

# ESTUDO DAS DIFERENTES FREQUÊNCIAS DE ONDA DO ULTRASSOM TERAPEUTICO DE BAIXA INTENSIDADE NA AÇÃO OSTEOGÊNICA EM FRATURAS CIRÚRGICA

## STUDY OF THE DIFFERENT WAVE FREQUENCY OF LOW INTENSITY THERAPEUTIC ULTRASOUND IN OSTEOGENIC ACTION IN SURGICAL FRACTURES

JAQUELINE SILVA **BASTOS**<sup>2</sup>, GABRIEL S. THIAGO **CAVALLEIRO**<sup>1</sup>, ALLYSSON LUCAS **MARTINS**<sup>1</sup>, ANA KAROLINA GENEROSO COTTA **LOPES**<sup>1</sup>, VERONICA CLEMENTE VILLAR **MARTINI**<sup>2</sup>, RODRIGO NETO **FERREIRA**<sup>2</sup>, ANA PAULA ROSIFINI **ALVES CLARO**<sup>3\*</sup>

1. Acadêmicos do Curso de Graduação em Medicina da Faculdade de Medicina de Valença – FAA/CESVA; 2. Professores da Disciplina de Histologia e Embriologia do Curso de Medicina da Faculdade de Medicina de Valença – FAA/CEVSA; 3. Professora da Disciplina de engenharia de Materiais do curso de Engenharia Mecânica da Universidade Estadual de São Paulo campus Guaratinguetá (UNESP).

\* Hospital Escola Luiz Gioseffi Jannuzzi, Rua Dom José Costa Campos, 20, Centro, Valença, Rio de Janeiro, Brasil. CEP: 27.600-000.  
[paula.rosifini@unesp.br](mailto:paula.rosifini@unesp.br)

Recebido em 30/07/2019. Aceito para publicação em 02/09/2019

### RESUMO

As fraturas ósseas na saúde pública, apresentam risco de morte, sequelas, e grande custo financeiro aos hospitais. Por isso o uso do ultrassom terapêutico de baixa frequência (LIPUS) é uma alternativa para a cicatrização óssea. Seus efeitos dependem não só da duração do tratamento, mas também das características dos sinais físicos aplicados. A presente pesquisa avaliou os efeitos da ação do LIPUS no reparo ósseo, baseado na resposta em ratos Wistar. As amostras foram separadas em 3 grupos (não-ultrassonados, ultrassonados com 1MHz e ultrassonados com 3 MHz). Após 24 horas do ato cirúrgico, iniciaram os protocolos de aplicações em dias alternado, totalizando 15 aplicações. Ao término do protocolo, realizou-se a eutanásia com retirada da tibia fraturada. O acompanhamento qualitativo do reparo ósseo foi realizado por radiografia, microtomografia e análise histológica. Foi verificado pela análise histológica a ausência de calo ósseo no grupo não submetido a LIPUS. Verificando assim, que o emprego do ultrassom promoveu o reparo ósseo, nos outros grupos ultrassonados, sendo mais evidente no grupo ultrassonado com 1 MHz. Sugere-se pesquisas com maior número de amostras e diferentes tempos de aplicação.

**PALAVRAS-CHAVE:** Piezoelectricidade, Osteossíntese, Osteoporose.

### ABSTRACT

Bone fractures in public health present a risk of death, sequelae, and great financial cost to hospitals. Therefore, the use of low frequency therapeutic ultrasound (LIPUS) is an alternative for bone healing. Its effects depend not only on the duration of treatment, but also on the characteristics of the applied physical signals. The present research evaluated the effects of LIPUS action on bone repair, based on the response in Wistar rats. The samples were divided into 3 groups (non-ultrasound, 1MHz ultrasound and 3 MHz ultrasound). Twenty-four hours after surgery, they started the application protocols on alternate days, totaling 15 applications. At the

end of the protocol, euthanasia was performed with removal of the fractured tibia. Qualitative follow-up of bone repair was performed by radiography, microtomography and histological analysis. Histological analysis verified the absence of bone callus in the group not submitted to LIPUS. Thus, the use of ultrasound promoted bone repair in the other ultrasound groups, being more evident in the 1 MHz ultrasound group. Research with a larger number of samples and different application times is suggested.

