

AVALIAÇÃO POR MICROTOMOGRAFIA DE RAIOS-X DO REPARO ÓSSEO EM TÍBIA DE RATOS APÓS TRATAMENTO COM LIPUS E LASER

A. R. Paolillo* **, F. R. Paolillo**, A. H. Silva*, R. B. M. Reiff***, V. S. Bagnato** e J. M. Alves*

* Programa de Pós – Graduação Interunidades em Bioengenharia da Universidade de São Paulo (USP) - Escola de Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Carlos, São Carlos, Brasil

** Instituto de Física de São Carlos (IFSC) da Universidade de São Paulo (USP), São Carlos, Brasil

*** Departamento de Medicina da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, Brasil

e-mail: arpaolillo@gmail.com

Resumo: Os objetivos deste estudo foram: a) investigar os efeitos do ultrassom de baixa intensidade (LIPUS) e do laser infravermelho de baixa potência (LLLT), individualmente e associados, sobre o reparo ósseo de fratura total transversa com retardo de consolidação em tibia de ratos; b) utilizar a microtomografia por raios-x (μ CT) na avaliação do reparo ósseo. Uma osteotomia total em tibia de ratos foi fixada com fio de Kirschner (0,89mm de espessura) e utilizado um espaçador polimérico (2mm de espessura e 1mm de diâmetro) entre os fragmentos proximal e distal para induzir o retardo de consolidação da fratura. Foram utilizados 24 animais separados aleatoriamente em 4 grupos experimentais: Grupo Controle – sem tratamento do retardo da consolidação; Grupo LIPUS – tratamento com LIPUS (1,5MHz; ciclo de trabalho 1:4; intensidade de 30W/cm²; 20 minutos por sessão); Grupo LLLT – tratamento com LLLT (808nm; 100mW; 2500mW/cm²; 125J/cm² durante 50 segundos); Grupo LIPUS+LLLT – tratamento com associação das tecnologias (LLLT aplicado perpendicularmente ao LIPUS no décimo minuto de aplicação do LIPUS). Os tratamentos foram iniciados após 5 semanas da cirurgia e realizados durante 5 dias consecutivos, seguidos por 2 dias sem tratamento até totalizarem 12 sessões terapêuticas. Após a eutanásia foram realizadas avaliações por μ CT para análise do reparo ósseo. A análise estatística utilizou a ANOVA one-way com post-hoc de Tukey. Constatou-se diferença significativa nos resultados para a densidade de conectividade (Conn.D – mm⁻³) do Grupo LIPUS+LLLT. A μ CT é uma técnica de grande potencial que permite análises qualitativas, quantitativas e reconstruções 2D e 3D de fraturas ósseas experimentais.

Palavras-chave: Microtomografia por raios-x, reparo ósseo, ultrassom, laser.

Abstract: The aims of this study were: a) to evaluate the effects of low pulsed intensity ultrasound (LIPUS) and infrared low level laser therapy (LLLT) in the bone repair of a transverse rat tibia fracture with delayed union: b) to assess the fracture repair by x-ray microtomography (μ CT). An easily implemented

transverse osteotomy with a Kirschner wire and 2mm width polymeric spacer beads established a delayed union in the fracture. Twenty four rats were divided into four experimental groups: Control Group – untreated; LIPUS Group – treated with LIPUS (1,5MHz, 1:4 duty cycle, 30mW/cm², 20 minutes); Laser Group – treated with infrared LLLT (808nm, 100mW, 2500mW/cm², 125J/cm², 50 seconds); LIPUS+Laser Group – treated with LIPUS plus LLLT (when these therapies were used simultaneously there was a 90° angle between the laser and the ultrasound beams). The treatments with infrared LLLT and LIPUS started 5 weeks after the surgery following a sequence of 5 days on and 2 days off until 12 sessions were reached. The surgical technique and the bone repair were assessed by x-ray radiography. The One-way analysis of variance (one-way ANOVA) and Tukey post-hoc were used for statistical analysis. There was significant difference between treatments result for the parameter connectivity density (Conn.D – mm⁻³) in the LIPUS+Laser Group. The μ CT is a powerful technique that allows 3D quantitative analysis and 2D and 3D reconstructions of the bone repair.

Keywords: X-ray microtomography, bone healing, ultrasound, laser.

Introdução

As fraturas têm impacto econômico e social sendo um dos maiores problemas do sistema de saúde público e privado, devido aos elevados custos com o tratamento e alto índice de morbidade/mortalidade [1,2]. Na medicina ortopédica são utilizados e investigados novos tratamentos para o reparo ósseo, principalmente em complexos quadros clínicos, como no atraso ou ausência de consolidação das fraturas. As áreas de pesquisas relacionadas à bioengenharia tem contribuído significativamente na busca de novas terapias para o tratamento de fraturas e monitoramento da evolução do reparo ósseo.

