, Kasukawa Y, Kamo K, Sesaki H, Tsuchie H, et al. Effects of combined therapy of alendronate and low-intensity pulsed ultrasound on metaphyseal bone repair after osteotomy in the proximal tibia of aged rats. *J Bone Miner Metab.* 2014; 32: 232-9.
72. Albertin LM. Efeito do ultra-som sobre o reparo de falha óssea experimental: avaliação quantitativa e morfológica do parâmetro tempo de estimulação. *Rev Bras Fisioter.* 2004; 8 (1): 1-6.
73. Azuma Y, Ito M, Harada Y, Takagi H, Ohta T, Komoriya K, et al. Low-intensity pulsed ultrasound accelerates rat femoral fracture healing by acting on the various cellular reactions in the fracture calls. *J Bone Miner Res.* 2001; 16: 671-80.
74. Bialy TI. Therapeutic ultrasound applications in craniofacial growth, healing and tissue engineering. *Rejuvenation Res.* 2007; 10 (3): 367-371.

75. Veronick J, Assanah F, Nair LS, Vyas V, Huey B, Khan Y. The effect os acoustic radiation force on osteoblasts in cell/hydrogel constructs for bone repair. *Exp Biol Med.* 2016; 241 (10): 1149-56.
76. Harrison A, Lin S, Pounder N, Takagaki YM. Mode & mechanism of low intensity pulsed ultrasound (LIPUS) in fracture repair. *Ultrasonics.* 2016; 70: 45-52.
77. Pereira AJF, Amorim M, Catelani F, Matusin DP, Rosa P, Guimarães DM, et al. The influence of low-intensity physiotherapeutic ultrasound on the initial stage of bone healing in rats: an experimental and simulation study. *J Ther Ultrasound.* 2016; 4 (24): 1-8.
78. Király M, Varga Z, Szanyó F, Kiss R, Hodosi K, Bender T. Effects of underwater ultrasound therapy on pain, inflammation, hand function and quality of life in patients with rheumatoid arthritis – a randomized controlled trial. *Braz J Phys Ther.* 2017; 21 (3): 199-205.
79. Pípi EF, Feitosa SM, Ribeiro DA, Bossini P, Oliveira P, Pariozotto NA et al. Comparative study of the effects of low-intensity pulsed ultrasound and low-level laser therapy on bone defects in tibias of rats. *Lasers Med Sci.* 2010; 25 (5): 727-32.
80. Miguel F, Barbosa-Júnior AA, Paula FL, Barreto IC, Goissis G, Rosa FP. Regeneration of critical bone defects with anionic collagen matrix as scaffolds. *J Mater Sci Mater Med.* 2013; 24 (11): 2567-75.
81. Câmara-Pereira ES, Rolim AEH, Reale R, Barreto R, Campos L, Barbosa-Junior AAB, et al. Analysis of bone repair tissue after implantation of biomaterials and application of vibratory waves. *Materials Science Forum.* 2014; 775-776: 9-12.
82. Ribeiro IIA, Almeida RS, Rocha DN, Silva MHP, Miguel FB, Rosa FP. Biocerâmicas e polímero para a regeneração de defeitos ósseos críticos. *Rev. Ciênc. Méd. Biol.* 2014; 13 (3): 2298-302.
83. Daltro AFC, Barreto IC, Rosa FP. Análise do efeito da plataforma vibratória na regeneração de defeito ósseo crítico. *Rev Ciênc Med Biol.* 2016; 15 (3): 323-9.
84. Barreto AA. Efeito do ultrassom terapêutico sobre o crescimento ósseo das epífises, distal do fêmur e proximal da tibia em *rattus norvegicus*. [Tese Doutorado em Bases Gerais da Cirurgia, Área de Concentração em Agressão, Reparação, Regeneração e Transplante de Tecidos e Órgãos], Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho: Botucatu; 2009.
85. Skau JR, Rodrigues B, Rosa FO, Araujo RC, Fontinele RG, Souza RR. Histomorphometrical analysis on the effects of two therapeutic ultrasound intensities on fracture healing in aged rats. *Fisioter Mov.* 2014; 27 (2): 173-9.
86. Silva JMN, Carvalho JP, Moura-Junior MJ, Arisawa EALS, Martin AA, Sá HP, et al. Estudo da ação do ultrassom terapêutico em modelo experimental de tendinite em ratos Wistar. *Com Scientiae Saúde.* 2010; 9 (4): 625-32.

87. Pereira AJF, Teixeira RC, Oliveira AJB, Pontes RWF, Barros RSM, Negrão JNC. Efeito do ultrassom terapêutico de baixa intensidade em fratura induzida em tibia de ratos. *Acta Ortop Bras.* 2013; 21 (1): 18-22.
88. Oliveira P, Sperandio E, Fernandes KR, Pastor FAC, Nonaka KO, Renno ACM. Comparação dos efeitos do laser de baixa potência e do ultrassom de baixa intensidade no processo de reparo ósseo em tibia de rato. *Rev Bras Fisioter.* 2011; 15 (3): 200-5.
89. Jung YJ, Kim R, Ham HJ, Park SI, Lee MY, Kim J, et al. Focused low-intensity pulsed ultrasound enhances bone regeneration in rat calvarial bone defect through enhancement of cell proliferation. *Ultrasound Med Biol.* 2015; 41 (4):999-1007.
90. Zhu H, Cai X, Lin T, Shi, Z, Yan S. Low-intensity pulsed ultrasound enhances bone repair in a rabbit model of steroid-associated osteonecrosis. *Clin Orthop Relat Res.* 2015; 473 (5): 1830-9.
91. Macione J, Long D, Nesbitt S, Wentzell S, Ykota H, Pandit V, et al. Stimulation of osteoblast differentiation with guided ultrasound waves. *J Ther Ultrasound.* 2015; 3 (12): 3-7.
92. Oliveira PD, Oliveira DAAP, Martinago CC, Frederico RCP, Soares CP, Oliveira RF. Efeito da terapia ultrassônica de baixa intensidade em cultura celular de fibroblastos. *Fisioter Pesq.* 2015; 22 (2): 112-8.
93. Padilla F, Puts R, Vico L, Raum K. Stimulation of bone repair with ultrasound: A review of the possible mechanic effects. *Ultrasonics.* 2014; 54 (5): 1125-45.
94. Pereira T, Ferreira BSO, Alves WS, Filho ALMM. Ação do ultrassom terapêutico e laser de baixa intensidade na regeneração nervosa em *rattus norvegicus*. *Con Scientice Saúde.* 2014; 13 (1): 22-30.
95. Akilal N, Lemaire F, Bercu NB, Sayen S, Gangloff SC, Khelfaoui Y, Rammal H, Kerdjoudj H. Cowries derived aragonite as raw biomaterials for bone regeneration medicine. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2019; 94 (1) 894-900.