**KEYWORDS:** Piezoelectricity, Osteosynthesis, Osteoporosis.

### 1. INTRODUÇÃO

As fraturas ósseas se destacam como um importante componente no ambiente da saúde pública, pois além de apresentar risco de morte e sequelas, apresentam um grande custo aos hospitais públicos, em cerca de 1.700,00 reais por internação a cada mulher acima de 50 anos decorrente de fratura de fêmur<sup>1</sup>.

Visando redução de gastos decorrente das internações de idosos por fraturas de fêmur, cerca de R\$49.884.326, o ministério da saúde vem realizando, em conjunto com as secretarias estaduais e municipais, medidas na tentativa de reduzir as taxas de internações, principalmente nessa população<sup>2</sup>.

A osteoporose ganha destaque pela elevada prevalência devido a fragilidade óssea, que acomete cerca de 200 Milhões de pessoas onde aproximadamente 10 milhões vivem no Brasil<sup>3</sup>.

O uso do ultrassom pulsado de baixa intensidade (LIPUS) no tecido ósseo como estimulação biofísica para melhorar a cicatrização da fratura foi objeto de uma ampla investigação na prática ortopédica desde 1953. Mais de 500.000 fraturas têm sido tratadas desta forma nos EUA, Europa e no Japão, nos últimos 20 anos<sup>4</sup>.

Segundo Duarte (1983)<sup>5</sup>, o ultrassom pulsado atinge o tecido por sucessão de impulsos, cada um deles resultando em um sinal elétrico como resposta do metabolismo ósseo.

É importante ter em mente que, como um fármaco, a dose de estímulo físico é fundamental para se obter os efeitos positivos sobre a osteogênese. Os efeitos biológicos de estimulação biofísica dependem não só da duração do tempo de tratamento, mas também das características do sinal, como a intensidade, a forma de onda, a frequência e duração do sinal<sup>4</sup>.

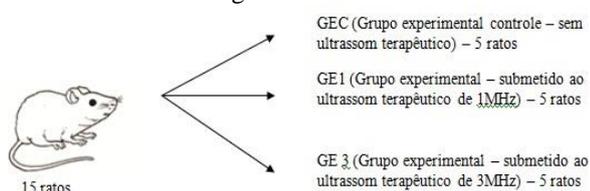
O ultrassom se propaga através da água e esse fato é usado na medicina já que a maioria dos tecidos corporais são constituídos principalmente de água<sup>6</sup>.

Desta forma, a presente pesquisa avaliou os efeitos biológicos da ação do ultrassom através da pesquisa in vivo, tendo como base experimental a resposta em ratos da raça Wistar.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos experimentais realizados com os animais foram aprovados pelo comitê de ética para o cuidado e uso de animais experimentais de protocolo n° CEUA/08/2014 da Faculdade de Veterinária da Fundação Educacional Dom André Arcoverde da cidade de Valença – RJ.

As amostras foram selecionadas baseadas no peso corporal de 400g e idade de 12 semanas, compatível com maturidade sexual de adultos de 23 anos, que foram divididos em 3 grupos experimentais com cinco animais, discriminados na Figura 1, totalizando 15 ratos machos da linhagem Wistar.