Uma resposta adequada de reparo ósseo, normalmente, exige o uso de métodos mecânicos de fixação do local da fratura, como as osteossínteses

metálicas [3]. O reparo pode ser estimulado e/ou acelerado por métodos biológicos invasivos, por exemplo, os enxertos ósseos, hormônios, fatores de crescimento ou por métodos biofísicos não invasivos, como o ultrassom de baixa intensidade (LIPUS), os campos eletromagnéticos e o laser infravermelho de baixa potência (LLLT) [4,5].

A microtomografia por raio-x (μ CT) tem sido utilizada para a visualização 2D e 3D, bem como, para quantificação do reparo ósseo [6,7,8].

O objetivo deste estudo consistiu em: a) investigar os efeitos do ultrassom de baixa intensidade (LIPUS) e do laser infravermelho de baixa potência (LLLT), individualmente e associados, sobre o reparo ósseo de fratura transversa com retardo de consolidação em tibia de ratos; b) utilizar a microtomografia por raio-x (μ CT) na avaliação do reparo ósseo.

Materiais e métodos

Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo “Comitê de Ética em Experimentação Animal” da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), conforme Parecer nº. 050/2011.

Animais – Foram utilizados 24 ratos machos da linhagem Wistar com peso corporal médio entre 400 e 500 gramas (g). Os animais foram pesados, anestesiados e tricotomizados. Posteriormente foi realizada assepsia da pele, que recobre o músculo e o osso tibial, para o procedimento cirúrgico.

Indução do retardo de consolidação – Uma incisão longitudinal de aproximadamente 2cm foi realizada sobre a superfície anterior da tibia direita dos ratos, abaixo da articulação do joelho. Os músculos foram afastados com pinça para permitir a exposição da região antero-medial superior da tibia para realização da osteotomia no terço médio desse osso. As fraturas foram obtidas por meio de osteotomias totais e transversais estabilizadas com Fio de Kirschner (0,89mm diâmetro). O modelo de indução do retardo [9] utilizou um espaçador polimérico de 2mm de espessura e 1mm de diâmetro interno colocado entre os fragmentos proximal e distal da fratura. O espaçador era transparente para minimizar alterações na reflexão, transmitância, absorvância e espalhamento da radiação por laser. Após a realização da osteotomia, os músculos foram reaproximados e a pele foi suturada com fio de náilon monofilamentar 4.0.

Grupos de Tratamento – Vinte e quatro animais foram aleatoriamente distribuídos em 4 grupos: i) Grupo Controle: fratura sem tratamento por LIPUS e/ou LLLT; ii) Grupo LIPUS: fratura com tratamento por LIPUS; iii) Grupo LLLT: fratura com tratamento por LLLT; e iv) Grupo LIPUS+LLLT: fratura com tratamento por LIPUS associado ao LLLT.

Intervenção terapêutica – Após cinco semanas do procedimento cirúrgico, com ausência de consolidação da fratura comprovada por raio-x, os tratamentos foram iniciados e realizados durante 5 dias consecutivos, seguidos por 2 dias sem tratamento até totalizarem 12

sessões terapêuticas [10]. O tratamento com LIPUS utilizou o equipamento Exogen® Bone Healing System (Exogen, Inc., Piscataway, NJ, USA) que transmite ultrassom pulsado de baixa intensidade com frequência de 1,5MHz, ciclo de trabalho 1:4 e intensidade SATA de 30mW/cm². O tempo de aplicação foi de 20 minutos por sessão em modo estacionário utilizando-se gel sobre a pele tricotomizada na região fraturada [11]. A dosimetria do equipamento de ultrassom foi realizada utilizando-se a balança de radiação acústica Ultrasound Power Meter UPM-DT-1 (Ohmic Instruments, EUA). Para a laserterapia [12] foi utilizado laser de arsenieto de gálio e alumínio, infravermelho e em modo contínuo (808nm; 0,04cm² de área do feixe; 100mW de potência) durante 50 segundos, o que equivale a dose de 125J/cm² transmitido pelo equipamento Twin Laser® (MM Optics, São Carlos, SP, Brasil). A aplicação foi realizada pela técnica pontual e modo contato (1 ponto) com a ponteira do equipamento posicionada perpendicularmente ao local da fratura para que não ocorresse perda de energia. Para associar o tratamento do LIPUS ao LLLT iniciou-se a sessão com a aplicação do LIPUS. No décimo minuto foi realizada, simultaneamente, a aplicação de LLLT durante 50 segundos e a aplicação de LIPUS prosseguiu até o 20º minuto sem interrupção. O LLLT foi aplicado perpendicularmente ao LIPUS, conforme o estudo relatado na literatura [13].