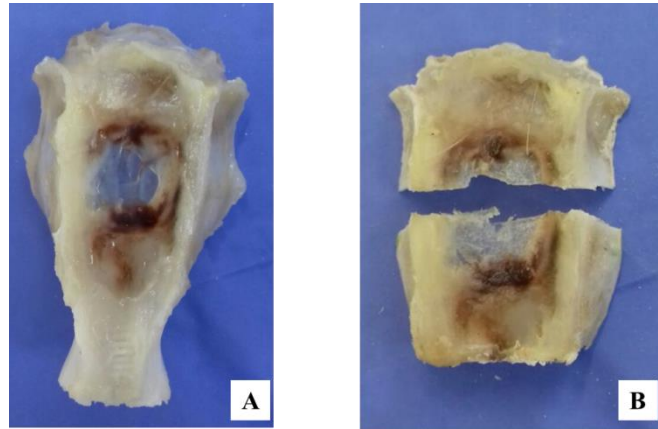
APÊNDICE A – Etapas dos procedimentos cirúrgicos



(A) Anestesia e sedação; (B) animal em decúbito ventral no campo cirúrgico; (C) incisão cutânea com exposição do periósteo; (D) remoção do periósteo; (E) marcação do defeito ósseo; (F) remoção do fragmento ósseo; (G) sutura do retalho cutâneo.

Fonte: Elaboração da autora.

APÊNDICE B – Etapa da clivagem das amostras (calvárias)



(A) Amostra (calvária) íntegra; (B) Amostra (calvária) clivada nas regiões lateral e inferior.

Fonte: Elaboração da autora.

Anexos

ANEXO A – Certificado de aprovação do CEUA



Universidade Federal da Bahia
 Instituto de Ciências da Saúde (ICS)
 Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-ICS)

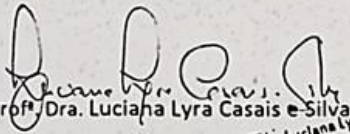


CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “EFEITO DAS ONDAS MECÂNICAS VIBRATÓRIAS PARA REGENERAÇÃO DE DEFEITO ÓSSEO CRÍTICO”, protocolo nº 101 /2016, sob a responsabilidade da Professora Dra. Fabiana Paim Rosa - que envolve a produção, manutenção e/ou a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11. 794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências da saúde (CEUA-ICS), em reunião de 06/10/2017.

Vigência do Projeto	01/10/2016 a 25/12/2017
Espécie/linhagem	<i>Rattus norvegicus</i> / Wistar
Número de animais	45
Peso/Idade	350 – 400 g / 3 - 4 semanas
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS)

Salvador, 06 de outubro de 2017


 Prof.^a Dra. Luciana Lyra Casais e Silva
 Coordenadora da CEUA-ICS
 Instituto de Ciências da Saúde - UFBA

ANEXO B – Folha de submissão do artigo a revista científica

18/11/2018

Email – Ana Flávia Daltro – Outlook

Successfully received: submission Análise comparativa do efeito de dois protocolos de ultrassom terapêutico para regeneração de defeito ósseo crítico for Revista Brasileira de Ortopedia

Revista Brasileira de Ortopedia <EvisSupport@elsevier.com>

Dom 18/11/2018, 23:50

Para: flavia_afcd@hotmail.com <flavia_afcd@hotmail.com>

This message was sent automatically. Please do not reply.

Ref: RBO_2018_467

Title: Análise comparativa do efeito de dois protocolos de ultrassom terapêutico para regeneração de defeito ósseo crítico

Journal: Revista Brasileira de Ortopedia

Dear Dr. Flavia,

Thank you for submitting your manuscript for consideration for publication in Revista Brasileira de Ortopedia. Your submission was received in good order.

To track the status of your manuscript, please log into EVISE® at:

http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL_ACR=RBO and locate your submission under the header 'My Submissions with Journal' on your 'My Author Tasks' view.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Revista Brasileira de Ortopedia

Have questions or need assistance?

For further assistance, please visit our [Customer Support](#) site. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about EVISE® via interactive tutorials. You can also talk 24/5 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email.

Copyright © 2018 Elsevier B.V. | [Privacy Policy](#)

Elsevier B.V., Radarweg 29, 1043 NX Amsterdam, The Netherlands, Reg. No. 33156677.



Instituto de Ciências da Saúde
Programa de Pós Graduação
Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas
Avenida Reitor Miguel Calmon s/n - Vale do Canela. CEP: 40110-100
Salvador, Bahia, Brasil

<http://www.ppgorgsystem.ics.ufba.br>