**Figura 1.** Divisão dos grupos da amostra.

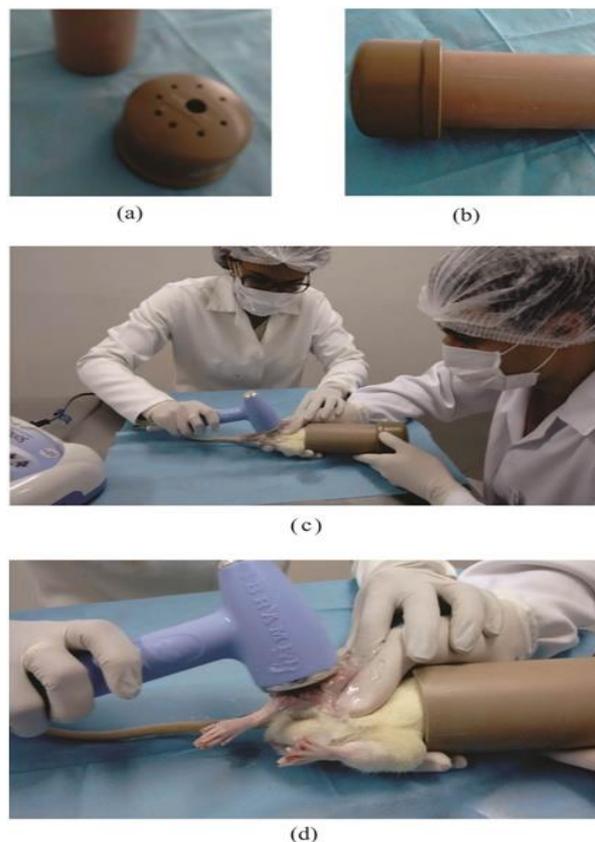
O procedimento anestésico foi de acordo com o peso corporal de cada animal selecionado, por meio de uma injeção intraperitoneal de um coquetel de Ketamina(0,1ml/100g) e Xylazina (0,1ml/100g) onde cada animal foi devidamente pesado e assim anestesiado. Após anestesia, foi realizada a tricotomia (raspagem dos pêlos da superfície anterior da tíbia direita, local da cirurgia) e a assepsia da pele feita com álcool 70%. O processo cirúrgico foi realizado por meio de incisão longitudinal de 50mm de comprimento ao longo da porção anterior da tíbia direita. Os músculos para abertura do campo cirúrgico. A fratura cirúrgica foi realizada através do uso de 2mm de baixa rotação. A área fraturada foi irrigada constantemente por soro fisiológico até a reaproximação dos músculos. O fechamento da ferida operatória foi realizado através de sutura em pontos simples realizados com Nylon monofilamento preto TECHNOFIO 3-0, não absorvível. Foi realizado aplicação de pomada a base

de Sulfato de neomicina 5mg/g, bacitracina 250UI/g até o sétimo dia do ato cirúrgico, respeitando a fase inflamatória do reparo tecidual.

Os animais foram mantidos o biotério CESVA/FAA em Valença – RJ com controle ambiente (ciclo claro/escuro a cada 12 horas e temperatura controlada em 21°C). Receberam livre demanda de água e ração, sendo mantidos em gaiolas de polipropileno, padrão, devidamente sinalizada por seus respectivos grupos, e forragem higienizada.

Após 24 h do ato cirúrgico, os grupos que foram submetidos ao tratamento associado de ultrassom terapêutico (US), iniciaram suas aplicações em dias alternados até completar 15 sessões terapêuticas. Foi utilizado o aparelho de modelo IBRAMED, SONOPULSE DIAMOND LINE com a transmissão no modo pulsado nas frequências de 1Mhz e 3Mhz, ciclo 1:5 e intensidade SATA 30mW/cm<sup>2</sup> e tempo de aplicação de 10 minutos com gel hidrossolúvel comercial para ultrassom sobre a pele tricotomizada na região fraturada em modo não estacionário.

A calibração do equipamento de ultrassom terapêutico foi realizada em uma balança de radiação acústica Ultrasound Power Meter UPM-DT-1 (Ohmic Instruments, USA) nos laboratórios do Programa de Pós-Graduação Inter unidades Bioengenharia –USP em São Carlos- SP.



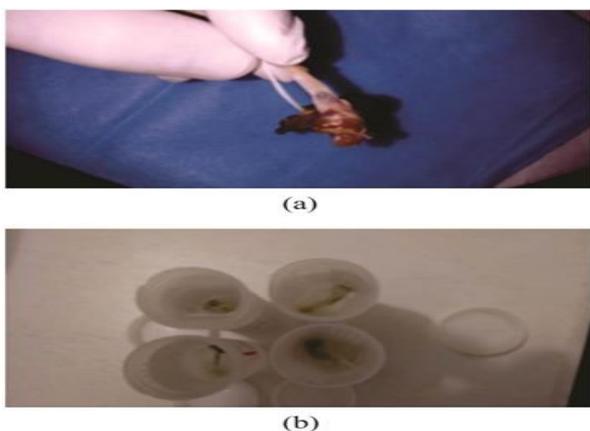
**Figura 2.** Método de imobilização do animal: (a, b) Dispositivo de imobilização de tubo de PVC (a, b); Forma de aplicação de ultrassom terapêutico no animal (c, d).

Para a imobilização dos animais durante as aplicações de ultrassom, foi empregado um dispositivo

de tubo de PVC com tampa perfurada que permitiu a respiração do animal, como observado na Figura 2.