Eutanásia e coleta das amostras – A eutanásia dos animais ocorreu por meio de overdose de anestésico após 24 horas da última sessão terapêutica (58 dias do procedimento cirúrgico). Após a eutanásia foi realizada a ressecção cirúrgica completa da tibia direita, que foi armazenada com gaze banhada em solução salina e congelada à -20°C para avaliação microtomográfica.

Microtomografia por raio-x – A aquisição das projeções e a reconstrução das amostras ósseas foram realizadas pelo microtomógrafo de raio-x (modelo 1172, SkyScan, Bélgica) da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo sendo utilizados os seguintes parâmetros para o escaneamento microtomográfico: voltagem de 100kV; corrente de 100 μ A; filtro de Al+Cu e resolução de 9.92 μ m. A região óssea analisada (VOI) compreendeu 300 secções acima e abaixo da região central da fratura, totalizando 601 secções ou 5,96mm. Na análise morfométrica 3D dos parâmetros volume ósseo (BV) compreendido na VOI e densidade de conectividade de Euler (Conn.D) foram utilizados os softwares CT-Analyzer (Bruker, Bélgica), NRecon fornecidos pelo fabricante do microtomógrafo e o Mimics (Materialise, Bélgica). A densidade de conectividade é a conectividade de Euler (Conn) de uma estrutura por unidade de volume.

Análise estatística – O software Statistica for Windows Release 7 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA) foi utilizado nessa análise. A normalidade da distribuição dos resultados foi analisada pelo teste de Shapiro-Wilk e a homocedasticidade das variâncias pelo teste de Levene. Foi utilizada a análise de variância (ANOVA One-Way) para comparação intergrupos. Resultados

significativos foram submetidos ao teste de post-hoc de Tukey. O nível de significância estatística adotado foi de 5% ($p < 0.05$).

Resultados

Foi constatada diferença significativa para a densidade de conectividade no grupo LIPUS+LLLT comparado ao controle, conforme Tabela 1. Entretanto, não houve diferenças significativas no volume ósseo (BV - mm^3) das regiões ósseas analisadas (VOI).

Tabela 1: Médias e desvios padrão dos parâmetros ósseos morfométricos e topológicos obtidos por microtomografia por raio-x.

Grupos	Volume Ósseo (BV - mm^3)	Densidade de Conectividade (Conn.D - mm^{-3})
Controle	47,36 ± 8,17	193.17 ± 79.10
LIPUS	49,29 ± 7,24	252.33 ± 78.80
LLLT	59,97 ± 19,08	231.31 ± 88.37
LIPUS+LLLT	45,57 ± 13,58	289.80 ± 111.31*

* $p < 0,05$

Discussão

Agentes físicos, como o LIPUS e o LLLT aceleram o processo de reparação óssea [14,15], mas somente um estudo [13] avaliou os efeitos dessas tecnologias associadas sobre a fratura parcial do fêmur. Os autores constataram que o LLLT acelerou o processo de reparação óssea comparado ao grupo controle e quando o ultrassom foi adicionado ao tratamento, o periosteio apresentou-se mais desenvolvido em comparação aos outros grupos.

Neste contexto a investigação aqui descrita é pioneira na utilização da técnica da μCT para avaliar o processo de reparo ósseo de uma fratura após o tratamento com a aplicação sinérgica do LIPUS e LLLT. Após o sacrifício dos animais observou-se que o espaçador polimérico não foi absorvido pelo organismo. Isto pode ter causado um quadro mais severo de fratura (não união óssea ou pseudoartrose) e não um quadro de retardo de consolidação óssea, como previsto no modelo experimental. A absorção do espaçador pelo organismo é necessária para se comparar a eficiência de diferentes tecnologias de tratamento de fratura.

O efeito terapêutico das tecnologias, avaliado por μCT , foi o aumento da conectividade na região óssea analisada (VOI) evidenciada pelos maiores valores da densidade de conectividade (Conn.D - mm^{-3}) nas fraturas tratadas por LIPUS e/ou LLLT. Esses tratamentos não tiveram efeito terapêutico no volume ósseo compreendido na VOI.

Estudos [7,8] demonstraram que a avaliação do reparo ósseo em fraturas pode ser realizada com maior ou menor resolução microtomográfica. No estudo de Morgan et al. foram analisadas as mudanças na estrutura

e composição do calo de uma fratura como indicativo das propriedades mecânicas. A μCT com resolução de $12\mu\text{m}$ e testes de torção foram utilizados para a avaliação do calo ósseo em fêmur de ratos. O calo foi isolado do tecido mineralizado a partir da reconstrução microtomográfica com o uso de um número maior de níveis de cinza (16 bits). No estudo de Salmon foram realizadas, em uma VOI contendo a fratura, análises do tecido mineralizado e não mineralizado neoformado (calo ósseo) e do tecido mineralizado em conjunto com o tecido não mineralizado. Foi utilizada uma resolução de $28\mu\text{m}$ e o mesmo número de níveis de cinza da presente investigação (8 bits).

Em nossa investigação, a VOI analisada compreendeu o tecido mineralizado em conjunto com o tecido não mineralizado. Não foi possível separar o calo ósseo. Portanto, sugere-se investigar a otimização dos parâmetros de níveis de cinza e resolução microtomográfica que permitam separar o tecido neoformado de reparo (calo) do tecido mineralizado em modelos experimentais de fratura em animais utilizando-se, por exemplo, uma resolução menor que $9.92\mu\text{m}$.

É recomendável uma investigação com uma amostra maior de animais em cada grupo experimental, ainda que esse fator não tenha contribuído significativamente nos resultados observados.

A μCT é uma técnica não destrutiva que possui grande potencial investigativo, pois permite realizar análises qualitativas e quantitativas e a reconstrução de um objeto em 2D e 3D com resolução micrométrica ou nanométrica [16]. Neste estudo, este potencial foi parcialmente utilizado, pois a resolução e/ou os níveis de cinza usados na segmentação 2D não permitiram a separação do calo presente no reparo ósseo da fratura.

Conclusão

Nesta investigação constatou-se pela μCT o aumento da conectividade do tecido de reparo ósseo em fraturas de tibia de ratos tratadas por LIPUS e LLLT associados, por meio da quantificação da densidade de conectividade (Conn.D - mm^{-3}). A μCT apresenta grande potencial para a avaliação de tecnologias de tratamento de fraturas.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq (Processo N°. 573587/2008) e à FAPESP (Processo N°. 2013/07276-1 e 2013/14001-9).

Referências

- [1] Keen R. Osteoporosis: strategies for prevention and management. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*. 2007; 21(1): 109-122.
- [2] Cardozo RT et al. Tratamento das fraturas diafisárias da tibia com fixador externo comparado com a haste intramedular bloqueada. *Revista Brasileira de Ortopedia*. 2013; 48(2): 137-144.

- [3] Einhorn TA. Enhancement of fracture-healing. *Journal Bone Joint Surgery Am.* 1995; 77: 940–56.
- [4] Marsell R, Einhorn TA. Emerging bone healing therapies. *Journal of Orthopaedic Trauma.* 2010; 24 (3), supplement.
- [5] Pretel H, Lizarelli RFZ, Ramalho, LTO. Effect of low-level laser therapy on bone repair: histological study in rats. *Lasers in Surgery and Medicine.* 2007; 39: 788-796.
- [6] Paolillo AR. Avaliação por microtomografia de raios-x do reparo ósseo em osteotomia completa de tibia de ratos após tratamento com ultrassom de baixa intensidade e laser de baixa potência [tese]. São Carlos: Universidade de São Paulo; 2013.
- [7] Morgan EF et al. Micro-computed tomography assessment of fracture healing: relationships among callus structure, composition, and mechanical function. *Bone.* 2009; 44 (2): 335-44.
- [8] Salmon PL et al. Quantification for micro-CT of the architectural changes in bone and callus in a rat closed fracture healing model. *Orthopaedic Research Society.* 2012, Rosemont, Illinois, EUA.
- [9] Miles JD et al. Rat tibial osteotomy model providing a range of normal to impaired healing. *Journal of Orthopaedic Research.* 2011; 29: 109-115.
- [10] Lirani-Galvão AP, Jorgetti V; da Silva OL. Comparative study of how low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasound affect bone repair in rats. *Photomedicine and Laser Surgery.* 2006; 24(6): 735-740.
- [11] Oliveira P et al. Comparison of the effects of low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasound on the process of bone repair in the rat tibia. *Revista Brasileira de Fisioterapia.* 2011; 15(3): 200-205.
- [12] Bossini PS et al. Low level laser therapy (830nm) improves bone repair in osteoporotic rats: similar outcomes at two different dosages. *Experimental Gerontology.* 2012; 47, 136-142.
- [13] Al-Habib MF et al. Histological observation related to the use of laser and ultrasound on bone fracture healing. *The International Medical Journal Malaysia.* 2011; 10 9(2): 29-35.
- [14] Snyder BM, Conley J, Koval KJ. Does low-intensity pulsed ultrasound reduce time to fracture healing? A meta-analysis. *American Journal of Orthopedics.* 2012; 41: E12-19.
- [15] Pinheiro ALB, Gerbi MEMM. Photoengineering of bone repair processes. *Photomedicine and Laser Surgery.* 2006; 24 (2): 169–178.
- [16] Majumdar KS, Bay BK. Noninvasive assessment of trabecular bone architecture and the competence of bone. *Advances in Experimental Medicine and Biology,* Springer, 2013.