Para acompanhamento qualitativo do processo de reparo ósseo, foi realizado controle radiológico ao sétimo dia (final da fase inflamatória), decimo quinto dia (final da fase proliferativa) e vigésimo primeiro dia (fase reparatória). As imagens foram obtidas na policlínica de veterinária da fundação educacional Dom André Arcoverde – Valença – RJ, pelo aparelho modelo ORION 100.

A eutanásia dos animais ocorreu após 30 dias do ato cirúrgico e foi realizada através de overdose do anestésico tiopental sódico 1,0g pó estéril, diluído em 10 ml de água destilada, formando uma solução 0,1g/ml. Foi ministrado em cada animal, por via intraperitoneal, a dosagem de 1,0 ml. Após a eutanásia foi realizada a retirada da tíbia direita e armazenado em um tubo contendo formalina 10%, esquematizada nas Figuras 3 (a e b).



**Figura 3.** Coleta das amostras tratadas. (a) retirada de peça anatômica para estudo; (b) Armazenamento de peça anatômica em frasco contendo formalina 10%.

Para análise das amostras foi utilizado microtomografo SkyScan Modelo 1173 do Laboratório de Instrumentação Nuclear (LIN) do Programa de Engenharia Nuclear PEN/COPPE da UFRJ, e reconstrução das projeções das seções transversais através do programa NRecon da SkyScan (versão 1.6.4.1). Técnica baseada no algoritmo feldkamp (FDK). O programa permite correção de artefatos, endurecimento de feixe e desalinhamentos durante a aquisição das imagens. Para quantificação das imagens adquiridas pela microtomografia, foi utilizado o software CTAnR1.13.5.1.

A análise histomorfológica foi realizada em laboratório terceirizado.

Para análise estatística, foi usado o programa Graph Prisma 6. Considerou-se em todas as análises um nível de 5% (valor  $\alpha = 0,05$ ) de significância estatística. Para comparação entre as médias dos grupos, foi utilizado teste não paramétrico, análise de variância (One-way – ANOVA) e o pós teste Holm-Sidak's.

### 3. RESULTADOS

Para o acompanhamento qualitativo das fases de

reparo ósseo foi realizado o acompanhamento radiográfico separados pelos períodos das fases de formação de calo ósseo, sendo a fase inflamatória correspondente aos primeiros sete dias, a fase proliferativa ocorrendo do oitavo dia ao decimo quinto dia, e a fase remodelativa do décimo sexto até o vigésimo primeiro dia após o ato cirúrgico, demonstrado nas tabelas a seguir.

**Tabela 1.** Evolução radiológica de acordo com as fases evolutivas do grupo experimental controle sem ultrassom terapêutico (GEC).

GEC	Grupo experimental controle - sem ultrassom		
	R1	R2	R3
7º DIA			
14º DIA			
21º DIA			

**Tabela 2.** Evolução radiológica de acordo com as fases evolutivas do grupo experimental submetido ao ultrassom terapêutico de 1MHz (GE1).

GE1	Grupo experimental - submetido ao ultrassom terapêutico de 1MHz		
	R1	R2	R3
7º DIA			
14º DIA			
21º DIA			

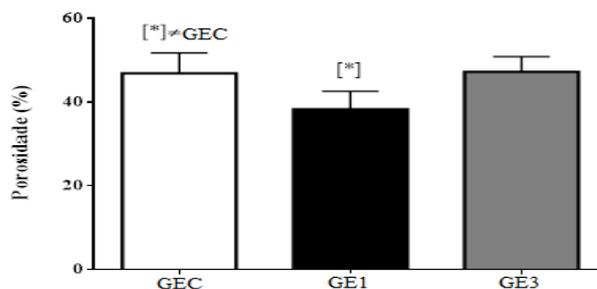
**Tabela 3.** Evolução radiológica de acordo com as fases evolutivas do grupo experimental submetido ao ultrassom terapêutico de 3MHz (GE3).

GE3	Grupo experimental - submetido ao ultrassom terapêutico de 3MHz		
	R1	R2	R3
7º DIA			
14º DIA			
21º DIA			

A avaliação microtomográfica por raio - X( $\mu$ CT) correlacionou o comportamento mecânico e resistência à fratura através de variáveis morfológicas da microarquitetura do osso trabecular, na qual o parâmetro que apresentou significância estatística entre os grupos experimentais submetidos ou não a terapia de ultrassom terapêutico foi a porosidade, onde o grupo submetido ao tratamento com ultrassom na frequência de 1MHz (GE1) apresentou o melhor quando comparado ao grupo não-ultrassonado (GEC) com  $p < 0,0480$  e ao grupo (GE3) ultrassonado com a frequência de 3MHz também com  $p < 0,0480$ .

**Tabela 4.** Grupo Controle (GEC) (Médias e Desvio Padrão dos Parâmetros Ósseos Obtidos por Microtomografia por Raio X): GE1 – Grupo Ultrassonado 1MHz; GE3 – Grupo Ultrassonado 3MHz.

	GEC S/U	GE1MHz	GE3MHz
Volume TV (mm <sup>3</sup> )	41,13	54,53	60,31
	8,36±	36,12±	35,14±
Volume ósseo	21,52	34,56	31,33
BV (mm <sup>3</sup> )	2,04±	25,36±	16,74±
BV/TV (%)	53,10	61,75	52,74
	5,95±	5,35±	4,44±
Fator Padrão Trabecular	0,69	-4,09	-1,71
Tb.Pf (mm <sup>-1</sup> )	0,54±	7,399±	3,50±
Conectividade - Conn	244,33	1592	2006,33
	207,88±	2653,50±	3294,99±
Porosidade (%)	46,89	38,24	47,25
	5,95±	5,35±	4,44±
Espaçamento entre as	0,51	0,50	0,47
Trabéculas -Tb.Th (mm)	0,02±	0,14±	0,17±
Número de Trabéculas -	1,03	1,32	1,22
Tb.N (1/mm)	0,05±	0,56±	0,49±
Separação Trabecular -	1,00	0,80	0,86
Tb.Sp (mm)	0,48±	0,49±	0,46±



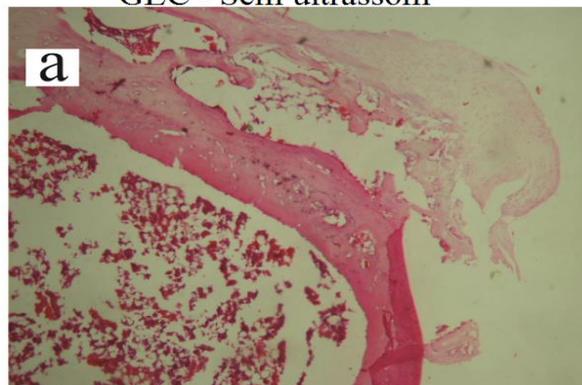
**Figura 4.** Gráfico da porosidade óssea por grupo estudado.

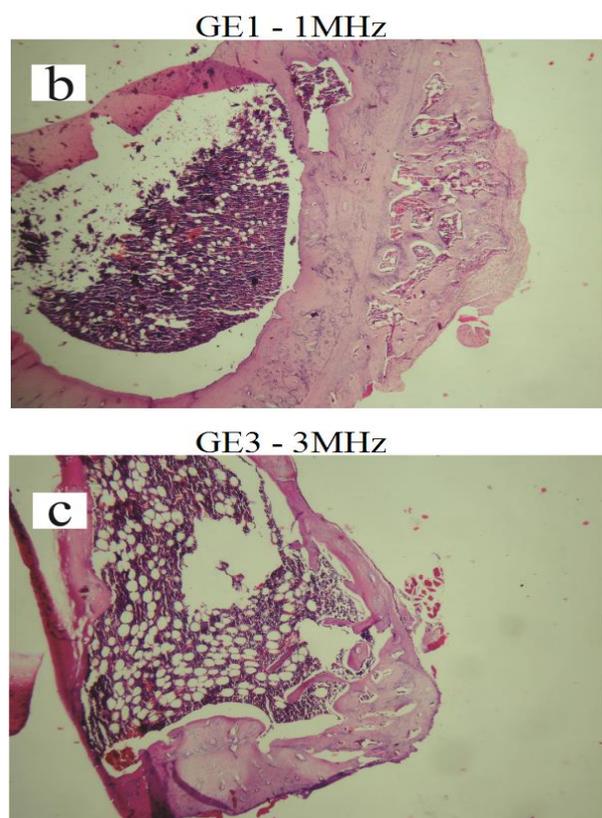
**Tabela 5.** Visualização microtomográfica 2D e 3D da reconstrução da região do reparo, separada por grupo.

GRUPO	PLANO			3D
	CORONAL	TRANSVERSAL	SAGITAL	
GEC				
GE1				
GE3				

É observado nas imagens da avaliação histológica o processo de proliferação celular. A Tabela 5 demonstra o processo de reparo ósseo nos grupos com e sem o emprego do ultrassom. A ausência de formação de calo ósseo foi verificada nos animais GEC (Figura 5 a). O emprego do ultrassom promoveu o reparo ósseo (Figura 5b e Figura 5c), sendo o efeito mais acentuado para a frequência de 1MHz (GE1) (Figura 5 b).

**GEC - Sem ultrassom**





**Figura 5.** Reparo do defeito ósseo dos grupos em laminas histológicas de 10 $\mu$ m, coradas com hematoxilina eosina (HE) aos 30 dias após ato cirúrgico. Aumento original 2,5X. (a): Grupo experimental controle sem ultrassom terapêutico; (b): Grupo experimental submetido a ultrassom terapêutico de 1MHz; (c): Grupo experimental submetido a ultrassom terapêutico de 3MHz.

#### 4. DISCUSSÃO

As amostras foram avaliadas após quatro semanas da fratura o que pode ter sido um fator para que os outros parâmetros da microarquitetura óssea não tenham sido significativamente quantitativos.

Lu (2015)<sup>7</sup> avaliou os efeitos do ultrassom terapêutico de baixa intensidade na regeneração óssea durante o processo de cicatrização osso/tendão em coelhos e o tempo de regeneração de melhor resposta ao estímulo entre 8 e 16 semanas. Seu estudo confirmou a ação ultrassônica no processo de cicatrização avaliado quantitativamente por Microtomografia por raio-X, enquanto o período de cicatrização aumentava o novo osso gradualmente se formava.

Segundo Duarte (1983)<sup>5</sup>, o ultrassom pulsado atinge o tecido por sucessão de impulsos, cada um deles resultando em um sinal elétrico como resposta do osso. Daí por diante o processo de formação é regulado pelo campo elétrico assim formado e o metabolismo ósseo é estimulado eletricamente.

No estudo comparativo sobre os efeitos osteogênicos das frequências de 1MHz e de 3MHz e o tempo de regeneração realizados em coelhos machos foi constatado que o ultrassom terapêutico de 1MHz em 8 semanas apresentou maior crescimento de osso novo quando comparado a grupos não ultrassonados e

ultrassonados na frequência de 3MHz entre 2 a 4 semanas<sup>8</sup>.

As avaliações radiográficas são eficientes para o controle das fraturas e da consolidação ósseas. A formação do calo ósseo pode ser acompanhada por meio desse método. Além de sua efetividade se mostrou um método de fácil acesso e fácil aplicação. O exame radiográfico foi amplamente utilizado para analisar a evolução da consolidação óssea em tratamentos experimentais com US de baixa intensidade<sup>9</sup>.

Para compreender a integridade óssea macroestrutural, foram utilizados parâmetros histomorfométricos calculados por microtomografia, que permitiu avaliar a microarquitetura óssea da consolidação da fratura nas tíbias dos ratos, a qual os resultados demonstraram menor porosidade nas amostras submetidas a US 1MHz.

Os resultados apresentados na análise histológica realizada concordam com os estudos de Azuma *et al.* (2001)<sup>10</sup> no qual a remodelação óssea pode ser acelerada quando exposta ao tratamento de LIPUS, 25 dias após a fratura, relacionando o efeito do ultrassom com o período da fase de reparo. Em outro estudo, Leite (2005)<sup>11</sup>, verificou que fraturas tratadas com US1MHz de frequência de repetição 100Hz apresentam aceleração de deposição de matriz óssea em áreas fraturadas.

#### 5. CONCLUSÃO

Diante dos dados apresentados, o protocolo de terapia com o US de baixa intensidade tem um efeito benéfico no remodelamento ósseo, assim como sua formação e encurtamento das fases de reparo, sendo mais evidenciado na frequência de 1MHz. Embora seja uma técnica que apresente características positivas no processo de consolidação óssea é notório a importância de novas pesquisas para que se consolide tais achados, assim como possíveis alternativas e divergências a serem encontradas, sendo assim, sugere-se mais pesquisas com maior número de amostras e diferentes tempos de aplicação.

#### AGRADECIMENTOS e FINANCIAMENTO

Agradecemos aos alunos Reginaldo Toshihiro Konatu, André Luis Reis Rangel e Liliane Lelis de Oliveira, Ana Lúcia Escada pela ajuda nos trabalhos efetuados no laboratório da FEG. Ao professor Dr. Andre Luiz Jardim Munhoz (UNICAMP) na fabricação dos scaffolds utilizados na pesquisa. Ao professor Dr. Orivaldo Lopes da Silva (USP São Carlos), pela gentileza na calibração do aparelho de ultrassom terapêutico utilizado na pesquisa. Ao professor Dr. Ricardo Tadeu Lopes e suas alunas Alessandra de Castro Machado e Olga Maria Oliveira de Araújo do Laboratório de Instrumentação Nuclear PEN- COPPE – Universidade Federal do Rio de Janeiro, pela aquisição e reconstrução das imagens microtomográficas das amostras ósseas. Ao Professor Ulisses Rodrigues Dias e Márcio Leonardo Souza

Gomes pela colaboração na aquisição das imagens das lâminas de Histologia.

Agradecemos ao Centro de Ensino Superior de Valença/Fundação Educacional Dom André Arco Verde (CESVA/FAA) que disponibilizou o setor de Biotério, os animais para os experimentos, além de disponibilizar o setor de radiologia veterinária do CESVA/FAA para os procedimentos de raios-X dos animais, e pelo programa de apoio a pesquisa da FAA (PAPAC/CESVA) pelo financiamento desta publicação.

de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo; 2005.

## REFERÊNCIAS

- [1] Silva LK. Avaliação tecnológica em saúde: densitometria óssea e terapêuticas alternativas na osteoporose pós-menopausa. *Cad Saúde Pública* 2003; 19:987-1003.
- [2] SUS gasta R\$ 70 milhões com fraturas em idosos. *FioCruz*: 2008. [Acesso 22 Mai 2018] Disponível em: <http://www.ensp.fiocruz.br/portalemsp/informe/site/materia/detalhe/10021>.
- [3] Moraes LFS, Silva EM, Silva DAS, *et al.* Expenditures on the treatment of osteoporosis in the elderly in Brazil (2008 - 2010): analysis of associated factors. *Rev bras Epidemiol* 2014. 17(3): 719-734.
- [4] Massari L, Caruso G, Sollazzo V, *et al.* Pulsed electromagnetic fields and low intensity pulsed ultrasound in bone tissue. *Clin Cases miner Bone Metab.* 2009; 6 (2): 149-154
- [5] Duarte LR. The stimulation of bone growth by ultrasound. *Arch Orth Traum Surg.*1983; 101:153-159.
- [6] Young S. Terapia por ultrassom. In: Kitchen S. *Eletroterapia de Clayton*. 10ª ed. São Paulo: Manole, 1998.
- [7] Lu H, Zheng C, Wang Z, *et al.* Effects of low-intensity Pulsed ultrasound on new trabecular bone during bone-tendon junction healing in a rabbit model: A Synchrotron Radiation Micro-CT study. *PLoS ONE*. 2015;10(4): e0124724. [Acesso 22 Mai 2018] Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124724>
- [8] Takebe H, Nakanishi Y, Hirose Y, *et al.* Effect of low intensity pulsed ultrasound stimulation on sinus augmentation in rabbits. *Clinical Oral Implants Research* 2014. 25(6): 735-741.
- [9] Sousa VL. efeitos do ultrassom de baixa intensidade sobre a consolidação óssea em fraturas de ossos longos (radio e ulna, fêmur, tíbia e fíbula) em cães (*canis familiaris*). [Tese de mestrado] São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo; 2003.
- [10] Azuma Y, Ito M, Takagi H, *et al.* Low-intensity pulsed ultrasound accelerates rat femoral fracture healing by acting on the various cellular reactions in the fracture callus. *J Bone Miner Res* 2001; 16(4):671-80.
- [11] Leite VL. Estudo comparativo do efeito do ultrassom de 1Mhz com frequência de repetição de pulso de 100Hz e 16Hz no tratamento de fratura de fíbula de rato. [Dissertação de Mestrado] São Paulo: Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto