



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

ISABELLA DA COSTA GAGLIARDI

**AVALIAÇÃO BIOMECÂNICA DO REPARO ÓSSEO EM TÍBIAS DE RATO:
ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DA ONDA DE CHOQUE FOCAL**

CAMPINAS

2020

ISABELLA DA COSTA GAGLIARDI

AVALIAÇÃO BIOMECÂNICA DO REPARO ÓSSEO EM TÍBIAS DE RATO:
ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DA ONDA DE CHOQUE FOCAL

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Ciências, na área de Fisiopatologia Cirúrgica.

ORIENTADOR: PROF. DR. WILLIAM DIAS BELANGERO

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA
ALUNA ISABELLA DA COSTA GAGLIARDI, E ORIENTADA PELO
PROF. DR. WILLIAM DIAS BELANGERO.

CAMPINAS

2020

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

G121a Gagliardi, Isabella da Costa, 1987-
Avaliação biomecânica do reparo ósseo em tíbias de rato : análise da influência da onda de choque focal / Isabella da Costa Gagliardi. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: William Dias Belangero.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Consolidação da fratura. 2. Osso esponjoso. 3. Tratamento por ondas de choque extracorpóreas. 4. Resistência ao cisalhamento. 5. Experimentação animal. I. Belangero, William Dias, 1952-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Biomechanical evaluation of tibial bone healing in rats : analysis of the role of focused shockwave therapy

Palavras-chave em inglês:

Fracture healing
Cancellous bone
Extracorporeal shockwave therapy
Shear strength
Animal experimentation

Área de concentração: Fisiopatologia Cirúrgica

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

William Dias Belangero [Orientador]
Hélio Jorge Alvachian Fernandes
Bruno Livani

Data de defesa: 30-10-2020

Programa de Pós-Graduação: Ciências da Cirurgia

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)
- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-5508-5203>
- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/3527833542044514>

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

ISABELLA DA COSTA GAGLIARDI

ORIENTADOR: WILLIAM DIAS BELANGERO

MEMBROS:

- 1. PROF. DR. WILLIAM DIAS BELANGERO**
- 2. PROF. DR. HÉLIO JORGE ALVACHIAN FERNANDES**
- 3. PROF. DR. BRUNO LIVANI**

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Data de defesa: 30/10/2020

À minha avó Angelina Andreutti Gagliardi, conseguimos!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por todas as graças concedidas.

Ao meu orientador, Prof Dr William Dias Belangero pela oportunidade, incentivo e mentoria, não apenas para concretização desta dissertação mas por tudo desde início da minha residência médica. Seus ensinamentos com certeza me tornaram melhor médica e melhor pesquisadora.

Aos meus pais, Maria José e Enivaldo, pelo amor incondicional e pelo incentivo ao estudo desde a infância, por me proporcionarem as bases que me permitiram abrir asas para percorrer meus sonhos. Ao meu caçula, Francisco, por estar sempre presente e por toda diversão nesses anos todos.

Ao meu companheiro de todas as horas, Felipe Lins Rossi, por sua presença e incentivo contínuo. Obrigada por toda ajuda, paciência, compreensão e companheirismo.

Aos meus avós: Angelina, meu eterno colo; Hortêncio, grande incentivador da semente acadêmica e Nair sempre comigo.

Aos queridos José Ricardo Lenzi Mariolani e Nilza Alzira Batista por todo auxílio, conselhos e disponibilidade: sem vocês esse projeto não teria saído do papel.

Ao Dr Reinaldo Mitsuo Itoda, mestre e amigo, pelos ensinamentos e por sua presença em toda minha trajetória ortopédica, sempre com palavras certas para tornar a rotina mais leve.

Ao amigo Henrique Mathias Santarosa, por me ouvir e ajudar tantas vezes, tanto no mestrado quanto na vida.

Ao amigo Lucas Moratelli pela inestimável ajuda e por toda a torcida.

À querida Cláudia Celis, por todas as risadas.

A toda minha família (Costa, Gagliardi, Rossi, Moraes e Lins) e amigos por entenderem minha ausência e sempre estarem ao meu lado.

Aos meus pequenos peludos, alegria da casa.

A todos os professores que permitiram que eu trilhasse meu caminho e chegasse até aqui.

À Universidade Estadual de Campinas, minha segunda casa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, processo nº 2014/26729-0, pelo financiamento deste estudo com parte do Auxílio Regular intitulado “Estudo Biomecânico e Biomolecular de Métodos Terapêuticos de Regeneração Óssea”.

À CAPES: O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de financiamento 001, nº 88882.435118/2019-0.

A todos os animais que contribuem para o avanço da ciência: que suas vidas não sejam em vão.

Essa conquista é de todos vocês, muito obrigado!

RESUMO

Após a fratura de um segmento ósseo inicia-se o processo de reparo para restabelecer a sua continuidade. Entretanto, em cerca de 5 a 10% das fraturas algum distúrbio de consolidação pode ocorrer, impedindo o reestabelecimento completo da sua continuidade e função. Vários métodos terapêuticos menos invasivos vem sendo estudados para otimizar este processo de reparo ósseo, dentre eles, a terapia extracorpórea por ondas de choque. Entretanto, ainda não existem evidências suficientes para indicar seu uso em fraturas agudas. A terapia por ondas de choque consiste em um estímulo mecânico que, através da mecanotransdução, desencadeia uma série de respostas celulares, que atuam sobre as vias de sinalização da osteogênese. Sendo o osso um tecido especializado no suporte de carga, a avaliação do seu desempenho mecânico ao longo do processo de reparo é fundamental e significativa do ponto de vista clínico.

A finalidade do presente estudo foi avaliar, por meio do ensaio mecânico de cisalhamento, a qualidade do tecido ósseo neoformado de modo comparativo quando submetido a ondas de choque focal. Foram produzidos defeitos monocorticais de 3,2 mm de diâmetro e com 1,5 mm de profundidade na metáfise proximal das tíbias direita e esquerda de vinte e um ratos Wistar adultos. Ao final do procedimento, com a pele suturada, ainda sob anestesia, os animais foram estimulados com única sessão de ondas de choque focal de 500 pulsos a $0,12 \text{ mJ/mm}^2$ e frequência constante de 4 Hz. Após uma, duas e três semanas de seguimento, a região do defeito ósseo foi documentada por estereomicroscopia e submetida a ensaio mecânico de cisalhamento. Os resultados foram comparados com grupo Controle que seguiu a mesma metodologia, porém sem o uso da onda de choque.

Pelas imagens da estereomicroscopia do espécime, foi possível identificar o posicionamento dos defeitos e observar a sua evolução temporal. Tanto no grupo Controle (sem estímulo) quanto no grupo Onda (estimulado com onda focal), a partir da segunda semana foi difícil identificar os limites da área perfurada.

A força para cisalhar o tecido ósseo neoformado após uma semana de seguimento foi significativamente maior no grupo Onda quando comparado com o grupo Controle ($p = 0,000$). Entretanto, diferença significativa não foi observada após duas e três semanas de seguimento entre os dois grupos.

A terapia por ondas de choque focal alterou a qualidade do tecido de reparo, aumentando sua resistência ao cisalhamento na primeira semana após o estímulo quando comparada ao grupo Controle para o mesmo tempo de seguimento ($p = 0,000$).

Palavras-chave: Consolidação da Fratura; Osso Esponjoso; Tratamento por Ondas de Choque Extracorpórea; Resistência ao Cisalhamento; Experimentação Animal.

ABSTRACT

After a fracture, the bone healing process begins, in order to restore the integrity of the bone. However, 5 to 10 % of them may develop some kind of healing disorder, preventing the complete re-establishment of anatomy and function. Several less invasive therapeutic methods have been studied to optimize the healing process, among them, extracorporeal shockwave therapy. However in acute fractures' treatment, the role of extracorporeal shockwave therapy remains unclear.

The mechanical stimulus provided by the extracorporeal shockwave therapy triggers, through mechanotransduction, a cellular response in the healing process, acting on osteogenesis signalling pathways. Since the bone is a weight bearing specialized tissue, its mechanical performance evaluation during the healing process is clinically crucial and significant.

Our goal was to evaluate the quality of bone exposed to shockwave therapy, by biomechanical analysis. Monocortical defects, 3,2 mm wide and 1,5 mm deep, were drilled in proximal tibial metaphysis of twenty-one adult Wistar rats. Immediately after surgery, with skin sutures in place, still under anaesthesia, a session of 500 focused extracorporeal shockwaves of 0,12 mJ/mm² at a rate of 4 Hz was performed. After one, two and three weeks, the defect sections were analyzed by stereomicroscopy and submitted to shear stress test. The results were compared to a control group from a fellow researcher from the Laboratório de Biomecânica em Ortopedia, following the same method, except for the shockwave therapy.

From the stereomicroscopy, the defect's placement was confirmed as well as the healing progression. Both in the Control group (without shockwave therapy) and in the Wave group (submitted to shockwave therapy), from the second week on, the defects borders were hardly distinguishable.

The shear strength after one week follow up was higher on the Wave group than in the Control group ($p=0,000$). However, no significant difference was noted between the two groups after two and three weeks of follow up.

Focused Extracorporeal Shockwave Therapy modified the quality of the repair tissue, increasing its shear strength in the first week after the stimulus when compared to the Control group with the same follow-up time.

Keywords: Fracture Healing; Cancellous Bone; Extracorporeal Shockwave Therapy; Shear Strength; Animal Experimentation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Representação esquemática da microanatomia do tecido ósseo cortical, explicitando seu sistema canalicular composto por canais de Havers, canais de Volkmann e canaliculos.

Figura 2. Modelo de amplificação do estímulo mecânico. O fluxo do fluido canalicular resultante da força deformante produz uma força de arrasto que em contato com as estruturas canaliculares, gera deformações circulares (“*hoop strains*”), aumentado de 20 a 100 vezes a força deformante inicial. Além disso, esse fluxo de fluido produz tensão de cisalhamento, estimulando mecanicamente a célula.

Figura 3. Esquemática da estrutura hierárquica do osso desde uma escala macroscópica até nanoscópica. Essa hierarquização permite diferentes mecanismos de dissipação de energia para cada nível, conferindo ao osso propriedades mecânicas únicas entre os materiais.

Figura 4. Típica curva força (“*stress*”) x deformação (“*strain*”) apresentada pelo osso. A porção inicial da curva representa a fase de deformidade elástica do osso. A tensão de escoamento (σ_e) caracteriza o início da deformidade plástica do osso e o limite da resistência (σ_r) corresponde à máxima tensão suportada previamente à fratura.

Figura 5. Representação esquemática de ensaios mecânicos tradicionais, utilizados para análise mecânica do osso. As setas azuis representam as cargas aplicadas aos corpos de prova.

Figura 6. Aspecto típico de uma onda de choque, com fase compressiva de curta duração e com alto valor de pico pressórico, seguida por uma fase de rarefação.

Figura 7. Posicionamento do animal em mesa cirúrgica, após preparo adequado das patas posteriores.

Figura 8. Etapas da intervenção cirúrgica. **a)** A seta aponta a localização da incisão em face medial da tíbia proximal **b)** Incisão longitudinal medial na pele da região proximal das tíbias direita e esquerda **c)** Exposição medial da metáfise proximal da tíbia (sulco extensor medial), proximal à inserção dos tendões isquiotibiais **d)** Produção de defeito ósseo monocortical de 3,2mm de diâmetro e 1,5mm de profundidade, através do uso de uma broca helicoidal de 3,2mm com limitador para profundidade de 1,5mm em furadeira de baixa rotação (130 rpm) **e)** Defeito ósseo produzido, após irrigação com solução fisiológica para eliminação de fragmentos

ósseos **f)** Sutura simples da pele com fio mononylon 3.0 e limpeza em toda extensão da ferida produzida com soluções de clorexidina 2% e fisiológica.

Figura 9. a) Dispositivo eletro-hidráulico Evotron (Switech Medical-Activator Vet) utilizado para aplicação das ondas de choque **b)** Sessão de estimulação com posicionamento do probe.

Figura 10. Acondicionamento dos animais no pós-operatório. **a)** Animais acondicionados em caixa de polipropileno com 3 animais em cada uma **b)** Dependências do Biotério Multidisciplinar do NMCE **c)** Caixas com os animais alojados em estantes ventiladas com parâmetros sanitários, físicos, químicos e biológicos controlados.

Figura 11 a) Incisão longitudinal ampla realizada para extração óssea. **b)** Aspecto da tibia após desarticulação. A seta aponta para o local onde foi feito o defeito ósseo monocortical, com o tecido neoformado preservado.

Figura 12. Amostras incluídas à vácuo em resina Epóxi a frio. **a)** Amostra em resina sem corte **b)** Amostra embutida e já cortada com 0,9mm de espessura **c)** Amostra pronta com o defeito delimitado para a realização da aquisição de imagem por estereomicroscópio e de teste de cisalhamento.

Figura 13. Representação esquemática do ensaio de cisalhamento.

Figura 14. Ensaio de cisalhamento de amostra em máquina de ensaio EMIC DL300. A marcação das bordas dos defeitos com tinta permanente (seta) facilitava a identificação dos mesmos, garantindo um melhor posicionamento do punção. Notar que o punção é posicionado perpendicularmente ao centro da área em consolidação.

Figura 15. Aspecto macroscópico do defeito ósseo do grupo Controle, observado em lupa em três diferentes aumentos, de acordo com o tempo de seguimento: 1 semana (**a,b,c**), 2 semanas (**d,e,f**) e 3 semanas (**g,h,i**). Foram utilizados aumento de 1.0X (imagens **a,d,g**), 2.5X (imagens **b,e,h**) e 4.0X (imagens **c,f,i**).

Figura 16. Aspecto macroscópico do defeito ósseo do grupo Onda, observado em lupa em três diferentes aumentos, de acordo com o tempo de seguimento: 1 semana (**a,b,c**), 2 semanas (**d,e,f**) e 3 semanas (**g,h,i**). Foram utilizados aumento de 1.0X (imagens **a,d,g**), 2.5X (imagens **b,e,h**) e 4.0X (imagens **c,f,i**).

Figura 17. Gráfico da força necessária para produzir o cisalhamento em cada grupo na semana 1.

Figura 18. Gráfico da força necessária para produzir o cisalhamento em cada grupo na semana 2.

Figura 19. Gráfico da força necessária para produzir o cisalhamento em cada grupo na semana 3.

Figura 20. Gráfico da força necessária para produzir o cisalhamento, em função das diferentes semanas, no grupo Controle.

Figura 21. Gráfico da força necessária para produzir o cisalhamento, em função das diferentes semanas, no grupo Onda.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resposta da célula óssea de acordo com a deformação relativa (*strain*) incidente.

Tabela 2. Fatores que influenciam na consolidação de fraturas.

Tabela 3. Distribuição de animais de acordo com grupo experimental (Controle vs Onda) e o tempo de seguimento (1, 2 ou 3 semanas).

Tabela 4. Médias e desvios padrões da massa corpórea e da idade dos animais na data do procedimento cirúrgico em função do grupo (Controle vs Onda) e do tempo de seguimento (semanas 1, 2 e 3).

Tabela 5. Médias e desvios padrões das forças máximas de cisalhamento (N) nas semanas 1, 2 e 3 em função do grupo (Controle vs Onda).

Tabela 6. Variação das médias das forças máximas de cisalhamento (N) entre as semanas estratificada pelo grupo.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP: *Adenosina Triphosphate*

Akt: Akutely transforming

BMP: *Bone Morphogenetic Protein*

CEMIB: Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica

ERK: *Extracellular signal-regulated kinase*

FAK: *Focal Adhesion Kinase*

FGF: *Fibroblast Growth Factor*

HE: Coloração Hematoxilina Eosina

HCL: Ácido Clorídrico

σ_e : Tensão de escoamento

σ_r : Limite de resistência

ϵ_e : Deformação no escoamento

$\mu\epsilon$: microstrain

IGF-1: *Insulin-like Growth Factor – I*

IL: Interleucina

ISMST: The International Society for Medical Shockwave Treatment

LABIMO: Laboratório de Biomateriais em Ortopedia

M-CSF: *Macrophage Colony-Stimulating Fator*

NCME: Núcleo de Cirurgia e Medicina Experimental

NO: Óxido nítrico

MEC: Matriz extracelular

OPG: Osteoprotegerina

PDGF: *Platelet-Derived Growth Factor*

PEM: Matriz pericelular

RANKL: Receptor de ativação do fator nuclear kappa B

SMBTOC: Sociedade Médica Brasileira de Tratamento por Ondas de Choque

TGF- β : *Transforming Growth Factor- β*

TNF- α : *Tumor Necrosis Factor - α*

TOC: Terapia por Ondas de Choque

VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
2. OBJETIVOS.....	20
2.1. Objetivo Geral.....	20
2.2. Objetivos específicos.....	20
3. REVISÃO DA LITERATURA	21
3.1. Biologia e arquitetura óssea	21
3.2. Mecanotransdução.....	24
3.3. Propriedades mecânicas do osso.....	27
3.4. Consolidação e remodelamento ósseos	29
3.4.1. Tipos de consolidação óssea	29
3.4.2. Fatores que interferem na consolidação óssea.....	32
3.4.3. Resistência mecânica durante a consolidação óssea	33
3.5. Ensaio mecânicos	34
3.6. Terapia por ondas de choque.....	36
3.6.1. Características físicas das ondas de choque	37
3.6.2. Dispositivos terapêuticos de acordo com a forma de geração da onda	39
3.6.3. Ação das ondas de choque sobre o tecido ósseo.....	40
3.6.4. Aplicação da terapia por ondas de choque no estímulo à osteogênese em fraturas agudas	42
4. METODOLOGIA	44
4.1. Casuística	44
4.2. Desenho experimental	45
4.3. Procedimento cirúrgico	45
4.4. Terapia por ondas de choque	47
4.5. Extração óssea e eutanásia	49

4.6. Preparação das amostras para análise macroscópica e ensaio mecânico	50
4.7. Análise macroscópica por estereomicroscopia	51
4.8. Análise mecânica – ensaio de cisalhamento.....	51
4.9. Análise estatística.....	54
5. RESULTADOS.....	55
5.1. Caracterização e evolução clínica dos animais	55
5.2. Análise macroscópica por estereomicroscopia	56
5.3. Ensaio mecânico de cisalhamento – análise da força	59
6. DISCUSSÃO.....	63
7. CONCLUSÃO	69
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
9. ANEXOS	85
Anexo 1. Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais – CEUA	85
Anexo 2. Submissão de artigo científico.....	86

1. INTRODUÇÃO

A estrutura e a organização tridimensional do tecido ósseo proporcionam as características mecânicas necessárias para suportar a carga e as tensões mecânicas habituais^{1,2}. As fraturas ocorrem quando forças externas superam a capacidade de deformação plástica do osso, resultando na perda da sua continuidade e da sua capacidade de suportar esforços^{3,4}. Felizmente, o tecido ósseo é capaz de se auto reparar, sendo um dos poucos tecidos do corpo humano capaz de regenerar completamente, por meio do processo de consolidação e remodelação⁵. Toda fratura causa resposta inflamatória local e sistêmica que, por sua vez, desencadeia uma sequência de reações biológicas que modulam a expressão e a atividade de fatores de crescimento e de proteínas citoplasmáticas, ativando as células responsáveis pela consolidação e pelo remodelamento ósseos. Além de reconstituir o arranjo estrutural e celular do tecido, esse mecanismo orquestrado também proporciona aumento progressivo da resistência do osso recém-formado, reestabelecendo gradativamente suas propriedades mecânicas originais. Assim ao final do processo de consolidação e de remodelação, que pode durar anos, o osso alcançará suas propriedades estruturais e mecânicas idênticas àquelas que possuía previamente à lesão^{2,5,6}.

Entretanto, em cerca de 5 a 10% das fraturas, há um distúrbio em alguma destas etapas, levando ao retardo de consolidação ou à interrupção do reparo ósseo (não união), impedindo, assim, o reestabelecimento completo da anatomia e/ou da sua função⁷. Esta condição clínica é um desafio para o ortopedista, agrega custos significativos ao tratamento, além de possuir um impacto negativo na qualidade de vida dos pacientes^{8,9}. Geralmente, apresentam natureza multifatorial, sendo que as principais causas são: instabilidade mecânica excessiva no foco da fratura e comprometimento do ambiente biológico, associado ou não a redução do suprimento vascular^{4,7}. Diversos fatores podem aumentar o risco do aparecimento de um distúrbio de consolidação: comprometimento de partes moles no sítio da fratura, peculiaridades mecânicas e/ou biológicas da própria fratura, presença de outras lesões associadas (sendo elas do aparelho locomotor ou de outros aparelhos), infecção, método de tratamento empregado e comorbidades preexistentes do paciente^{4,7}. O tratamento deste distúrbio será ditado por esses fatores e pelo perfil do paciente. Todavia, essencialmente envolve nova abordagem cirúrgica, aumentando o tempo de

hospitalização e de afastamento laboral, o custo para o sistema de saúde, além dos riscos inerentes a uma nova cirurgia^{4,7,8}.

Como abordagem alternativa para prevenção ou tratamento destes distúrbios de consolidação, métodos não invasivos e de menor morbidade vem sendo estudados nos últimos 40 anos. A base destas intervenções consiste na aplicação de estímulos mecânicos e/ou biológicos para promover ou otimizar o processo de reparo ósseo, acelerando a taxa de consolidação⁸⁻¹¹. Dentre estas opções, está a terapia extracorpórea por ondas de choque focal (TOC)¹²⁻¹⁶. A TOC causa microfraturas no antigo foco de fratura, funcionando como um novo estímulo mecânico que através da mecanotransdução, suscita uma série de novas repostas biológicas, como aumento de prostaglandinas, da secreção de fatores pró-osteogênicos e o aumento da circulação local. Desta forma a terapia extracorpórea por ondas de choque faz com que o tecido ósseo adormecido sofra novo estímulo mecânico, iniciando assim todo o processo normal de reparo biológico¹⁶.

No entanto, o seu papel no processo de consolidação de fraturas agudas e não complicadas ainda não está bem definido, assim como sua indicação formal em situações clínicas de risco para a não consolidação¹⁷. Embora seu mecanismo de ação ainda não esteja completamente elucidado, estudos experimentais tem demonstrado seu efeito sobre a cascata biomolecular da regeneração óssea. Apesar de existirem evidências de que a TOC participa da regulação de algumas proteínas (Akt, BMP-2, TGF- e FAK)¹⁸, o significado biológico dessa regulação para a osteogênese em si não está esclarecido¹⁸⁻²⁰. Com este objetivo pesquisas experimentais, *in vitro* ou *in vivo*, buscam compreender por qual mecanismo ocorreria a resposta biomolecular do tecido ósseo. Porém, poucos são os estudos que correlacionam esses achados com suas implicações nas fases da osteogênese, bem como com a qualidade do osso neoformado durante a consolidação²¹⁻²³. Afora isso, os resultados disponíveis apresentam grande disparidade, desde efeitos benéficos da TOC até impactos negativos causando prejuízo para o reparo ósseo^{21,24-27}. Pode-se afirmar, portanto, que até o momento é impossível afirmar se a TOC interfere ou não positivamente sobre o processo de consolidação.

Frente a essa lacuna, o presente estudo buscou avaliar, de maneira quantitativa em modelo animal, o efeito da TOC sobre a consolidação óssea em três diferentes tempos de seguimento.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- Avaliar qualitativamente o regenerado ósseo em função do tempo nas tíbias de ratos, estimuladas ou não pela TOC.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar, por meio do ensaio de cisalhamento, a resistência mecânica do tecido ósseo neoformado nos diferentes grupos ao longo do tempo.
- Avaliar se a TOC modifica a qualidade mecânica do tecido ósseo neoformado.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Biologia e arquitetura óssea

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo altamente especializado, formado por células dispersas em uma abundante matriz extracelular^{1,7}. O osso suporta carga, protege e sustenta os órgãos internos, sendo fundamental para o ortostatismo e para locomoção, pois, juntamente com a musculatura esquelética, cria um sistema de alavancas altamente eficiente, pelo qual as forças geradas na contração muscular são ampliadas^{1,2,7}. A forma, a disposição e a distribuição dos componentes da matriz extracelular são os principais responsáveis pela sua função de proteção e sustentação, provendo resistência mecânica adequada. Além disso, tem papel importante na hematopoiese e na homeostase mineral do organismo, visto que é o principal reservatório de cálcio e fosfato^{1,7}.

A matriz extracelular é constituída pela fase orgânica e inorgânica. A fase orgânica é composta por colágeno do tipo I (90 a 95%), proteoglicanos e glicoproteínas que respondem pela plasticidade dos ossos. A fase inorgânica representa sua maior porção, sendo formada por cristais minerais precipitados, sobretudo de hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$, responsável pela rigidez, resistência à compressão e à flexão^{1,28}.

Macroscopicamente, podemos identificar dois tipos de osso: o cortical ou compacto e o esponjoso ou trabecular. O osso cortical é mais denso, com menor capacidade de remodelação^{1,2}. Está presente na diáfise dos ossos longos, correspondendo a cerca de 80% da massa do esqueleto maduro, e com papel importante na sustentação da carga. Microscopicamente, é estruturado em um sistema canalicular. A organização de matriz de colágeno ocorre de maneira concêntrica ao redor de um canal central (canal de Havers), formando o ostéon. Os ostéons têm um formato cilíndrico alongado, dispostos paralelamente ao longo da diáfise. Eles se comunicam entre si, com a região medular e com a área subperiosteal através dos canais de Volkmann, orientados transversalmente. Radialmente dispostas a partir dos canais de Havers, as lamelas aumentam a resistência mecânica do tecido^{1,2,29} (Figura 1).

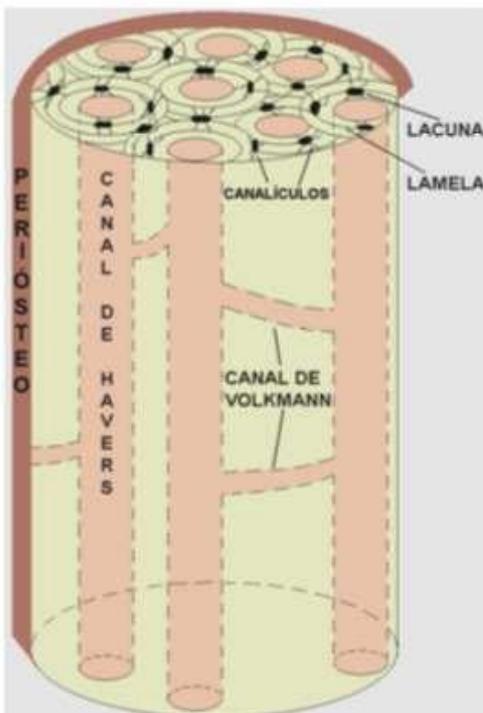


Figura 1. Representação esquemática da microanatomia do tecido ósseo cortical, explicitando seu sistema canalicular composto por canais de Havers, canais de Volkmann e canalículos (Gusmão e Belangero, 2009²⁹).

Já o osso esponjoso corresponde aos 20% restantes da massa óssea, rico em cavitações que se comunicam entre si e são preenchidas por medula óssea. Esta arquitetura lhe confere maior plasticidade e possibilidade de deformação quando submetido ao impacto direto. Possui maior atividade metabólica e alta taxa de renovação óssea (“*turn over*” 3 a 5 vezes maior que no cortical). Encontrado nas epífises e metáfises dos ossos longos, bem como no interior dos corpos vertebrais e dos ossos planos, é um tecido menos denso, com maior celularidade e maior vascularização. Sua matriz orgânica é organizada na forma de trabéculas de espessuras diversas, cuja orientação é determinada pelas tensões originadas pela intensidade e direção das solicitações mecânicas^{1,30,31}.

Tanto no osso cortical quanto no trabecular, pode-se identificar tecido ósseo primário ou reticular (“*woven bone*”) e tecido ósseo secundário ou lamelar^{1,2}. O tecido ósseo primário é imaturo, produzido durante períodos de rápida formação óssea, seja durante o crescimento e desenvolvimento do osso ou em resposta a lesões traumáticas ou tumorais. Nas situações fisiológicas, é gradativamente

substituído pelo tecido ósseo maduro. É pouco organizado, com um padrão de entrelaçamento aleatório das fibrilas de colágeno, bem como um padrão irregular de mineralização da sua matriz, com menor quantidade de minerais e maior proporção de osteócitos^{1,2,28}. O tecido ósseo lamelar, por sua vez, é o tecido maduro predominante após o término do crescimento ósseo e organizado em lamelas, com fibras de colágeno orientadas na mesma direção. A disposição das lamelas pode ser predominantemente concêntrica ou paralela, dependendo em qual tecido se encontra (cortical ou trabecular, respectivamente)^{1,2,28,31}.

Externamente, com exceção das regiões cobertas pela cartilagem articular, o osso é revestido por uma membrana de tecido conjuntivo, denominada perióstio. Sua camada mais externa (fibrilar) é formada por um tecido conjuntivo denso e alguns fibroblastos, sendo responsável pela firme adesão do perióstio ao osso (fibras de Sharpey). Sua camada interna, adjacente ao osso, possui vasos sanguíneos, que participam da vascularização óssea, e é altamente celular, com células progenitoras, com função no crescimento ósseo e na reparação de fraturas. O endóstio é uma estrutura que reveste internamente as cavidades do osso esponjoso, os canais de Havers e de Volkmann e o canal medular, formada por camadas de células osteogênicas. Tal qual o perióstio, também participa da nutrição óssea e dos processos de crescimento e reparo ósseos^{1,2,28}.

As células do tecido ósseo derivam de duas linhagens distintas: enquanto os osteoblastos e osteócitos provêm de células-tronco mesenquimais (linhagem osteoblástica), os osteoclastos tem sua origem em tecido hematopoiético^{1,28}.

Os osteoclastos são células grandes e multinucleadas, responsáveis pela reabsorção óssea, através da secreção de ácido, colagenase e outras substâncias, “digerindo” a matriz orgânica e dissolvendo os cristais de cálcio¹. Os osteoblastos organizam-se linearmente nas superfícies ósseas e são as células fundamentais na organização da matriz óssea, visto que são responsáveis pela síntese de sua parte orgânica (colágeno tipo I, proteoglicanos e outras proteínas), bem como participam de sua mineralização, por concentrarem fosfato de cálcio^{1,2,28}. Conforme produzem a matriz, alguns osteoblastos acabam ficando aprisionados em seu interior, originando os osteócitos. Estes são células achatadas, localizados em lacunas no interior da matriz extracelular, com prolongamentos citoplasmáticos que se comunicam pelos canaliculos, formando uma extensa rede celular¹. Os osteócitos apresentam papel primordial na modulação da produção e da reabsorção óssea, uma vez que são as

principais células responsáveis por reconhecer estímulos mecânicos e transformá-los em processos biológicos, através do fenômeno da mecanotransdução^{1,2,28,32}.

3.2. Mecanotransdução

O esqueleto maduro normalmente se encontra em um estado de constante remodelamento, com equilíbrio entre as atividades osteoblástica e osteoclástica, adaptando-se assim a diversas solicitações mecânicas²⁸. O termo em inglês **Strain** é usado na maioria dos textos para definir essa deformação relativa do tecido ósseo em relação ao seu tamanho original, quando submetido a tensões mecânicas externas. Em português, é denominado de “deformação”^{2,7,31} e é medido em microstrain ($\mu\epsilon$), sendo $1 \mu\epsilon = 1 \mu\text{m}/\text{m} = 10^{-6} = 0,0001\%$.

No século XIX, Julius Wolff constatou que o osso era uma estrutura dinâmica, capaz de modificar seu tamanho, forma e estrutura de acordo com o estímulo mecânico. Essa descoberta forneceu os fundamentos para a lei de Wolff (1892): “cada mudança produzida na forma ou na função do osso é seguida por mudanças na sua arquitetura interna assim como na sua conformação externa, obedecendo leis matemáticas”³³. Em outras palavras, a solicitação mecânica é reconhecida pelo tecido ósseo, que responde com formação ou reabsorção ósseas, dependendo da magnitude e da direção da carga e, conseqüentemente, da deformação relativa gerada (Tabela 1)^{34,35}.

Tabela 1. Resposta da célula óssea de acordo com a deformação relativa (*strain*) incidente

Faixa	Deformação ($\mu\epsilon$)	Resposta biológica
Desuso	Abaixo de 50-100	Reabsorção óssea
Fisiológica	50-100 a 1000-1500	Sem alteração massa óssea
Overuse	1000-1500 a 3000	Osteogênese
Patológica	Acima de 3000	Fratura de “stress”
	Acima de 25000	Fratura completa

Essa capacidade de reconhecer o estímulo mecânico e convertê-lo, por meio de reações bioquímicas, em respostas biológicas, denomina-se mecanotransdução^{29,32,35,36}. Trata-se do princípio que norteia tanto o modelamento ósseo descrito acima, quanto alguns métodos terapêuticos como a TOC^{32,37,38}.

Todo estímulo mecânico que o osso sofre tem repercussão ao nível tissular, que faz seu “reconhecimento” pelos mecanorreceptores da membrana plasmática das células, com posterior ação sobre as vias de sinalização celular. Esta cascata de reações bioquímicas determinará a resposta celular, estimulando ou inibindo a osteogênese^{32,35}.

O osso é capaz de suportar deformações relativas de até 2% sem sofrer fratura, entretanto, a célula óssea necessita de uma deformação de 10% para direcionar sua resposta à osteogênese^{2,29,35}. Para explicar essa aparente contradição alguns autores propuseram um modelo matemático que teria a finalidade de amplificar a deformação em nível do tecido ósseo e, dessa maneira, as células seriam submetidas a deformações relativas maiores, possibilitando a sua resposta^{29,32,34,39}. Embora osteoblastos, osteoclastos, células da medula óssea e do periósteo sejam mecanossensíveis, os osteócitos são as principais células ósseas na mecanotransdução. O modelo de amplificação da deformação é baseado em sua microanatomia (Figura 2)²⁹. Os processos citoplasmáticos dos osteócitos situam-se centralizados no interior dos canalículos e ancoram-se à parede canalicular através de fibrilas transversas. Os processos citoplasmáticos estão separados da parede canalicular pelo espaço pericelular, preenchido com um fluido rico em albumina^{29,32,39}.

A força mecânica deformante aplicada sobre o osso gera fluxo do fluido canalicular que, no interior do canalículo, provoca uma força de arrasto. Esta, quando em contato com as fibrilas, produz deformações circulares ou “*hoop strains*”, resultando em forças 20 a 100 vezes maiores do que as aplicadas à superfície óssea^{32,39-41}. Além disso, o fluxo do fluido canalicular produz tensão de cisalhamento entre o processo citoplasmático e o corpo celular do osteócitos. Embora a tensão de cisalhamento não amplifique a deformação mecânica, ela estimula mecanicamente a célula^{39,41,42}.

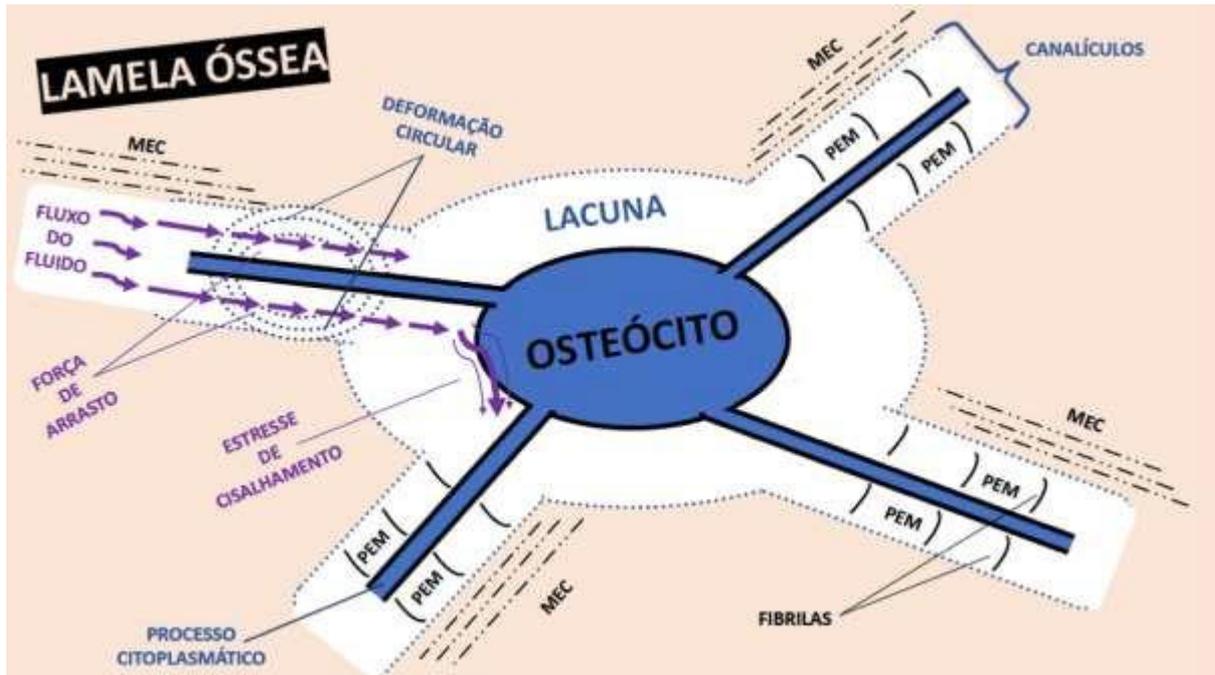


Figura 2. Modelo de amplificação do estímulo mecânico. O fluxo do fluido canalicular resultante da força deformante produz uma força de arrasto que, em contato com as estruturas canaliculares, gera deformações circulares (“*hoop strains*”), aumentado de 20 a 100 vezes a força deformante inicial. Além disso, esse fluxo de fluido produz tensão de cisalhamento, estimulando mecanicamente a célula (Adaptado de Gusmão e Belangero, 2009²⁹).

Após essa etapa, a força mecânica provoca alteração estrutural dos mecanorreceptores com sua consequente ativação, desencadeando cascatas de reações biológicas. Atualmente são conhecidas várias estruturas na membrana celular com função de mecanorreceptores, como receptores de ATP, receptores de fatores de crescimento, integrinas, canais iônicos, proteínas *frizzled*, receptores de lipoproteína de baixa densidade, conexinas e proteínas G^{32,35}. Todavia, dentre eles, é fundamental a participação da integrina, uma vez que a ativação de todos os outros mecanorreceptores, de múltiplas vias de ativação celular e, conseqüentemente, a resposta osteogênica da célula óssea são dependentes dessa proteína^{31,42}.

3.3. Propriedades mecânicas do osso

De maneira geral, as características mecânicas mais importantes do osso são a sua resistência (capacidade de suportar a carga sem falhar) e sua rigidez (relação entre carga e deformação). Elas variam de acordo com sua localização, sua geometria (espessura da cortical e diâmetro de secção transversa), se cortical ou esponjoso, tipo histológico predominante (lamelar ou reticular) e idade do indivíduo⁴³.

Por ser formado por uma fase orgânica e uma inorgânica o tecido ósseo é denominado de material compósito⁴⁴. No entanto, ao contrário dos materiais compósitos artificiais, ele apresenta estrutura hierárquica (Figura 3)⁴³⁻⁴⁶, com mecanismos de absorção e de dissipação de energia únicos para cada escala, desde sua estrutura ultramolecular (arranjo das fibrilas de colágeno com cristais de hidroxiapatita) até sua estrutura macromolecular (osso como um todo)^{30,44,47-50}. Essa hierarquização lhe fornece propriedades mecânicas difíceis de serem reproduzidas em outros materiais. Ademais o osso é um material anisotrópico e viscoelástico respondendo assim de forma diferente conforme a direção e a velocidade de aplicação de carga ^{47,51,52}.

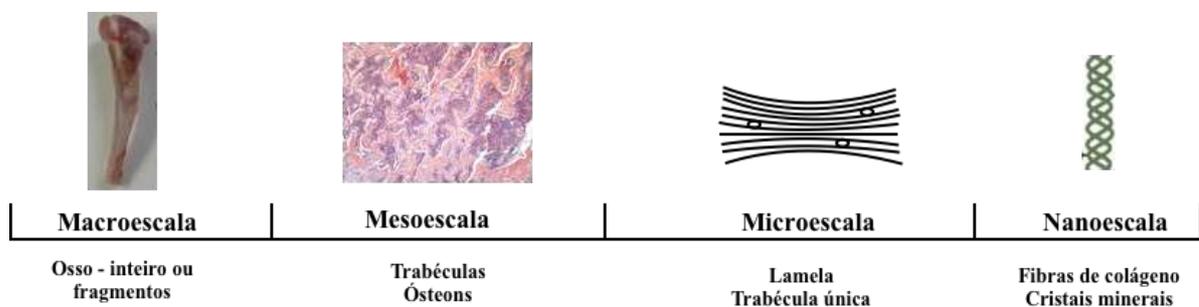


Figura 3. Esquemática da estrutura hierárquica do osso desde uma escala macroscópica até nanoscópica. Essa hierarquização permite diferentes mecanismos de dissipação de energia para cada nível, conferindo ao osso propriedades mecânicas únicas entre os materiais. (Adaptado de *Donnelly* 2011)⁵³

Sua fase orgânica corresponde a cerca de 20 a 25% do tecido ósseo em peso, conferindo suas propriedades de resistência à tração, ductilidade e tenacidade. Em outras palavras, é a fase orgânica que determina a capacidade do tecido em se deformar sob ação de tensões mecânicas e sua capacidade de absorver energia antes de fraturar, atribuída, principalmente, à organização de suas fibras colágenas. Em contrapartida, sua fase inorgânica representa cerca de 60-70% de seu peso total e fornece ao osso rigidez e resistência às forças de compressão, relacionadas, sobretudo, à quantidade e à distribuição dos cristais de hidroxiapatita^{30,31,47-49,54}. Apesar de apresentarem composição similar, os ossos cortical e esponjoso possuem organizações estruturais distintas, o que resulta em propriedades mecânicas também distintas^{43,54-56}.

No osso cortical, a organização dos ósteons ocorre em orientação longitudinal, proporcionando resistência mecânica máxima às cargas que são aplicadas nesse sentido^{2,49,54,56}. Em contrapartida, quando sujeito a cargas perpendiculares ou tangenciais ao sentido dos ósteons, apresentará maior risco de fratura. Clinicamente, sua microestrutura é otimizada para suportar cargas a que o osso habitualmente será exposto^{2,54,55}.

Por sua vez, o osso trabecular é um tecido menos denso, onde não existem canais de Havers. Sua microarquitetura, assim como o pequeno tamanho das trabéculas, resulta em menor rigidez e resistência mecânica quando comparado ao cortical^{30,57-61}. O tecido ósseo esponjoso é formado por trabéculas interconectadas e cuja disposição depende da intensidade e da direção das solicitações mecânicas a que são submetidas. Dessa maneira, os valores de suas propriedades mecânicas apresentam variações maiores que os do osso cortical, sendo dependentes de sua localização anatômica e de sua função^{54,57,59}. Sua estrutura permite uma função adequada na absorção de impacto e na transferência de carga quando submetida a forças compressivas. Em compensação, não apresenta um bom desempenho em resposta a cargas de flexão ou de torção^{54,57,59}.

3.4. Consolidação e remodelamento ósseos

O tecido ósseo é um dos poucos com capacidade de regeneração, ou seja, após uma fratura, consegue restabelecer sua estrutura e funcionalidade ao estágio original prévio à lesão^{2,7}.

Fratura é definida como “perda da continuidade óssea, resultante de sobrecarga mecânica única ou de repetição, que leva à deformação patológica, à perda de função de suporte do osso e à dor”^{3,4}. Em outras palavras, é um processo puramente mecânico que desencadeia gatilhos biológicos responsáveis pelo reparo ósseo e pela consolidação das fraturas^{5,6,62}.

O reparo ósseo ocorre por meio de eventos que se assemelham a fenômenos ocorridos durante o desenvolvimento intrauterino de formação do esqueleto (ossificação intramembranosa e endocondral). Essa capacidade do tecido ósseo mimetizar os processos embrionários é responsável pelo seu maior potencial regenerativo^{4,5}.

A consolidação das fraturas pode acontecer de duas maneiras, primária ou secundária^{4-6,10}. A consolidação primária ou direta ocorre pela remodelação óssea promovida pelos ósteons (ossificação intramembranosa) e só é possível na vigência de estabilidade absoluta, isto é, na ausência de movimento interfragmentário no foco de fratura. Já a consolidação secundária ou indireta acontece na presença de certo grau de movimento também denominado de estabilidade relativa e inclui tanto a ossificação intramembranosa quanto a endocondral^{4,5,7}.

3.4.1 Tipos de consolidação óssea

É pré-requisito para a consolidação primária ou direta de fraturas, uma redução anatômica de seus fragmentos, além da estabilidade absoluta entre eles. Nessa modalidade, idealmente não há formação de calo ósseo. As extremidades ósseas da fratura deverão estar em direta aposição, em contato direto ou com pequenas fendas, menores do que 0,5 mm. O processo de consolidação completo demanda tempo maior em relação ao da consolidação indireta^{3,5,63}.

No osso cortical, na ausência de fendas entre os fragmentos, o osso lamelar será formado de maneira direta, transversalmente à área da fratura através

dos “*cutter cones*”. Primeiramente, um aglomerado de osteoclastos atravessará a linha de fratura, reabsorvendo o material necrótico. Sequencialmente a eles, os osteoblastos iniciam a formação de nova matriz extracelular e originam novos osteócitos. Por fim, conforme ocorre a progressão vascular, novos canais de Havers serão formados. Caso existam pequenas fendas entre as extremidades dos traços de fratura, deve haver o preenchimento destas pela formação de osso reticulado que preencherá estes espaços para que os canais de Havers possam crescer e atravessar estas regiões^{5-7,63-65}.

Já no osso trabecular, a consolidação primária ocorre por meio da atividade coordenada dos osteoblastos e dos osteoclastos, sem a presença dos “*cuttercones*”. O osso esponjoso possui maior área superficial, propiciando maior contato (aposição) entre as extremidades da fratura. Além disso, sua maior vascularização e celularidade permite que os osteoblastos formem tecido ósseo sobre as trabéculas já existentes. No osso esponjoso não há formação de calo, a ossificação é do tipo intramembranosa e não endocondral^{4-6,64,65}.

A consolidação indireta é a forma mais comum de consolidação óssea, é estimulada pelo micromovimentos e ocorre espontaneamente, no tratamento não cirúrgico das fraturas e nos tratamentos cirúrgicos que promovem a estabilidade relativa. Classicamente, pode ser subdividida em quatro estágios: inflamação, formação do calo “mole”, formação do calo “duro” e remodelação, com características distintas em cada um deles. Todavia, vale ressaltar que a consolidação é um processo dinâmico, com sobreposição de eventos na linha temporal, servindo essa classificação apenas para fins didáticos^{5,10,62,63,66}.

O estágio inflamatório inicia-se logo após a fratura e perdura por cerca de sete dias. O trauma causa lesão óssea, periosteal e das partes moles adjacentes, com rompimento de vasos sanguíneos e consequente formação de hematoma no foco de fratura. Além disso, a lesão vascular interrompe a nutrição dos osteócitos localizados nas extremidades dos fragmentos, causando necrose dessa região, com liberação de mediadores inflamatórios, principalmente TNF- α , TGF- β , IL (-1,-6,-11,-18), BMP, FGF-2 e PDGF. Tais mediadores, estimulam a angiogênese nos arredores da fratura e promovem o recrutamento e a proliferação de células-tronco e sua diferenciação^{5,6,10,62,66,67}. Adicionalmente, os osteoclastos iniciam a remoção do osso necrótico das extremidades da fratura. Além disso, a resposta inflamatória inicia a coagulação do hematoma, tanto ao redor das extremidades da fratura quanto na

região medular, formando um tecido de granulação, rico em fibrina. Esse tecido, mecanicamente menos estável, representa um “molde” para a formação do futuro calo^{5,6,10,63,68}.

O estágio de formação do calo “mole” inicia-se na sequência, sob a influência principalmente de BMP-2 e TGF- β . Com a diminuição do processo inflamatório, o tecido necrótico e o exsudato são reabsorvidos. Novos brotos capilares, principalmente provenientes do periósteo, invadem a região do hematoma, transportando células tronco mesenquimais. Estas se diferenciam em fibroblastos e em condrócitos que se proliferam e produzem suas respectivas matrizes, substituindo o tecido de granulação por tecido fibroso e por cartilagem, originando o calo “mole”, através do início da ossificação endocondral^{4-6,10,63,66}.

Ao mesmo tempo, sob modulação do BMP-2, -5 e -6, as células progenitoras presentes no periósteo e no endósteo diferenciam-se em osteoblastos, iniciando a formação de osso subperiostealmente no foco de fratura. O osso primeiramente será formado na periferia do calo, através do processo de ossificação intramembranosa, enquanto na região central, por apresentar menor tensão de oxigênio, ainda existirá o calo “mole” com grande quantidade de cartilagem^{5,10,66,67}.

Os condrócitos hipertróficos e os osteoblastos expressam altos níveis de VEGF, estimulando a invasão vascular do calo cartilaginoso tanto a partir de vasos pré-existentes (angiogênese) quanto da formação de novos plexos vasculares^{10,66,67}. Com o aumento da vascularização no calo cartilaginoso, ocorre maior recrutamento de células-tronco com potencial osteogênico para a região. A diferenciação de osteoblastos e de osteoclastos é estimulada por TNF- α , RANKL, M-CSF e OPG. Conseqüentemente, ocorre reabsorção da matriz cartilaginosa, e progressiva substituição desta pelo osso reticular, através da ossificação endocondral que aumenta o volume do calo “duro” e a sua resistência mecânica^{5,6,10,66,69}. Esse processo continua até completa substituição do calo cartilaginoso pelo calo ósseo^{62,67,69}.

O estágio de remodelação inicia-se após a formação completa do calo ósseo e pode persistir por anos. Essa segunda fase reabsortiva é estimulada por IL-1 e TNF- α ^{5,66,67}. Através da reabsorção do calo ósseo pelos osteoclastos e da deposição de osso maduro pelos osteoblastos (remodelação osteonal), o osso reticular vai sendo substituído pelo lamelar, com remodelamento do calo ósseo e reestabelecimento do diâmetro da cavidade medular, restituindo completamente a estrutura óssea e suas

propriedades biomecânicas prévias à fratura pela invasão dos canais de Havers^{4-7,10,63}.

3.4.2 Fatores que interferem na consolidação óssea

Aporte sanguíneo adequado é condição imprescindível para a consolidação óssea. Além dele, outros fatores, biológicos ou mecânicos, podem interferir na consolidação normal, causando atrasos ou até interrupção do mesmo^{4,11,63,68}. Tais variáveis ainda podem ser categorizadas entre decorrentes da lesão propriamente dita, do paciente ou do tratamento instituído (Tabela 2).

Tabela 2. Fatores que influenciam na consolidação de fraturas

Características do paciente	Características da lesão em si	Características do tratamento
Diabetes <i>mellitus</i>	Grau de lesão das partes moles	Interposição de partes moles no foco de fratura
Status nutricional	Lesão neurovascular associada	Qualidade da redução da fratura
Idade	Perda óssea	
Tabagismo	Local fraturado	
Drogadição	Infecção associada	Método de fixação utilizado
Distúrbios hormonais		
Uso de corticoide		
Doenças ósseas (ex: osteoporose, osteomalácia)		
Tumores ósseos		
Metástases ósseas		
Infecção		

Em geral, quanto maior a energia do trauma, maior será a lesão vascular sofrida pelo osso e partes moles circundantes, resultando em maior quantidade de tecido não viável ou parcialmente viável. Este tipo de tecido dificulta a migração das células mesenquimais, comprometendo a invasão vascular e conseqüentemente a

vascularização local. Na vigência de infecção, o cenário torna-se mais complexo, visto que a infecção potencialmente acarreta necrose de tecidos saudáveis e trombose de vasos. Além disso, há ativação celular para contenção do processo infeccioso, realocando células que seriam destinadas ao reparo ósseo^{7,11,68}.

A presença de patologias prévias do paciente também pode influenciar na consolidação. O diabetes *mellitus* prejudica a cicatrização local e a nível sistêmico. Acarreta aumento do tempo de consolidação, com redução do volume do calo devido a elevada reabsorção cartilaginosa. Osteoporose, metástases ósseas e tumores ósseos primários alteram a estrutura e/ou a biologia do osso e conseqüentemente, a qualidade da consolidação^{6,11,68}.

A idade e o status nutricional são outras variáveis importantes. A velocidade do reparo óssea diminui com o passar dos anos, devido a queda do número de células-tronco, presença de periósteo mais delgado e com menor espessura da camada germinativa e, portanto, com menor potencial osteogênico e vascularização intrínseca. Pacientes com ingesta nutricional inadequada apresentam aumento de complicações peri-operatórias e, segundo alguns estudos experimentais, o calo formado é menos resistente^{3,7,11,68}.

Além desses fatores, há os relacionados com o tratamento: a qualidade da redução dos fragmentos fraturados, a escolha inapropriada do método de estabilização da fratura, bem como abordagens cirúrgicas amplas com maior morbidade e maior descolamento de partes moles, que constituem fatores importantes para causar distúrbios da consolidação óssea^{4,8,63}.

3.4.3. Resistência mecânica durante a consolidação óssea

À medida que a consolidação progride, observa-se aumento na mineralização da matriz extracelular da região em reparo, acompanhado pelo aumento do módulo de elasticidade. Além disso, as fibras de colágeno, a princípio desorganizadas, progressivamente se organizam até assumirem a direção das principais solicitações mecânicas sobre o osso em questão. A área de secção transversa aumenta, e, nos casos de ossificação endocondral, o calo começa na superfície periosteal, aumentando o diâmetro de sua área externa. Dessa maneira, é

esperado que a rigidez, a resistência à tração e à compressão aumentem progressivamente, sendo maior no calo ósseo do que no calo cartilaginoso^{67,68,70}.

3.5. Ensaio mecânicos

Para se avaliar as propriedades mecânicas de um material e compreender melhor seu comportamento, realizam-se ensaios mecânicos em amostras representativas do material como um todo. Essas amostras são denominadas de “corpo de prova”⁷¹. O comportamento mecânico ósseo tem sido objeto de avaliação há mais de um século, com a finalidade de proporcionar melhor compreensão das propriedades intrínsecas deste material. Sendo assim a caracterização mecânica do tecido ósseo em formação ou reparo é uma forma confiável de avaliar o processo de reparo frente a patologias ou intervenções terapêuticas^{48,72-74}.

Ao contrário dos ensaios mecânicos que se faz na engenharia de materiais, o osso por ser anisotrópico tem variações na sua microestrutura devido à orientação das fibras de colágeno, à densidade, à porosidade e ao conteúdo mineral^{31,43,45,47,48}. Tais características do material aliadas à falta de padronização dos testes e das medições contribuem para resultados divergentes na literatura. Vale ressaltar que outros aspectos também contribuem para esta variabilidade como o preparo da amostra, o método de preservação, a temperatura ambiente, a umidade e a origem das amostras (espécie, idade, topografia do osso retirado, sexo, comorbidades)^{44,45,48,50,72}. A decisão sobre qual a técnica de análise a ser utilizada depende de qual propriedade mecânica está sendo considerada mais relevante e qual a finalidade do estudo, contudo, nem sempre é simples determiná-la. Dois fatores objetivos nessa determinação são a quantidade de material e o tamanho das amostras a serem ensaiadas. Além disso, para auxiliar nessa escolha, vários estudos orientam norteá-la dentro de uma hierarquização da estrutura óssea. Em outras palavras, é possível a análise do comportamento desde o osso todo até do arranjo das fibrilas de colágeno com os cristais minerais^{30,44,45,50,53,72,75}.

No entanto, para avaliar o processo de consolidação, o objetivo principal é quantificar a qualidade do tecido formado de preferência ao longo do tempo^{44,53,70,75}. Durante ensaio mecânico, aplicam-se forças (cargas) conhecidas sobre a região do osso neoformado, procurando-se estabelecer relação entre a força aplicada e a

deformação resultante deste tecido, gerando a curva de carga *versus* deslocamento ou tensão *versus* deformação, caso se trabalhe com corpos de prova de tamanho padronizado (Figura 4)^{76,77}.

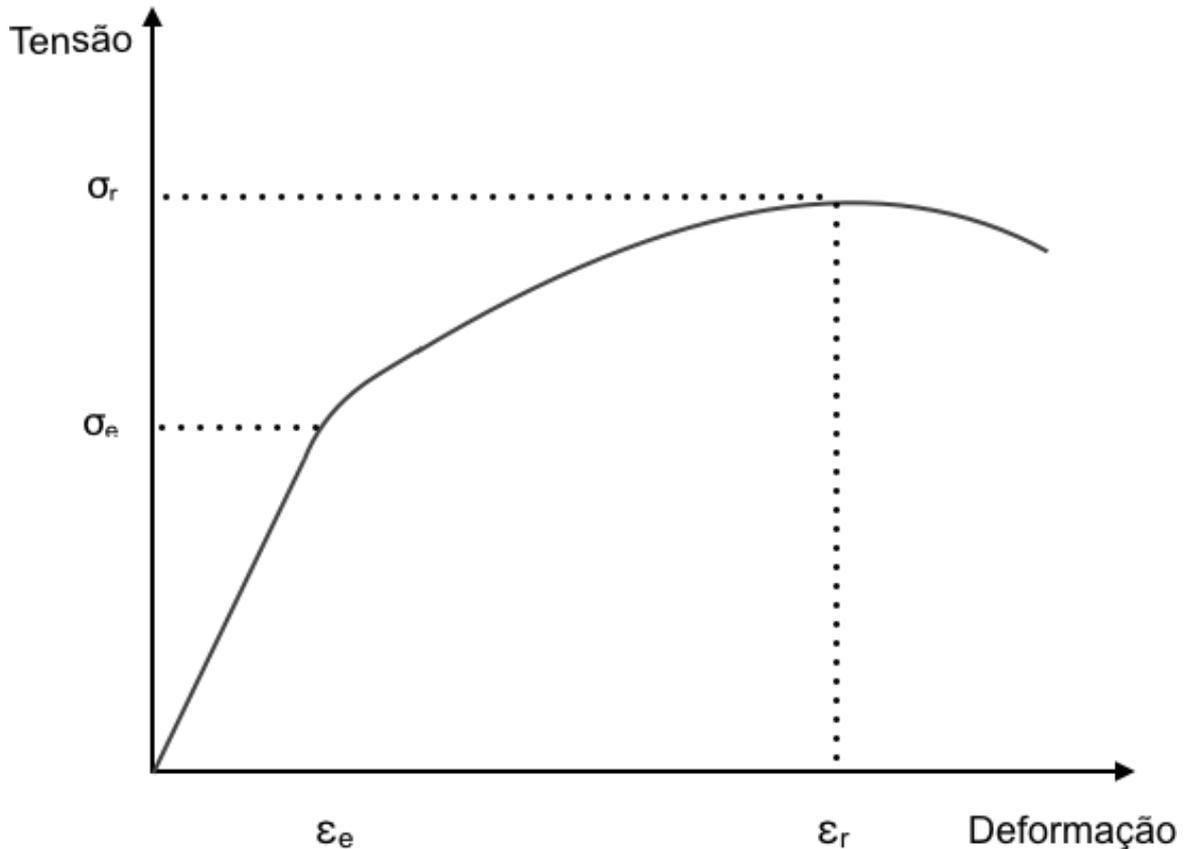


Figura 4. Típica curva tensão (“*stress*”) vs deformação (“*strain*”) apresentada pelo osso (Adaptado de Cole et al⁷⁶). A porção inicial da curva representa a fase de deformidade elástica do osso. A tensão de escoamento (σ_e) caracteriza o início da deformidade plástica do osso e o limite de resistência (σ_r) corresponde à máxima tensão suportada previamente à fratura. ϵ_e corresponde à deformação no escoamento e ϵ_r é a deformação na ruptura.

A porção inicial desta curva, aproximadamente linear, caracteriza a fase de deformidade elástica do osso, ou seja, período em que ele é capaz de retornar às suas dimensões originais assim que retirada a carga externa. A inclinação da reta fornece a rigidez da amostra. Se o ensaio for realizado com um corpo de prova de

dimensões conhecidas, pode ser obtido o valor do módulo de elasticidade do material (módulo de Young). Quanto maior o módulo de elasticidade, maior será sua rigidez. A tensão de escoamento (σ_e) ou ponto de deformação representa o momento a partir do qual inicia-se a fase de deformidade plástica. Nesta, mesmo com a retirada da carga, o osso apresentará uma deformação permanente. O limite de resistência (σ_r) corresponde à máxima tensão suportada antes de ocorrer a fratura^{76,77}.

Os ensaios mais comumente utilizados para avaliação óssea são os de tração, compressão, torção, flexão, cisalhamento ou indentação^{45,50,53,72} (Figura 5).

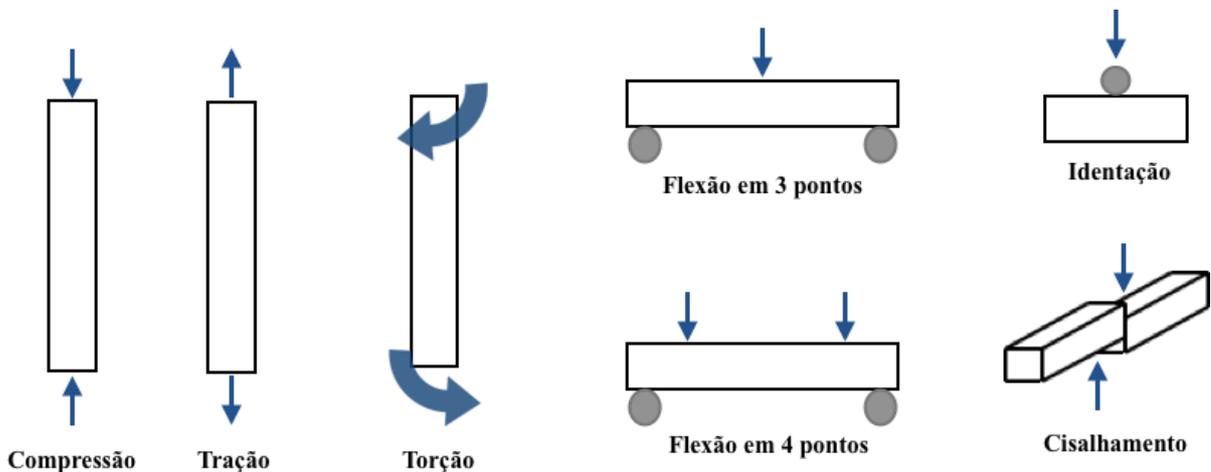


Figura 5. Representação esquemática de ensaios mecânicos tradicionais, utilizados para análise mecânica do osso. As setas azuis representam as cargas aplicadas aos corpos de prova (Adaptado de Vidotto et al⁷⁸).

3.6. Terapia por ondas de choque

As primeiras constatações do impacto das ondas de choque sobre o organismo humano foram feitas durante a Segunda Guerra Mundial, quando se observou lesões pulmonares extensas em mergulhadores, sem nenhum sinal de trauma externo associado, após explosões subaquáticas⁷⁹⁻⁸³. Na medicina, pesquisas realizadas na Alemanha durante as décadas de 60 e 70 permitiram seu primeiro uso terapêutico, no tratamento de litíase renal (litotripsia) em 1980, por meio da ação destrutiva sobre o cálculo, com alta taxa de sucesso e baixo índice de complicações. Seu potencial efeito sobre o tecido ósseo foi suspeitado ao se observar alterações

osteogênicas em pelves de pacientes submetidos a litotripsia. Em 1988, o tratamento extracorpóreo por ondas de choque foi aplicado com êxito, pela primeira vez, no tratamento de pseudoartrose⁷⁹.

A natureza não invasiva da aplicação das ondas de choque e sua baixa taxa de complicações associadas representam grandes atrativos na utilização dessa modalidade de tratamento. Dessa maneira, nos últimos 40 anos, muitos estudos foram realizados, proporcionando maior entendimento das propriedades físicas das ondas de choque e da sua ação sobre tecido biológico, expandindo seu potencial de tratamento para várias patologias^{80,84-88}. De acordo com a Sociedade Médica Brasileira de Tratamento por Ondas de Choque (SMBTOC) e *The International Society for Medical Shockwave Treatment* (ISMST), o uso da TOC no tratamento de tendinopatias crônicas e de distúrbios da consolidação constitui indicações para o sistema musculoesquelético^{89,90}.

3.6.1. Características Físicas das Ondas de Choque

As ondas de choque são ondas acústicas, porém diferem das ondas sonoras convencionais por se propagarem com velocidades maiores que a do som. Podem ser definidas como um distúrbio pressórico transitório de grande amplitude, com alta energia e curta duração (alguns microssegundos – μ s), que se propaga rapidamente através de um meio^{80,84,88}.

Inicialmente, há uma elevação abrupta da pressão em um intervalo menor que 10 nanosegundos (*ns*), atingindo um pico de pressão positiva de até 150 MPa (fase positiva ou compressiva). Em seguida, ocorre uma queda exponencial da pressão até valores negativos, chegando até -25 MPa (fase negativa ou de rarefação)^{88,91}. Tais características são responsáveis pelo seu formato de onda “*em dente de serra*” (Figura 6), diferente da forma sinusoidal típica da maioria das ondas acústicas.

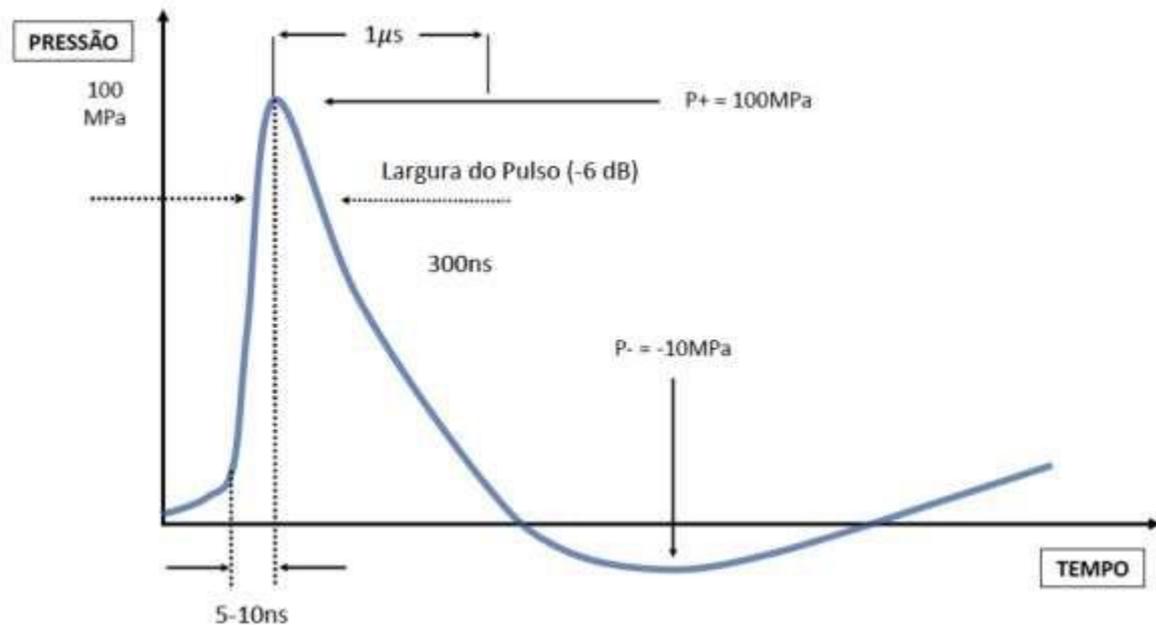


Figura 6. Aspecto típico de uma onda de choque, com fase compressiva de curta duração e com alto valor de pico pressórico, seguida por uma fase de rarefação (adaptado de ISMST – *The International Society for Medical Shockwave Treatment*⁹¹).

A terapia extracorpórea por ondas de choque (TOC) consiste na aplicação de ondas de choque sobre um tecido biológico. Uma propriedade muito utilizada em sua aplicação clínica é a “focalização”, isto é, potencializar a aplicação de energia, concentrando-a sobre uma zona terapêutica específica, com dimensões pré-estabelecidas^{84,92}.

Vale ressaltar que ondas de pressão radial também são empregadas como modalidades terapêuticas e erradamente chamadas de ondas de choque radiais ou ondas de choque não focadas. Entretanto, suas características físicas em muito diferem das ondas de choque. São ondas que se propagam abaixo da velocidade do som, apresentando maior tempo para atingir o pico de pressão positiva (acima de 600ns), menor valor desse pico (0,1 a 19,9Mpa) e maior duração do pulso (cerca de 5ms)⁹³.

Vários são os aparelhos disponíveis para o uso clínico das ondas de choque, subdivididos de acordo com a forma de geração da onda. Eles também diferem quanto a alguns outros parâmetros do pulso gerado, tais como frequência da

onda, profundidade de penetração, área de zona focal e densidade de fluxo de energia^{84,94,95}.

3.6.2. Dispositivos terapêuticos de acordo com a forma de geração da onda

Os aparelhos comercializados podem ser divididos de acordo com sua forma de geração da onda em eletrohidráulicos, eletromagnéticos ou piezoelétricos⁸⁴. Todos eles convertem a energia elétrica em energia mecânica (acústica). Além disso, seus geradores estão posicionados em meio aquoso para diminuir a perda de energia ao penetrar em um tecido biológico^{80,84}. Tal construção é norteadada pela bioimpedância acústica do meio, determinada pelo produto da velocidade do som e da densidade do meio. Quanto maior a diferença entre a bioimpedância acústica entre os meios, maior será a quantidade de energia refletida na transição entre eles e, conseqüentemente, maior a perda energética e menor sua absorção no alvo. A água possui bioimpedância acústica mais próxima à dos tecidos biológicos que o ar, minimizando, assim, a perda energética. Pelo mesmo motivo, é utilizado um gel de base aquosa na superfície de contato entre o transdutor do aparelho e a área de tratamento (ponto de refração)^{80,84}.

Os aparelhos eletro-hidráulicos ou de primeira geração possuem eletrodos inseridos em um refletor metálico semi-elipsóide. Em resposta a uma descarga elétrica, geram uma faísca que provoca rápida vaporização do fluido ao redor, com formação de uma bolha que se expande, originando uma onda de choque. Ao atingir a superfície do refletor, essa onda é refletida e focada para a zona terapêutica^{80,84}.

Já no interior dos aparelhos eletromagnéticos, há uma bobina eletromagnética oposta a uma membrana metálica. A corrente elétrica ao passar pela bobina gera um forte campo eletromagnético que repulsa a membrana metálica. Conseqüentemente, o meio fluido ao redor é comprimido, criando um pulso acústico de baixa pressão e posteriormente uma onda de choque. O direcionamento para a zona terapêutica pode ocorrer de duas maneiras nos equipamentos dessa geração, através de uma lente acústica convergente ou pela reflexão da onda em um refletor metálico parabólico⁸⁴.

Por último, os dispositivos piezoelétricos possuem cristais piezoelétricos distribuídos em uma superfície esférica em camada simples ou dupla, a depender do

modelo. É essa distribuição que será responsável pela “focalização” na zona terapêutica, permitindo áreas de menor tamanho focal. Eles convertem energia elétrica em mecânica através da contração e expansão de seus cristais, gerando um pulso de baixa pressão no meio aquoso ao redor e posterior formação da onda de choque⁸⁴.

No escopo do estudo e da aplicação clínica em patologias ortopédicas, a maioria das publicações disponíveis utilizaram dispositivos eletrohidráulicos. Entretanto, apesar das diferenças apresentadas entre as três gerações de dispositivos, não existem evidências científicas que suportem a superioridade no uso de algum deles em específico^{96,97}.

3.6.3. Ação das ondas de choque sobre o tecido ósseo

Durante a propagação da onda, quando ela atinge o limite entre o meio líquido e o tecido biológico (meios de densidades diferentes), uma parte de sua energia será refletida, uma parte será atenuada e o restante sofrerá refração^{87,88,91}.

A atenuação representa a parte da energia que é perdida, sendo que sua maior porção corresponde àquela absorvida após a conversão irreversível da energia mecânica em energia térmica, por atrito direto entre as moléculas do meio ou por dispersão energética^{37,84,96}. Quanto maior a heterogeneidade do meio e seu coeficiente de atenuação, maior será essa conversão. Como o tecido ósseo possui um dos maiores coeficientes de atenuação dentre os tecidos biológicos, a TOC pode provocar dano tissular, secundário ao calor absorvido^{37,84,88}.

Após sofrer refração, as ondas de choque no tecido biológico possuem dois efeitos básicos^{37,84}. A fase de pressão positiva (compressiva) é responsável pelo efeito primário das ondas de choque, através do fenômeno de pressão da radiação acústica. Já a fase de pressão negativa (rarefação) é responsável pelo efeito secundário das ondas de choque, através de geração indireta de forças mecânicas pelo fenômeno de cavitação^{37,98-100}.

A pressão de radiação acústica é um fenômeno que ocorre nas regiões de transição entre os meios de propagação da onda. Seu efeito biológico decorre da produção de tensões mecânicas diretas e indiretas^{37,84}. A primeira acontece na direção da propagação da onda, quando o estímulo mecânico provoca deformação

relativa do tecido, proporcionando atividade elétrica e ativação celular. A indireta resulta das correntes acústicas e da conversão modal^{37,84}. A intensidade da pressão de radiação acústica é inversamente proporcional à distância com a fonte geradora, estabelecendo um gradiente de pressão. As correntes acústicas representam o fluxo de fluido da área de maior para a de menor pressão e deformam as membranas celulares. A conversão modal representa parte da onda que sofre refração perpendicular ao atingir o tecido ósseo^{37,84}.

Na cavitação, as forças de tração produzidas pela onda excedem a resistência à tração do fluido intersticial, levando à formação e oscilação de bolhas de cavitação^{37,84,99-101}. Durante a expansão da bolha, grande quantidade de energia é transferida a ela. Quando a energia em seu interior for excessivamente alta, seja após vários ou único pulso, ela se contrai rapidamente, entrando em colapso^{37,100}. Ao implodir, os desfechos possíveis são^{37,100}:

- Efeito mecânico direto sobre o tecido, devido à emissão de novas ondas de choque
- Risco de dano celular devido à produção de radicais livres, secundária à liberação da energia acumulada na forma de energia térmica
- A bolha em colapso pode se agregar a outras bolhas presentes no meio ou fragmentar-se, com repetição do ciclo expansão-colapso
- Caso o colapso seja assimétrico, microjatos com grande quantidade de energia podem se formar, colidindo com a superfície do tecido em alta velocidade, com efeito direto sobre a célula.

O estímulo mecânico proporcionado pela TOC é reconhecido pelas células ósseas, principalmente os osteócitos, e amplificado pelo sistema canalicular, causando deformação estrutural dos mecanorreceptores da membrana celular. Tal deformação ativa os mecanorreceptores, sobretudo as integrinas, desencadeando reações biológicas em cascata pró-osteogênicas^{19,20,102-109}, conforme processo de mecanotransdução, já discutido na seção 3.2.

Estudos realizados em culturas de células ósseas evidenciaram que a TOC provoca uma diminuição da viabilidade celular nas primeiras 24 a 72 horas, no entanto, não se sabe qual proporção desse efeito é consequência de lesão térmica, por impacto direto ou pelas bolhas de cavitações^{105,110}.

3.6.4 Aplicação da terapia por ondas de choque no estímulo à osteogênese em fraturas agudas

Dados da literatura, provenientes de estudos *in vitro* e *in vivo*, já demonstraram que a TOC possui potencial osteogênico, através da estimulação direta de osteoblastos e células do periósteo, modulação de Akt e FAK, diferenciação osteogênica das células mesenquimais da medula óssea (NO, ERK e TGF- β 1), aumento da quantidade de osso mineralizado (BMP-2), capacidade osteoindutiva e mediação da condrogênese (BMP-3,-4, -7) , além de estimular a angiogênese, pela expressão precoce de NO, VEGF e BMP-2^{18,19,22,102,104,106,108,109,111}.

Seu uso no tratamento de distúrbios da osteogênese (retardo de união e não união de fraturas) apresenta bons resultados, com índices de cura variando de 66% a 90,9%, de acordo com o tipo de pseudoartrose (hipertrófica ou atrófica), osso tratado, início do tratamento e protocolo de TOC utilizado^{15,16,112-120}. *D'Agostino et al*³⁸ notaram que a TOC promove consolidação óssea a partir de uma resposta biológica típica, com aumento na produção de BMP, porém a taxa de consolidação da pseudoartrose parece ser dependente principalmente do tempo transcorrido entre o trauma e a aplicação das ondas de choque. *Wang et al*^{22,108} evidenciaram que, provavelmente através da produção de microfraturas e seu hematoma resultante, a TOC viabilizou uma melhora da vascularização da pseudoartrose, com posterior consolidação, mediada por aumento de fatores angiogênicos e osteogênicos, incluindo VEGF, NO e BMP-2, em um mês após o tratamento.

Entretanto, a eficácia da TOC no tratamento de fraturas agudas ainda não foi comprovada^{11,17}. Parte desse problema pode ser atribuído à heterogeneidade dos estudos, com diferentes modelos de animais utilizados, variação do tipo de fratura produzida e da avaliação mecânica empregada, além de diferentes protocolos de TOC^{18,21,22,26,27,115,121}. A magnitude da ação da TOC, seu efeito sobre a zona terapêutica, assim como a resposta do tecido ao estímulo mecânico possui relação com a densidade do fluxo de energia, com o número de ciclos aplicados e, indiretamente, com a quantidade total de energia ministrada. Sendo assim, com a mesma finalidade e utilizando o mesmo dispositivo para tratamento, o efeito terapêutico das ondas de choque pode ser benéfico ou deletério. Não existe até o momento um protocolo de TOC para obtenção da melhor resposta ao estímulo.

Em relação ao mecanismo de ação das ondas de choque sobre a consolidação de fraturas não complicadas, trabalhos utilizando TOC de baixa energia (500 pulsos, 0,16mJ/mm²) relataram aumento na expressão de TGF- β 1, VEGF e BMP -2,-3,-4 e -7, com aumento da agregação celular e interferência positiva sobre a consolidação^{122,123}. Outro autor encontrou maior expressão de VEGF, NO, PCNA e BMP-2 após sessão de TOC de alta energia (2000 pulsos, 0,47mJ/mm²)²². Entretanto, estas análises avaliaram os efeitos sobre fases mais tardias da consolidação óssea (seguimento mínimo de sete semanas) de fraturas ou defeitos ósseos diafisários. A literatura carece de dados sobre a interferência da TOC durante o processo de consolidação desde fases precoces, bem como de sua ação sobre região metafisária dos ossos longos. Único estudo que engloba estas duas lacunas, *Gusmão et al*^{18,96} investigou o efeito de três mecanoterapias (ondas de choque, ondas de pressão radial e ultrassom pulsado de baixa intensidade) sobre a consolidação de defeito metafisário após uma, três e seis semanas. Seus resultados mostraram que a TOC influenciou positivamente o perfil de atividade e expressão de TGF- β 1, Akt e BMP-2, sobretudo na fase aguda da consolidação (até a terceira semana), tendo maior impacto do que as outras terapias^{18,96}.

No entanto, o significado clínico da regulação positiva de proteínas pró-osteogênicas sobre a biologia óssea da consolidação das fraturas ainda não está bem estabelecido. Poucos estudos experimentais buscaram essa resposta e os dados são divergentes, desde aceleração da osteogênese com melhora das características biomecânicas até prejuízo do processo de consolidação^{26,27,81,124-126}. Ademais, não foi encontrado nenhum relato sobre a relação da TOC e qualidade óssea durante consolidação intramembranosa.

Com base nesse questionamento, o presente estudo buscou analisar a qualidade do tecido ósseo em consolidação primária, através de sua resistência mecânica ao cisalhamento, quando submetido a TOC com os mesmos parâmetros que os utilizados por *Gusmão et al*^{18,96}.

4. METODOLOGIA

Este trabalho representa uma parte de um projeto maior, patrocinado pela FAPESP (Fundação de Auxílio à Pesquisa do Estado de São Paulo), número do processo 2014/26729-0, intitulado “*Estudo biomecânico e biomolecular de métodos terapêuticos de regeneração óssea*” e que teve como pesquisador principal o Prof. Dr. William Dias Belangero. Os diversos trabalhos que se originaram desse projeto são interdependentes e em alguns casos compartilharam dados experimentais. O presente trabalho compartilhou o grupo Controle com o trabalho do aluno de doutorado João Fernando Saraiva¹²⁷, atendendo assim ao aumento de rigor que vem se impondo em relação a quantidade de animais de laboratório usados nos experimentos.

4.1. Casuística

Os animais foram fornecidos pelo Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB - UNICAMP) após a realização do curso “Legislação e procedimentos para utilização de animais de laboratório” e a aprovação do Comitê de Ética em experimentação animal do Instituto de Biologia (protocolo número 4703-1/2017). No total, foram utilizados 42 ratos da espécie *Rattus norvegicus* e linhagem Unib: W-H, machos, próximos a 12 semanas de vida, dos quais 21 foram compartilhados com outro trabalho do mesmo projeto, citado acima¹²⁷, e que precedeu cronologicamente a realização do presente estudo.

Antes da cirurgia, os animais foram mantidos no biotério de experimentação do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental (NMCE) da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) - UNICAMP, adequadamente acondicionados em gaiolas com cinco animais cada, em ambiente silencioso, sob temperatura variando de 22°C a 25°C com estante ventilada, regime de 12 horas de luz artificial e 12 horas no escuro, e com oferta de água e ração própria a livre demanda.

4.2. Desenho experimental

Os 42 ratos foram divididos em dois grupos de 21, um grupo Controle, compartilhado com João Fernando Saraiva¹²⁷, e um grupo experimental, doravante denominado grupo “Onda”. Cada grupo foi subdividido em três subgrupos com sete animais cada, de acordo com o tempo de seguimento: C1 – Controle e eutanásia após uma semana; C2 – Controle e eutanásia após duas semanas e C3 – Controle e eutanásia após três semanas; O1 – estimulado por TOC e eutanásia após uma semana; O2 – estimulado por TOC e eutanásia após duas semanas e O3 – estimulado por TOC e eutanásia após três semanas. A distribuição dos animais está representada na tabela 3.

Tabela 3. Distribuição de animais de acordo com grupo experimental (Controle vs Onda) e tempo de seguimento (1, 2 ou 3 semanas)

Tratamento	Controle ¹²⁷			Onda		
	C1	C2	C3	O1	O2	O3
Grupo	C1	C2	C3	O1	O2	O3
Seguimento (semanas)	1	2	3	1	2	3
Animais (patas) para ensaio mecânico	7 (14)	7 (14)	7 (14)	7 (14)	7 (14)	7 (14)

Independente do subgrupo (C1, C2, C3, O1, O2, O3), defeitos ósseos foram produzidos nas duas patas posteriores de cada animal, totalizando 84 patas. Os espécimes (14 patas) de cada subgrupo foram alocados para realização do ensaio mecânico, após análise macroscópica do defeito por estereomicroscopia.

4.3. Procedimento cirúrgico

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados no Laboratório de Biomateriais em Ortopedia (LABIMO), onde os animais foram mantidos nas gaiolas e livres de perturbações durante duas horas antes do início do procedimento.

A partir de então, todos eles foram pesados e anestesiados por via intraperitoneal com Quetamina (80-100 mg/kg) e Xylazina (5 a 15 mg/kg). Após a anestesia, realizou-se a tricotomia e a assepsia dos membros posteriores bilateralmente com digliconato de clorexidina a 2%. Ao término do preparo, cada animal foi posicionado em decúbito dorsal horizontal na mesa cirúrgica higienizada com fixação dos membros anteriores (Figura 7).



Figura 7. Posicionamento do animal em mesa cirúrgica, após preparo adequado das patas posteriores.

A intervenção cirúrgica (Figura 8) foi realizada nos dois membros posteriores de todos os animais, uma pata por vez, da seguinte maneira:

- 1) Incisão longitudinal medial na pele na região proximal da tíbia e divulsão por planos
- 2) Exposição medial da metáfise proximal da tíbia (sulco extensor medial), proximal à inserção dos tendões isquiotibiais.
- 3) Produção de defeito ósseo monocortical de 3,2 mm diâmetro e 1,5 mm de profundidade, através do uso de uma broca helicoidal de 3,2 mm com limitador para profundidade de 1,5 mm em furadeira de baixa rotação (130 rpm).
- 4) Irrigação do defeito com soro fisiológico para eliminação de fragmentos ósseos produzidos.
- 5) Sutura simples da pele com fio mononylon 3.0
- 6) Limpeza em toda extensão da ferida produzida com soluções de clorexidina 2% e fisiológica.

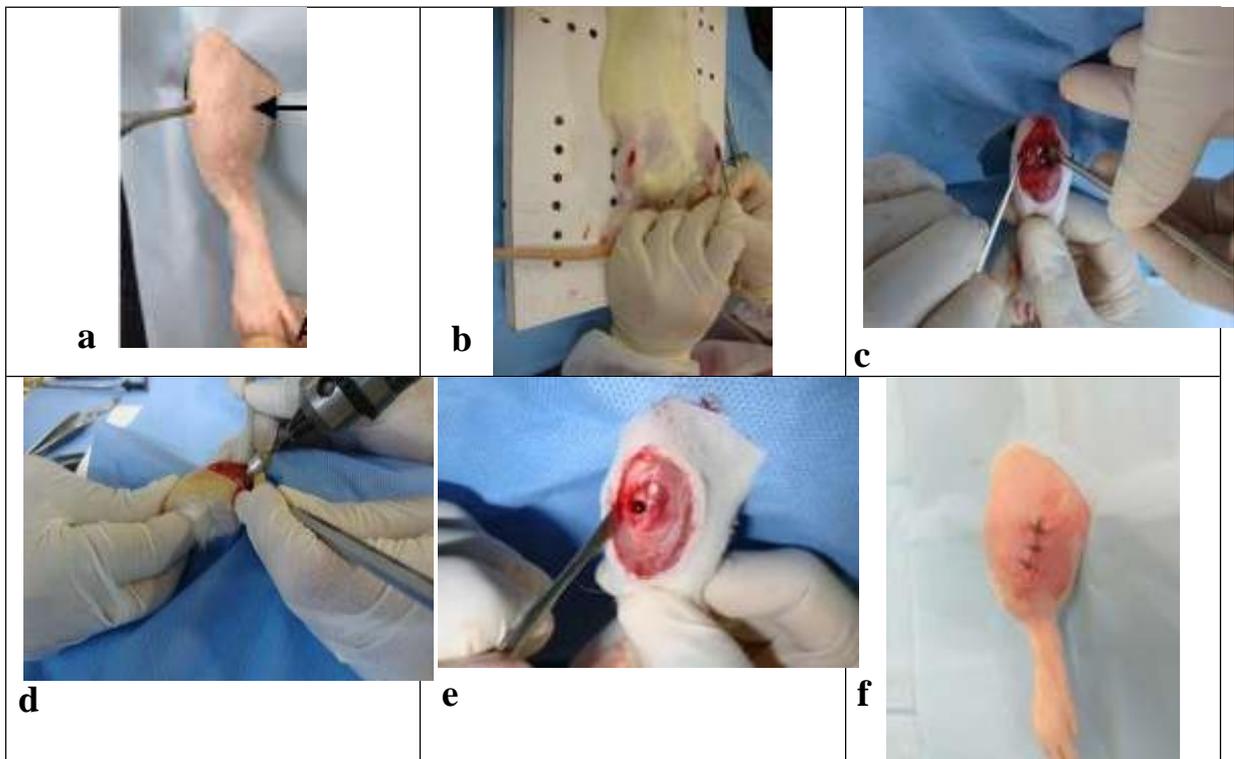


Figura 8. Etapas da intervenção cirúrgica. **a)** A seta aponta a localização da incisão em face medial da tíbia proximal **b)** Incisão longitudinal medial na pele na região proximal das tíbias direita e esquerda **c)** Exposição medial da metáfise proximal da tíbia (sulco extensor medial), proximal à inserção dos tendões isquiotibiais **d)** Produção de defeito ósseo monocortical de 3,2 mm diâmetro e 1,5 mm de profundidade, através do uso de uma broca helicoidal de 3,2 mm com limitador para profundidade de 1,5 mm em furadeira de baixa rotação (130 rpm) **e)** Defeito ósseo produzido, após irrigação com solução fisiológica para eliminação de fragmentos ósseos **f)** Sutura simples de pele com fio mononylon 3.0 e limpeza em toda extensão da ferida produzida com soluções de clorexidina 2% e fisiológica.

4.4. Terapia por Ondas de choque

Ao final do procedimento cirúrgico, ainda sob efeito anestésico, o grupo Onda foi submetido a única sessão de estimulação por TOC focal, um membro por vez. Foi usado aparelho do tipo eletro-hidráulico do modelo Switech Medical, Activator Vet[®], 2009, com gel condutor de base aquosa na região ao lado da ferida operatória

e aplicação de estímulo único de 500 pulsos a $0,12 \text{ mJ/mm}^2$ com frequência constante de 4 Hz (Figura 9).

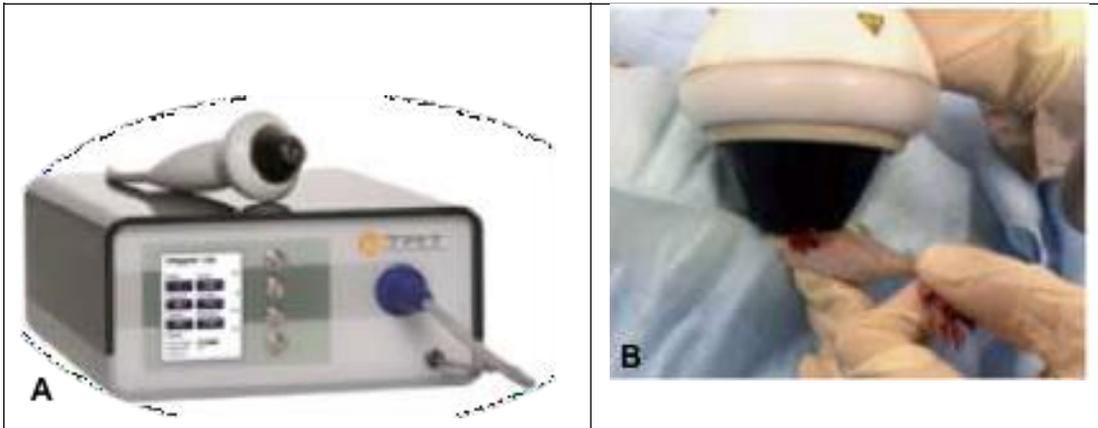


Figura 9 a) Dispositivo eletro-hidráulico Evotron (Switech Medical-Activator Vet) utilizado para aplicação das ondas de choque **b)** Sessão de estimulação com posicionamento do probe.

Após o procedimento, todos os animais foram realocados em caixas de polipropileno identificadas com três animais cada e mantidos em observação no LABIMO até completa recuperação anestésica. Em seguida, as caixas foram acondicionadas em salas com as estantes ventiladas, específicas para animais em experimentação no Biotério de Experimentação Animal do NMCE, mantendo as mesmas condições descritas anteriormente (Figura 10). Eles foram monitorados diariamente para identificação de efeito adverso até a data da eutanásia conforme protocolo preestabelecido.

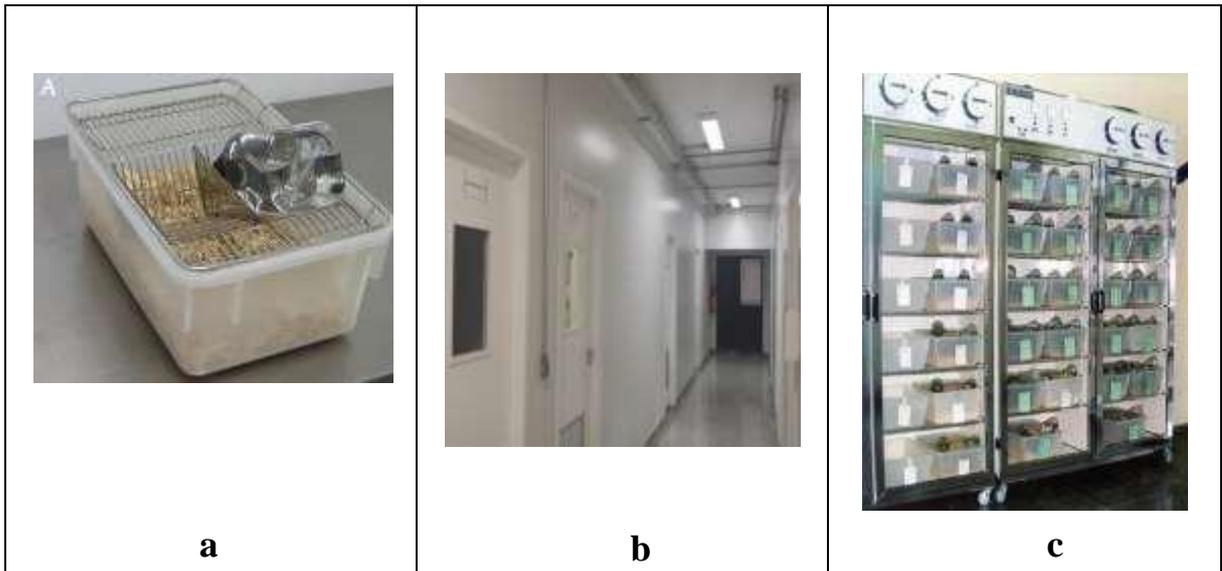


Figura 10. Acondicionamento dos animais no pós-operatório. **a)** Animais acondicionados em caixa de polipropileno com 3 animais cada uma **b)** Dependências do Biotério Multidisciplinar do NMCE **c)** Caixas com os animais alojados em estantes ventiladas com parâmetros sanitários, físicos, químicos e biológicos controlados.

4.5. Extração óssea e eutanásia

Após uma, duas e três semanas, conforme o subgrupo designado, os animais foram anestesiados seguindo o mesmo protocolo do procedimento cirúrgico. Após a perda do reflexo podal, foram realizadas incisões longitudinais mediais amplas com exposição da tíbia e da fíbula. Em seguida, a tíbia e a fíbula foram extraídas, através da desarticulação do joelho, sem a cartilagem articular (Figura 11). A fíbula foi separada e descartada com cuidado para que o tecido ósseo formado sobre o defeito não fosse manipulado. Ao término da extração óssea, a anestesia foi aprofundada com dose três vezes maior que a utilizada para causar o óbito dos animais.

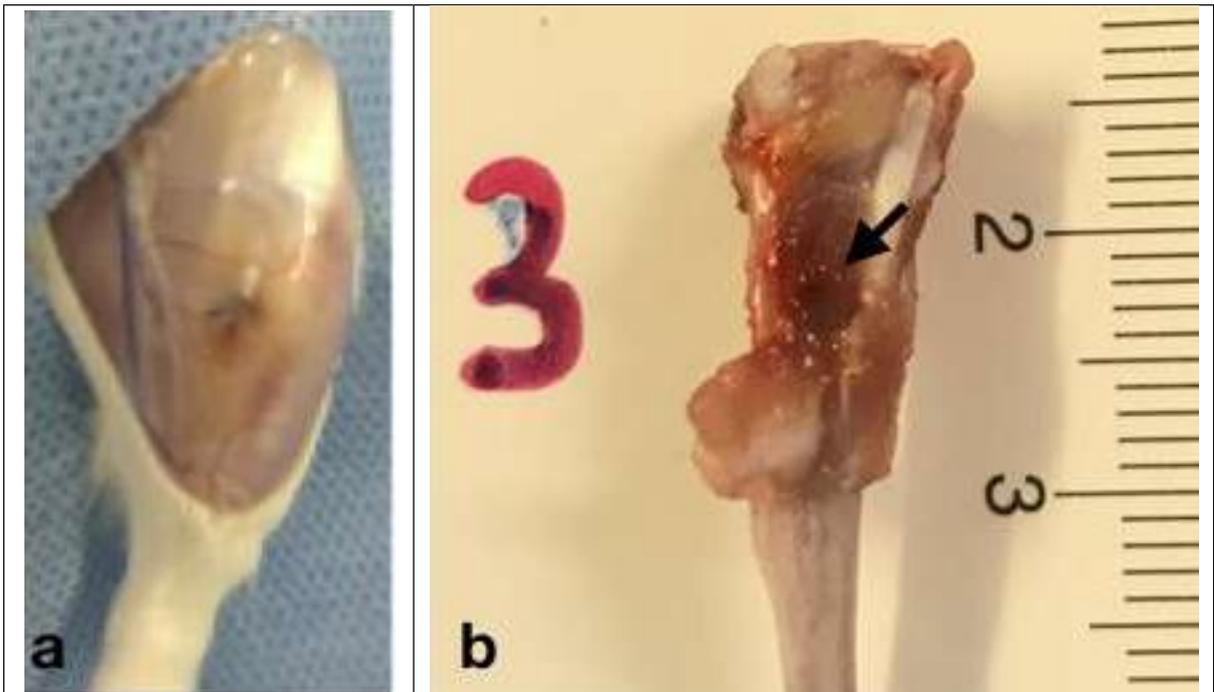


Figura 11 a) Incisão longitudinal ampla realizada para extração óssea b) Aspecto da tíbia após desarticulação. A seta aponta para o local onde foi feito o defeito ósseo monocortical, com o tecido neoformado preservado.

4.6. Preparação das amostras para análise macroscópica e ensaio mecânico

Imediatamente após retirada, as tíbias (direita e esquerda) de cada animal foram individualmente armazenadas em recipientes previamente identificados, contendo solução de formaldeído 3,7% tamponado com Fostato de Sódio Bibásico (30 mM de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) e fosfato de sódio monofásico (45 mM de NaHPO_4), por um período de uma semana. Após, o excesso de fixador foi descartado e as 84 amostras foram mantidas em capela de exaustão de gases sob temperatura que variava de 20 a 30°C por sete dias para secagem total.

Em seguida, foram embutidas a vácuo em resina epóxi de cura a frio (Figura 12A) e cortadas com disco diamantado em cortadora de precisão Isomet 4000 (Buehler, EUA), de modo a se obter amostras com 0,9 mm de espessura contendo o defeito (Figura 12B), conforme metodologia desenvolvida por *Mariolani et al*¹²⁷. Para garantir o posicionamento adequado do punção durante o ensaio mecânico, os limites

dos defeitos com neotecido formado foram delineados com caneta de tinta permanente nas amostras de duas e de três semanas (Figura 12C).

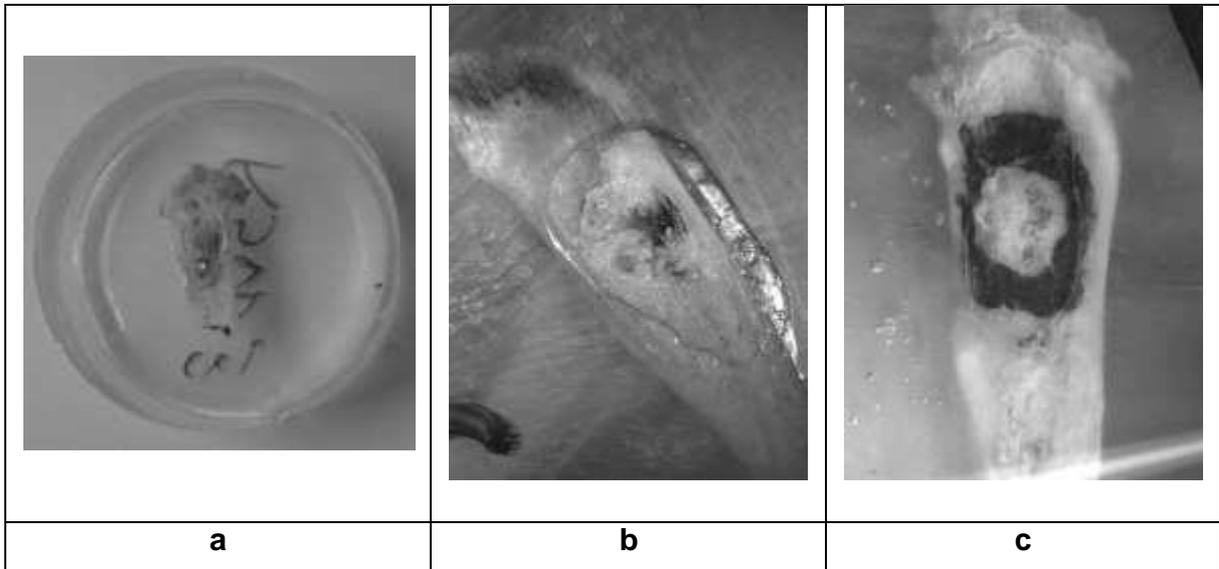


Figura 12. Amostras incluídas à vácuo em resina Epóxi a frio **a)** Amostra em resina sem corte **b)** Amostra embutida e já cortada com 0,9 mm de espessura **c)** Amostra pronta com o defeito delimitado para a realização da aquisição de imagem por estereomicroscópio e teste de cisalhamento.

4.7. Análise Macroscópica por Estereomicroscopia

Após preparo descrito acima, as amostras foram posicionadas em aparelho estereomicroscópico (lupa), marca Leica[®] modelo MZ7.5, com luz incidente 90° na região central do defeito ósseo. Foram obtidas imagens dos grupos Controle e Onda com aumentos de 1.0X, 2.5X e 4.0X.

4.8. Análise mecânica – ensaio de cisalhamento

Após a etapa descrita em 4.6 e 4.7, as tíbias foram submetidas ao ensaio mecânico de cisalhamento, conforme proposto por *Mariolani et al*¹²⁷.

Os ensaios das amostras foram realizados em uma máquina ensaios EMIC DL300 com uso de uma célula de carga com capacidade de 500 N, à qual foi acoplado

um punção com 2,5 mm de diâmetro. A fatia de osso contendo o defeito era posicionada sobre uma matriz especialmente construída para este ensaio, a qual possui um furo central de 2,6 mm de diâmetro. O punção era posicionado perpendicularmente ao local do reparo ósseo e, a partir do ponto em que tocava a amostra, era movimentado para baixo a uma velocidade de 0,5 mm/min até completo cisalhamento do tecido (Figura 13 e 14).

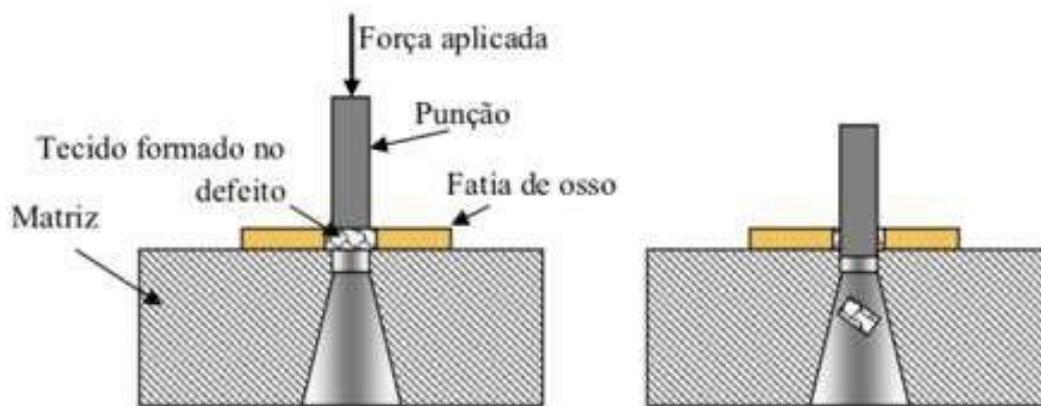


Figura 13. Representação esquemática do ensaio de cisalhamento. (Ilustração feita por José Ricardo Mariolani e reproduzida com sua autorização).

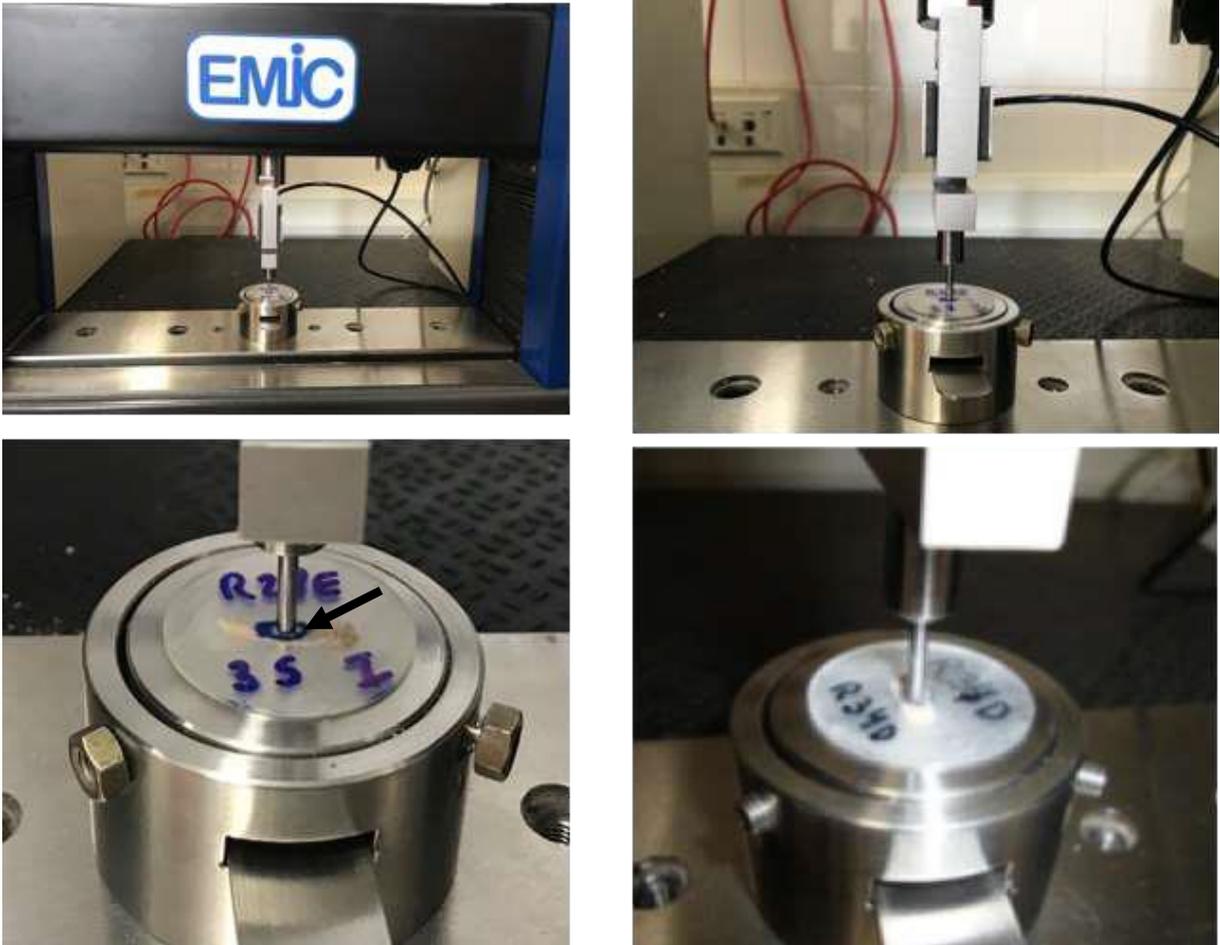


Figura 14. Ensaio de cisalhamento de amostra em máquina de ensaio EMIC DL300. A marcação das bordas dos defeitos com tinta permanente (seta) facilitava a identificação dos mesmos, garantindo um melhor posicionamento do punção. Notar que o punção é posicionado perpendicularmente ao centro da área em consolidação.

O software TESC[®] da máquina registrou os valores de força medidos pela célula de carga e de deslocamento vertical do punção e gerou curvas de força versus deslocamento, além de registrar a força máxima atingida durante o ensaio (Apêndice 1).

4.9. Análise estatística

Todas as variáveis contínuas são apresentadas em média e desvio-padrão. A análise estatística dos resultados foi feita por testes não paramétricos, devido ao número reduzido de amostras. Para verificar se a hipótese nula (sem diferença significativa entre os dois grupos) poderia ser rejeitada foram utilizados o teste U de Mann-Whitney (para duas amostras independentes) e o teste de Kruskal-Wallis (na comparação de dois ou mais grupos), considerando-se o nível de significância de 5% ($p < 0,05$) para todas as avaliações. As variáveis foram descritas através das medidas de tendência central e dispersão. As análises foram realizadas pelo software IBM® SPSS® Statistics versão 24 (Armonk, NY, USA).

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização e evolução clínica dos animais

Foram obtidas 84 amostras, provenientes das patas posteriores direita e esquerda de cada um dos 42 animais. Nenhum animal evoluiu a óbito ou apresentou complicações pós-operatórias ou efeitos adversos da aplicação da onda de choque, como hematoma local ou infecção. Todos foram capazes de realizar carga nos membros posteriores logo após a recuperação anestésica e evoluíram sem intercorrências até a data programada para eutanásia.

No início do experimento (data do procedimento cirúrgico), as cobaias apresentaram idade variando entre 11 semanas e 6 dias e 13 semanas e 1 dia e a massa corpórea média foi de 445,82 gramas. A variação ponderal média dos animais (*i.e.* diferença entre o peso na data da eutanásia e o inicial) para os tempos de seguimento de 1, 2 e 3 semanas foi, respectivamente, 5,68, 17,79 e 50,86 gramas. Não houve diferença das variações ponderais entre os grupos Controle e Onda para cada tempo de seguimento ($p=0,102$, $p=0,125$ e $p=0,105$, respectivamente).

As médias e desvios padrões da massa corpórea e da idade dos animais na data do procedimento cirúrgico em função do grupo e do tempo de seguimento são apresentados na tabela 4. Nota-se que houve diferença significativa quanto a idade dos animais entre os grupos Controle e Onda para todos os tempos de seguimento; no entanto, este dado não possui significado biológico visto que todos os animais correspondem a adultos jovens, sem diferenças entre suas propriedades ósseas e de consolidação¹²⁸. Com relação à massa corpórea inicial, houve diferença entre os grupos Controle e Onda para os tempos de seguimento de 1 e 3 semanas ($p = 0,000$ para ambos), porém esta diferença também não possui valor biológico para o experimento realizado, visto que o defeito produzido se cura por ossificação intramembranosa, não sofrendo influência mecânica do peso do animal^{64,68,129,130}.

Tabela 4. Médias e desvios padrões da massa corpórea e da idade dos animais na data do procedimento cirúrgico em função do grupo (Controle vs Onda) e do tempo de seguimento (semanas 1,2 e 3).

	Grupo		p-valor
	Controle	Onda	
Peso inicial (g)			
Semana 1	425,8 ± 23,0	470,3 ± 9,1	0,000
Semana 2	413,7 ± 18,2	442,7 ± 50,8	0,231
Semana 3	405,1 ± 33,0	444,1 ± 13,1	0,000
Idade inicial (d)			
Semana 1	92*	89*	0,000
Semana 2	92*	90*	0,000
Semana 3	91,6 ± 0,5	83,6 ± 0,5	0,000

*Desvio padrão igual a 0

5.2. Análise macroscópica do espécime por estereomicroscopia

A avaliação macroscópica por estereomicroscopia foi aplicada para analisar o posicionamento dos defeitos ósseos produzidos e observar a evolução temporal da consolidação óssea em ambos os grupos Controle e Onda.

O posicionamento adequado do defeito na região da metáfise proximal da tíbia e ausência de fraturas iatrogênicas associadas permitiu incluir todas as 84 amostras na análise mecânica.

Além disso, as imagens obtidas ilustram a evolução macroscópica da consolidação do defeito ósseo no transcorrer do tempo de seguimento em ambos os grupos (Figuras 15 e 16). Tanto para o grupo Controle quanto para o Onda, nas imagens de 1 semana, a área do defeito produzido ainda é facilmente delimitada; no entanto, nas imagens de 2 e 3 semanas é difícil definir os limites da região em consolidação. Infelizmente, não foi possível quantificar na análise macroscópica se a consolidação entre os grupos apresentou alguma diferença de acordo com os tempos de seguimento.

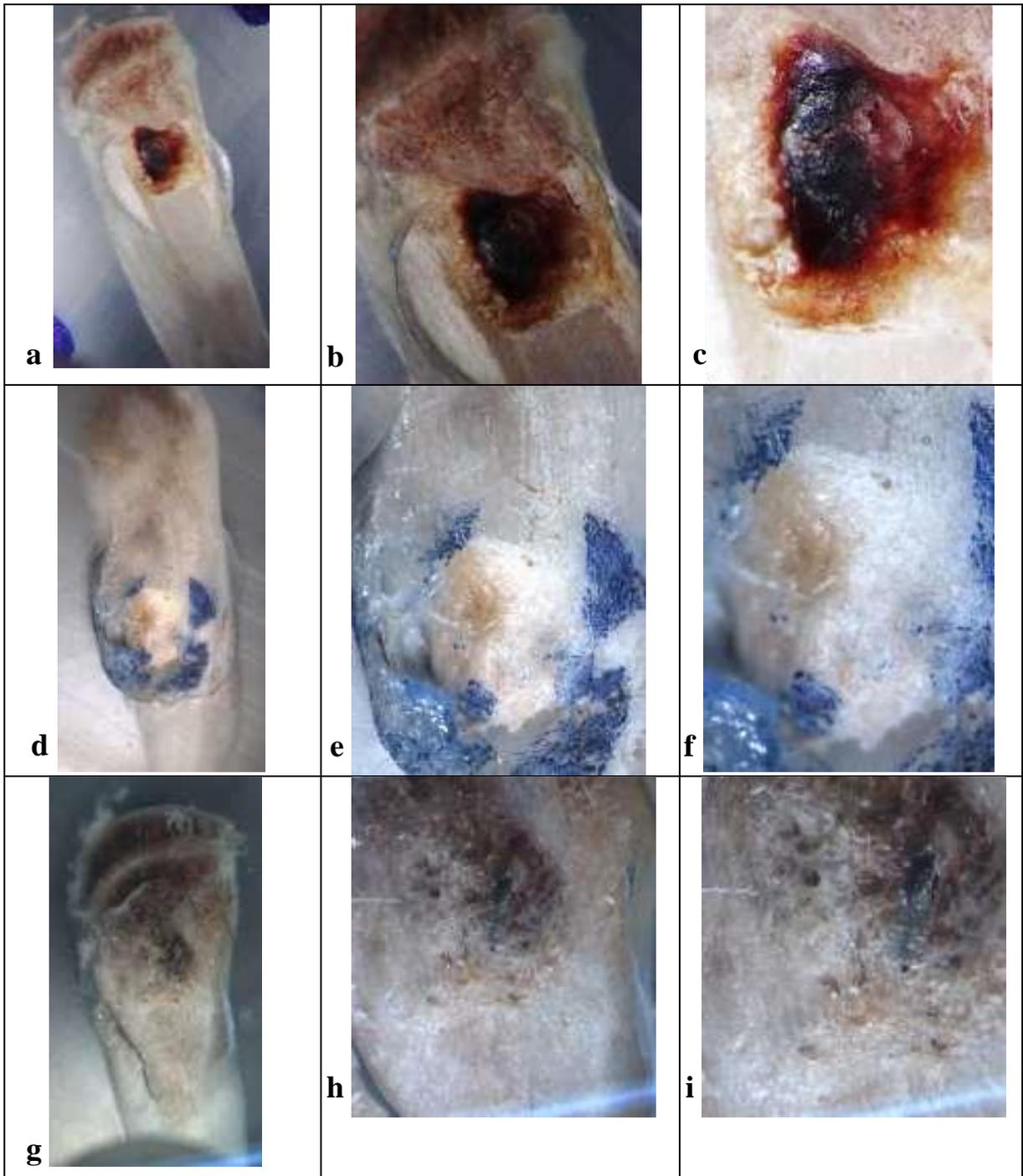


Figura 15. Aspecto macroscópico do defeito ósseo do grupo Controle, observado em lupa em três diferentes aumentos, de acordo com o tempo de seguimento: 1 semana (**a,b,c**), 2 semanas (**d,e,f**) e 3 semanas (**g,h,i**). Foram utilizados aumento de 1.0X (imagens **a,d,g**), 2.5X (imagens **b,e,h**) e 4.0X (imagens **c,f,i**). Pelas imagens é possível acompanhar a evolução do processo de reparo: na semana 1, a área do defeito é facilmente identificada; a partir da semana 2, torna-se difícil definição dos limites da região de reparo.

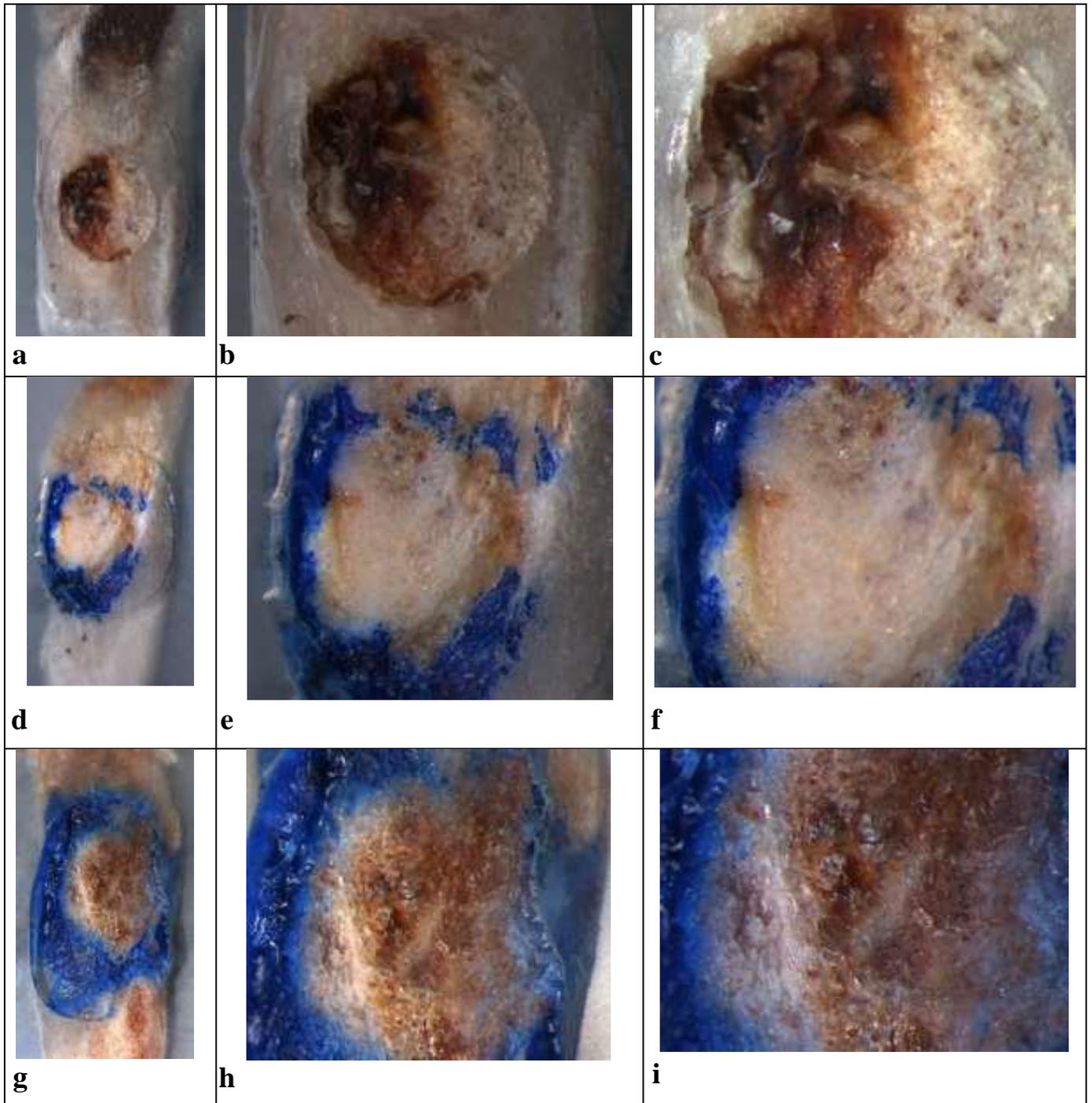


Figura 16. Aspecto macroscópico do defeito ósseo do grupo Onda, observado em lupa em três diferentes aumentos, de acordo com o tempo de seguimento: 1 semana (**a,b,c**), 2 semanas (**d,e,f**) e 3 semanas (**g,h,i**). Foram utilizados aumento de 1.0X (imagens **a,d,g**), 2.5X (imagens **b,e,h**) e 4.0X (imagens **c,f,i**). Pelas imagens é possível acompanhar a evolução do processo de reparo: na semana 1, a área do defeito é facilmente identificada; a partir da semana 2, torna-se difícil definição dos limites da região de reparo.

5.3. Ensaio mecânico de cisalhamento – análise da força máxima de cisalhamento

Os valores médios e desvios padrões da força máxima de cisalhamento necessária para cisalhar o tecido ósseo neoformado, de acordo com o grupo e o tempo de seguimento, estão representados na Tabela 5.

Não foi observado qualquer efeito principal ou interação significativa envolvendo a lateralidade (semana 1: $p = 0,681$; semana 2: $p = 0,129$; semana 3: $p = 0,783$), indicando que havia similaridade dos valores de força entre as patas direita e esquerda, independentemente do grupo ou da semana em que foram avaliados.

A média das forças máximas de cisalhamento no grupo Onda foi superior à do grupo Controle apenas na semana 1 (Figura 17 e Tabela 5). Nos demais períodos, as forças de cisalhamento foram semelhantes entre os grupos (Figura 18 e 19, Tabela 5).

No grupo Onda foi observado que o aumento da força máxima de cisalhamento foi concentrado no intervalo da semana 1 para a semana 2, sendo que entre as semanas 2 e 3 não houve diferença das forças. No grupo Controle, por sua vez, houve um aumento da força necessária para o cisalhamento em todos os intervalos (Tabela 6, Figura 20 e 21).

Tabela 5. Médias e desvios padrões das forças máximas de cisalhamento (N) nas semanas 1, 2 e 3 em função do grupo (Controle vs Onda).

	Grupo		p-valor
	Controle	Onda	
Semana 1	24,57 ± 6,18 [14,71 – 33,86]	52,40 ± 23,64 [26,77 – 103,10]	0,000*
Semana 2	80,46 ± 42,16 [22,34 – 155,82]	101,89 ± 47,50 [43,46 – 192,05]	0,358
Semana 3	147,89 ± 62,41 [65,44 – 277,60]	117,53 ± 45,23 [33,90 – 192,47]	0,198

Dados são: média ± desvio padrão [mín – máx]

Tabela 6. Variação das médias das forças máximas de cisalhamento (N) entre as semanas estratificada pelo grupo.

	Variação da média da força		p-valor
	Absoluto (N)	Relativo (%)	
Controle			
Semana 1 – 2	+ 55,89	+ 227,5	0,000
Semana 2 – 3	+ 67,43	+ 83,8	0,005
Semana 1 – 3	+ 123,32	+ 501,9	0,000
Onda			
Semana 1 – 2	+ 49,49	+ 94,4	0,000
Semana 2 – 3	+ 15,64	+ 15,3	0,352
Semana 1 – 3	+ 65,13	+ 124,3	0,000

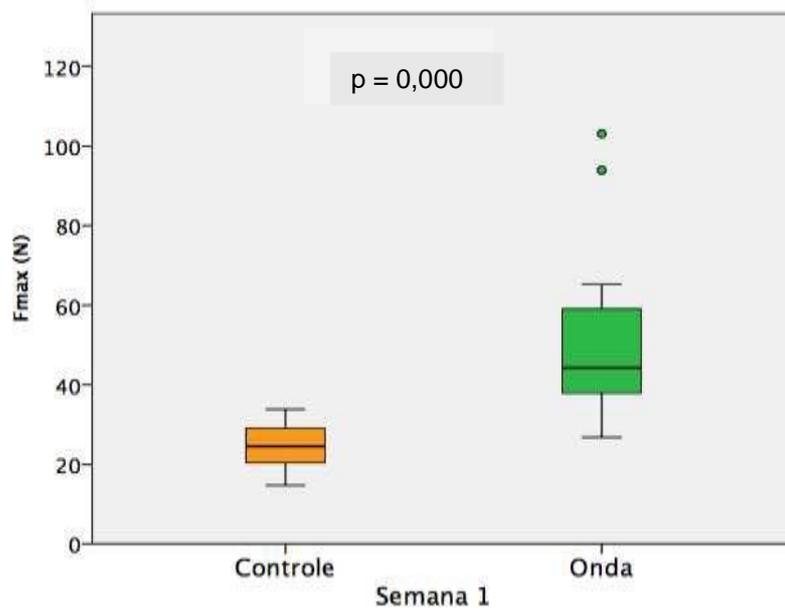


Figura 17 - Gráfico da força necessária para produzir o cisalhamento em cada grupo na semana 1.

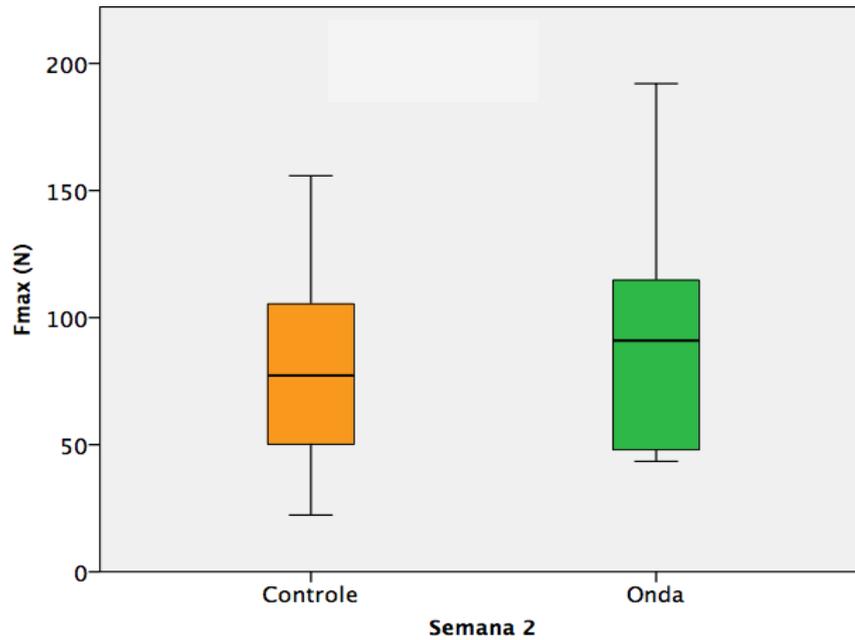


Figura 18 - Gráfico da força necessária para produzir o cisalhamento em cada grupo na semana 2. ($p=0,358$)

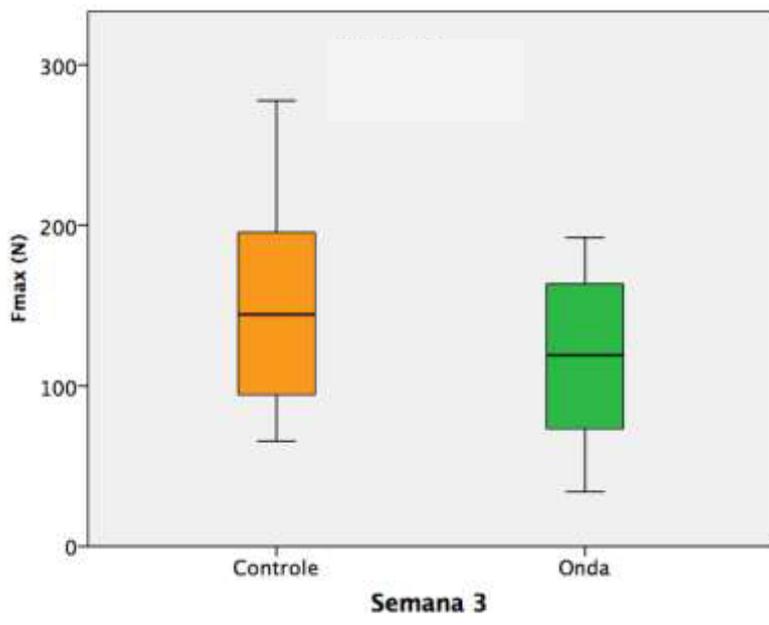


Figura 19 - Gráfico da força necessária para produzir o cisalhamento em cada grupo na semana 3. ($p= 0,198$)

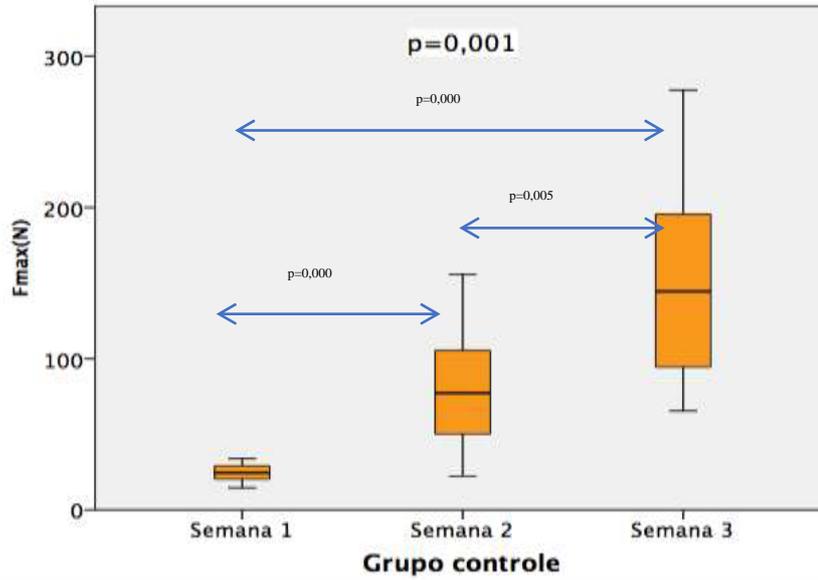


Figura 20- Gráfico das forças necessárias para produzir o cisalhamento, em função das diferentes semanas, no grupo Controle.

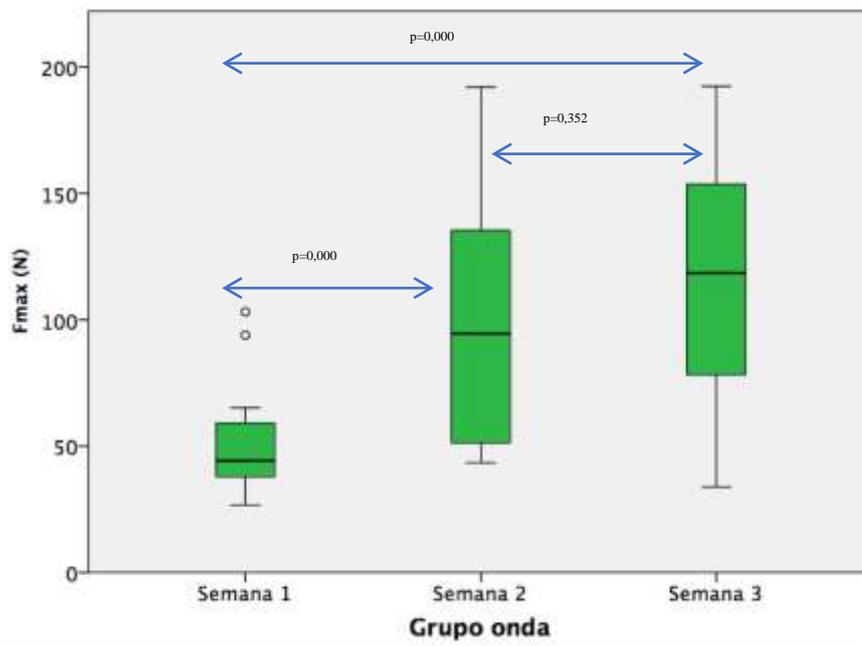


Figura 21- Gráfico das forças necessárias para produzir o cisalhamento, em função das diferentes semanas, no grupo Onda.

6. DISCUSSÃO

O emprego de ratos como modelos para avaliação da osteogênese e de distúrbios ósseos é frequente. Sua biologia, anatomia, microarquitetura óssea e metabolismo validam seu papel no estudo da consolidação de variados padrões de fraturas, de alongamento ósseo, bem como da qualidade de implantes e de diferentes métodos de osteossíntese^{129,131-134}.

Com o objetivo de avaliar a qualidade do osso formado durante o processo de consolidação adotou-se um modelo *in vivo*, utilizado previamente em nosso grupo, que consiste na perfuração óssea monocortical com 3,2 mm de diâmetro na metáfise proximal das tíbias de ratos^{37,127,135}. A superfície relativamente plana da região metafisária, com área suficiente para conter o defeito e de fácil acesso, diminui o risco de fraturas iatrogênicas durante o procedimento^{18,78,127,135} e as chances de complicações peri-operatórias, incluindo o óbito⁷⁸. Apesar de *Balmayor et al* e *Scholz et al*¹²⁹ citarem que o modelo de perfuração monocortical tem como desvantagem não mimetizar as reais condições de uma fratura, por outro lado tem a vantagem de produzir um defeito reprodutível e cujo reparo ocorre independentemente da influência mecânica de cargas externas ou do peso do animal, através da ossificação por primeira intenção^{74,129,130,136,137}.

O reparo ósseo no defeito circular produzido ocorre da periferia para o centro^{78,127}; dessa maneira, ensaio de cisalhamento por punção possibilita a análise mecânica do osso neoformado desde fases bem precoces da consolidação¹²⁷. A metodologia do ensaio de cisalhamento foi preestabelecida em nosso grupo por um dos nossos colaboradores¹²⁷. A resistência ao cisalhamento neste mesmo modelo animal foi avaliada em sete diferentes tempos de seguimento, variando de uma a 12 semanas. Esse estudo detectou que havia aumento da força necessária para cisalhar o tecido ósseo formado entre as três primeiras semanas¹²⁷, determinando, portanto, que esse seria o período de tempo de seguimento para futuros estudos comparativos.

No atual estudo, não foi identificada diferença entre os lados direito e esquerdo do mesmo animal, mostrando que o teste utilizado tinha reprodutibilidade. O aumento esperado da força para produzir o cisalhamento ao longo do tempo, dentro de cada grupo, era esperado e foi confirmado pela avaliação mecânica, demonstrando que este ensaio tinha sensibilidade para esta diferenciação.

A análise da literatura mostra que não existem parâmetros ideais para o tratamento das doenças ortopédicas pela onda de choque, já que são encontradas grandes variações dos desfechos dificultando as comparações^{12,14,18,21,27,37,79–81,86,88,92,115,117,119,125,126,138–143}. O valor da densidade de fluxo de energia utilizado é amplamente heterogêneo, variando de 0,10 a 0,63 mJ/mm². Rompe et al¹³⁸ subdividem a terapia por ondas de choque, de acordo com sua densidade de fluxo de energia, em baixa energia (menor do que 0,08 mJ/mm²), média energia (entre 0,08 e 0,6 mJ/mm²) e alta energia (maior do que 0,6 mJ/mm²). Apesar de alguns estudos sugerirem que a ação das ondas de choque sobre tecido ósseo é dose-dependente^{144,145}, a maior parte das evidências apontam que a utilização da TOC de alta energia apresenta resultados insatisfatórios, com dano celular e comprometimento da consolidação óssea.^{103,104,146,147} Wang et al¹⁰⁸, seguindo aplicação em sessão única de 0,12mJ/mm², demonstram que os níveis de BMP-2, NO e VEGF foram expressos da primeira a oitava semana do estímulo¹⁰⁸.

Não há também definição quanto ao momento da realização da primeira sessão e a quantidade de sessões. Estudos *in vitro* em cultura de células propõem que as ondas de choque apresentam efeitos deletérios nas primeiras 24 a 72 horas após sua aplicação, induzindo a apoptose celular^{106,148,149}. Apesar disso, experimentos em animais demonstram que um estímulo é suficiente para iniciar o processo de ossificação, com agregação de células tronco mesenquimais e sua diferenciação em osteoblastos, a partir da primeira semana após o estímulo^{96,121,150}. Em modelos experimentais, é aconselhável evitar o estímulo previamente à cirurgia, pois ele pode causar lesão vascular e edema do campo cirúrgico com aumento dos riscos peri-operatórios^{96,121,150}. A maioria dos autores tem optado pela aplicação logo após a fratura ou defeito, aproveitando o efeito da anestesia^{21,22,24,81,121,144,151,152}. Não há evidências sobre a superioridade de uma ou de várias sessões, inclusive com evidências de que não há diferença entre esse número, tanto para a cascata biomolecular quanto para as propriedades mecânicas da osteogênese^{21–}

24,81,121,126,144,145,152–155.

A quantidade de pulsos administrados varia entre 250 e 6000^{21,105,111,119,121,139,144,145,155–157}. Não é possível concluir sobre o número ideal de pulsos por sessão e vários autores norteiam suas escolhas empiricamente, baseando-se na finalidade do uso, no tamanho do osso e no porte do animal. Em estudos que

analisam as propriedades mecânicas do osso após a TOC, o número de pulsos varia de 100 a 4000. ^{21,81,125,126,144}.

A mecanotransdução e o emprego de terapias alternativas para o estímulo da osteogênese tem sido objeto de estudo do grupo do LABIMO-UNICAMP há alguns anos. O protocolo adotado neste estudo com estímulo único, de 500 pulsos a 0,12 mJ/mm² foi aplicado por *de Faria et al*¹⁵⁰ em tíbias íntegras de ratos com ativação da resposta bioquímica intracelular pró-osteogênica, com aumento significativo da modulação da expressão de Akt e da Erk -1, -2 após 7 e 14 dias e aumento de Akt após 14 dias do estímulo. *Gusmão et al*^{18,96}, através do mesmo modelo de fratura e com os mesmos parâmetros das ondas de choque, evidenciaram um efeito pró-osteogênico com aumento da atividade de Akt e da expressão de precursor de TGF-B1 após uma semana e da atividade da FAK após três semanas do estímulo. Frente à falta de consonância sobre os parâmetros ideais das ondas de choque, associada à experiência pessoal dos autores e aos resultados promissores nos estudos biomoleculares da TOC em nosso laboratório, mantivemos o mesmo protocolo já adotado anteriormente^{18,96} para avaliarmos o aspecto mecânico da interferência da TOC sobre a consolidação óssea.

Assim foi escolhida a aplicação única de 500 pulsos neste modelo experimental para estimular a reposta biológica *in vivo*, desencadeando a cascata osteogênica, sem aumentar o risco de lesão celular.

Embora o tratamento por onda de choque focal estimule o processo de reparo ósseo nos distúrbios da consolidação, seu papel sobre o tratamento de fraturas agudas ou não complicadas não está bem estabelecido, com poucos estudos clínicos disponíveis e todos com baixo nível de evidência ^{11,17,139,158}. Mesmo em estudos experimentais, a influência da TOC no processo de consolidação não complicada ainda não foi definitivamente comprovada, visto que há desfechos divergentes sobre sua efetividade^{22,26,27,81,124-126}.

Poucos estudos avaliam a ação da TOC sobre o comportamento mecânico do osso durante o processo de consolidação, sendo que majoritariamente analisam o reparo ósseo em fraturas diafisárias, as quais consolidam por ossificação intramembranosa e endocondral. Além disso, há heterogeneidade entre os desenhos de estudo com diferentes modelos animais e variação dos parâmetros das ondas de choque ^{21,22,81,121,126,144,152}. Independente do animal (ratos, coelhos, cachorros e ovelhas), da quantidade de sessões da TOC (uma a quatro), do número de pulsos

(entre 100 e 4000) e da densidade do fluxo de energia (entre 0,12 e 0,63mJ/mm²), a maioria deles não encontrou diferença significativa sobre a resistência mecânica do osso neoformado entre o grupo controle e o grupo estimulado com aplicação de ondas de choque focal^{21,22,81,121,126,152}. Em contrapartida, *Wang et al*¹⁴⁴, em estudo em coelhos, analisam a resistência mecânica após 24 semanas de fratura de fêmur em dois protocolos de sessão única de TOC focal (2000 pulsos a 0,18mJ/mm² vs 4000 pulsos a 0,47mJ/mm²), encontrando melhora biomecânica no grupo de alta energia¹⁴⁴. Posteriormente, o mesmo autor avalia a resistência mecânica após 12 semanas de aplicação única de 2000 pulsos a 0,47mJ/mm² no mesmo modelo de fratura, encontrando maior formação de osso cortical e melhor resistência mecânica no grupo estimulado quando comparado ao controle²². *Hsu et al*²¹ em fraturas diafisárias em tíbias de coelhos submetidas a duas ou três sessões de TOC focal (5000 pulsos, 0,32mJ/mm²), em tempos de seguimento de quatro ou seis semanas, refere melhora mecânica do grupo estimulado em relação ao controle, porém sem diferença quanto ao número de sessões²¹.

Quanto à avaliação da influência da TOC sobre o reparo de ossos longos por consolidação intramembranosa, as publicações são ainda mais escassas, sendo encontrados apenas dois relatos de experimentos *in vivo*^{151,159}, sendo que um deles utiliza modelo animal com osteoporose¹⁵¹. *Mackert et al*¹⁵¹ estudam interferência de três protocolos diferentes quanto à densidade de fluxo de energia (0,15, 0,35 ou 0,55 mJ/mm²) e quanto ao número de aplicações da TOC (uma, três ou cinco) em fraturas metafisárias de tíbias de ratos com osteoporose, avaliadas por ensaio mecânico de flexão após 35 dias de seguimento. Independentemente do número de sessões, evidenciou-se melhora significativa apenas na aplicação do TOC com baixa energia (0,15 mJ/mm²). No único estudo encontrado em modelo de osso sem osteoporose, *Koolen et al*¹⁵⁹ utiliza fêmeas de ratos Wistar, saudáveis e com 16 semanas de idade, para avaliar influência da TOC como terapia complementar para a osteointegração de parafusos após quatro semanas. A aplicação única de 3000 pulsos de 0,3 mJ/mm² demonstrou que houve melhora na osteointegração tanto dos parafusos corticais quanto dos esponjosos; entretanto, a melhora biomecânica no teste de “pull out” dos parafusos só foi constatada nos corticais. Em seu estudo, não foi observada interferência das ondas de choque sobre a formação de osso trabecular.

Em nosso modelo, a imagem macroscópica obtida por lupa das regiões em que os defeitos foram produzidos mostraram que a partir da segunda semana era

quase impossível identificar a região da perfuração. Também ficou evidente que a resistência mecânica ao cisalhamento do tecido ósseo neoformado na região do defeito foi significativamente maior no grupo Onda do que no grupo Controle após uma semana.

Entretanto para os demais tempos de seguimento, a força para produzir o cisalhamento foi semelhante entre os animais do grupo Controle e os do grupo Onda. Nossos achados assemelham-se ao de *Hsu et al*²¹ que, apesar de utilizar terapia por ondas de choque de alta energia (5000 pulsos e 0,32mJ/mm²) em fratura diafisária de tibia de coelho, descrevem efeito benéfico da TOC sobre a formação e a resistência mecânica do calo ósseo na fase precoce da consolidação, não observando os mesmos resultados nas fases mais tardias. Sua explicação para este dado foi que a TOC focal estimula a organização estrutural do calo no início do reparo ósseo. Esse foi o único estudo biomecânico encontrado em fase precoce da consolidação óssea²¹.

Na primeira semana após fratura, ocorre a liberação de mediadores inflamatórios como TGF- β 1, BMP, TNF- α , IL, FGF-2 e PDGF responsáveis pelo recrutamento, proliferação e diferenciação das células-tronco na linhagem osteogênica; pela produção de colágeno (importante componente da matriz extracelular) e pela angiogênese. Como resultado, forma-se tecido de granulação sobre a região da perfuração que será posteriormente substituído por osso neoformado^{5,6,66}. Nossa hipótese é que, do ponto de vista biomolecular, o aumento da resistência mecânica ao cisalhamento que foi encontrado na primeira semana de seguimento foi resultado do estímulo da TOC sobre as vias pró-osteogênicas por meio do seu efeito modulador sobre as proteínas presentes na fase aguda, conforme sugerido por outros autores^{122,123} e descrito recentemente por *Gusmão et al*^{18,96}. Em seu estudo *Gusmão et al*^{18,96}, descrevem aumento da atividade da Akt e da expressão do precursor da TGF- β 1 com tendência ao aumento da expressão de BMP-2 nos primeiros sete dias após estímulo. Esses eventos poderiam estimular a produção de matriz extracelular, o recrutamento e diferenciação das células-tronco em linhagem osteogênica e, conseqüentemente, o reparo ósseo^{18,96}, que foi identificado neste estudo pelo aumento da resistência ao cisalhamento do tecido neoformado. No entanto, esta é apenas uma hipótese. Falta entender por que a resistência mecânica deste regenerado ósseo não foi influenciada em outros tempos de seguimento.

Não está claro na literatura se a TOC atua diferentemente sobre a consolidação endocondral e a intramembranosa e se tem comportamento distinto no

osso trabecular que é menos denso, com cavitações intercomunicantes e preenchidas com medula óssea^{1,57}. Eventualmente, sua organização propicia maior número de interfaces entre tecido ósseo, a gordura e o tecido conjuntivo, com diferentes impedâncias acústicas⁵⁷. Desta forma, a propagação das ondas de choque no osso esponjoso pode ocorrer de maneira distinta do osso cortical. *Delius et al*¹⁶⁰, após avaliar a TOC de alta energia sobre osso íntegro de coelhos, descrevem espessamento cortical por aposição de osso neoformado, mas observam menor remodelamento trabecular, com presença de hematomas e de trabéculas ósseas fraturadas. *McClure et al*¹⁶¹ levantam a hipótese de que a energia proveniente das ondas de choque seja rapidamente absorvida no osso trabecular, com apenas pequena parte dela se propagando através dele. Estes achados apoiam nossa hipótese de que, talvez, a consolidação primária e a secundária respondam de maneira distintas à TOC e de que a resposta do osso esponjoso seja diferente do cortical.

Este estudo apresenta várias limitações, uma delas relacionada à restrição do uso de mais animais nos ensaios obrigando a compartilhar o grupo Controle feito anteriormente em nosso grupo. Entretanto, a partilha destes dados respeita o princípio dos “3 R”, no uso ético e consciente de animais para pesquisa¹⁶². Além disso, vale ressaltar que o principal viés decorre do cirurgião que produziu os defeitos ósseos, visto que, em todos outros passos do experimento, seguiu-se estritamente a mesma metodologia. No entanto, de certo modo, essa restrição reduziu a possibilidade de outras avaliações como a microtomografia e o uso de outros protocolos de estudo com a aplicação da TOC em outros momentos e com outros parâmetros.

Entretanto este modelo abriu a possibilidade de que outros estudos possam ser realizados para avaliar a interferência de diferentes protocolos de aplicação das ondas de choque em diferentes momentos do processo de consolidação sobre a resistência mecânica do osso neoformado. Além disso, interessante notar que pode ser que a TOC cause efeitos distintos sobre a ossificação intramembranosa e a ossificação endocondral. Dessa forma, a ação da terapia por ondas de choque sobre o processo de reparo de uma fratura metafisária e de uma fratura diafisária precisa ser melhor estudada, analisando-se a resistência mecânica do tecido ósseo reparado e correlacionando-na com achados histológicos e/ou com marcadores sorológicos da consolidação, como por exemplo fosfatase alcalina e osteocalcina.

7. CONCLUSÃO

Este trabalho avaliou a resistência mecânica ao cisalhamento do osso neoformado durante o processo de reparo por ossificação intramembranosa em defeito ósseo produzido na metáfise proximal da tíbia de ratos. Um grupo foi estimulado com TOC focal (grupo Onda) e outro foi estimulado com o aparelho desligado (grupo Controle). Os resultados indicaram que:

- A TOC focal foi responsável pelo aumento da resistência ao cisalhamento do osso reparado nos defeitos do grupo Onda na primeira semana de seguimento em relação ao grupo Controle.
- Entre os grupos Onda e Controle após duas e três semanas, a resistência ao cisalhamento não foi diferente
- No grupo Onda, houve aumento da resistência ao cisalhamento entre a 1^o e a 2^o semanas e entre a 1^o e a 3^o semanas; no entanto, entre a 2^o e a 3^o semanas, não houve diferença significativa. No grupo Controle, houve aumento significativo da resistência ao cisalhamento entre todos os grupos ao longo do tempo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Junqueira LC, Carneiro J. Tecido Ósseo. In: Histologia Básica. 10th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. p. 136–56.
2. Kennedy OD, Majeska RJ, Schaffler MB. Orthopaedic Basic Science: Foundations of Clinical Practice. 4th ed. American Academy of Orthopaedic Surgeons; 2013. p. 544.
3. AO Trauma International. [Internet]. Davos: AO Foundation, Inc [cited 2019 May 9]. Available from: https://aotrauma.aofoundation.org/?_ga=2.120227530.356976592.1589157134-775789485.1588018948
4. Rüedi TP, Buckley RE, Moran CG. Princípios AO do tratamento de fraturas - volume 1. 2nd ed. Artmed; 2009. p.636.
5. Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. *Injury*. 2011;42(6):551-5. doi:10.1016/j.injury.2011.03.031
6. Einhorn TA, Gerstenfeld LC. Fracture healing: mechanisms and interventions. *Nat Rev Rheumatol*. 2015; 11(1):45-54. doi:10.1038/nrrheum.2014.164
7. Tornetta P, Ricci WM, Ostrum RF, McQueen MM, McKee MD, Court-Brown CM, editors. Rockwood and Green's Fractures in Adults. 9th ed. Fraturas em adultos. Lippincott Williams & Wilkins (LWW); 2019.
8. Cleveland KB. Delayed union and Nonunion of Fractures. In: Canale ST, Beaty JH, editors. Campbell's Operative Orthopaedics. 12th ed. Philadelphia: Elsevier Inc.; 2013. p. 2981–3016.
9. Rupp M, Biehl C, Budak M, Thormann U, Heiss C, Alt V. Diaphyseal long bone nonunions — types, aetiology, economics, and treatment recommendations. *Int Orthop*. 2018; 42(2):247-58. doi:10.1007/s00264-017-3734-5
10. Buza J. Bone healing in 2016. *Clin Cases Miner Bone Metab*. 2016; 13(2):101-5. doi:10.11138/ccmbm/2016.13.2.101
11. Marongiu G, Dolci A, Verona M, Capone A. The biology and treatment of acute long-bones diaphyseal fractures: Overview of the current options for bone healing enhancement. *Bone Rep*. 2020; 12:100249. Epub 2020 Jan 28. doi:10.1016/j.bonr.2020.100249

12. Xu Z-H, Jiang Q, Chen D-Y, Xiong J, Shi D-Q, Yuan T, et al. Extracorporeal shock wave treatment in nonunions of long bone fractures. *Int Orthop*. 2009;33(3):789-93. doi:10.1007/s00264-008-0553-8
13. Vogel J, Hopf C, Eysel P, Rompe JD. Application of extracorporeal shock-waves in the treatment of pseudarthrosis of the lower extremity. Preliminary results. *Arch Orthop Trauma Surg*. 1997;116(8):480-3. doi:10.1007/BF00387581
14. Romeo P, Lavanga V, Pagani D, Sansone V. Extracorporeal shock wave therapy in musculoskeletal disorders: a review. *Med Princ Pract*. 2014;23(1):7-13. doi:10.1159/000355472
15. Cacchio A, Giordano L, Colafarina O, Rompe JD, Tavernese E, Ioppolo F, et al. Extracorporeal shock-wave therapy compared with surgery for hypertrophic long-bone nonunions. *J Bone Joint Surg Am*. 2009;91(11):2589-97. Erratum in: *J Bone Joint Surg Am*. 2010;92(5):124. doi:10.2106/JBJS.H.00841
16. Willems A, van der Jagt OP, Meuffels DE. Extracorporeal Shock Wave Treatment for Delayed Union and Nonunion Fractures. *J Orthop Trauma*. 2019;33(2):97-103. doi:10.1097/BOT.0000000000001361
17. Griffin XL, Parsons N, Costa ML, Metcalfe D. Ultrasound and shockwave therapy for acute fractures in adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014;2014(6):CD008579. Published 2014 Jun 23. doi:10.1002/14651858.CD008579.pub3
18. Buarque de Gusmão CV, Batista NA, Vidotto Lemes VT, Maia Neto WL, de Faria LD, Alves JM, et al. Effect of Low-Intensity Pulsed Ultrasound Stimulation, Extracorporeal Shockwaves and Radial Pressure Waves on Akt, BMP-2, ERK-2, FAK and TGF- β 1 During Bone Healing in Rat Tibial Defects. *Ultrasound Med Biol*. 2019;45(8):2140-61. doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2019.04.011
19. Hu J, Liao H, Ma Z, Chen H, Huang Z, Zhang Y, et al. Focal Adhesion Kinase Signaling Mediated the Enhancement of Osteogenesis of Human Mesenchymal Stem Cells Induced by Extracorporeal Shockwave. *Sci Rep*. 2016;6:20875. Epub 2016 Feb 11. doi:10.1038/srep20875
20. Chamberlain GA, Colborne GR. A review of the cellular and molecular effects of extracorporeal shockwave therapy. *Vet Comp Orthop Traumatol*. 2016;29(2):99-107. doi:10.3415/VCOT-15-04-0057

21. Hsu RW-W, Tai C-L, Chen CY-C, Hsu W-H, Hsueh S. Enhancing mechanical strength during early fracture healing via shockwave treatment: an animal study. *Clin Biomech (Bristol, Avon)*. 2003;18(6):S33-S39. doi:10.1016/s0268-0033(03)00082-2
22. Wang C-J, Wang F-S, Yang KD. Biological effects of extracorporeal shockwave in bone healing: a study in rabbits. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2008;128(8):879-84. doi:10.1007/s00402-008-0663-1
23. Lai J-P, Wang F-S, Hung C-M, Wang C-J, Huang C-J, Kuo Y-R. Extracorporeal shock wave accelerates consolidation in distraction osteogenesis of the rat mandible. *J Trauma*. 2010;69(5):1252-58. doi:10.1097/TA.0b013e3181cbc7ac
24. Wang CJ, Huang HY, Chen HH, Pai CH, Yang KD. Effect of shock wave therapy on acute fractures of the tibia: a study in a dog model. *Clin Orthop Relat Res*. 2001;(387):112-18. doi:10.1097/00003086-200106000-00015
25. Onger M, Bereket C, Sener I, Ozkan N, Senel E, Polat A. Is it possible to change of the duration of consolidation period in the distraction osteogenesis with the repetition of extracorporeal shock waves? *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2017;22(2):e251-e257. Epub 2017 Mar 1. doi:10.4317/medoral.21556
26. Seemann O, Rassweiler J, Chvapil M, Alken P, Drach GW. Effect of Low-Dose Shock Wave Energy on Fracture Healing: An Experimental Study. *J of Endourol*. 1992;6(3):219–23. doi:10.1089/end.1992.6.219
27. Forriol F, Solchaga L, Moreno JL, Canädell J. The effect of shockwaves on mature and healing cortical bone. *Int Orthop*. 1994;18(5):325-9. doi:10.1007/BF00180236
28. Clarke B. Normal Bone Anatomy and Physiology. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008;3(Suppl 3):S131-S139. doi:10.2215/CJN.04151206
29. Gusmão CVB de, Belangero WD. HOW DO BONE CELLS SENSE MECHANICAL LOADING? *Rev Bras Ortop*. 2015;44(4):299-305. Epub 2015 Dec 8. doi:10.1016/S2255-4971(15)30157-9
30. Rho JY, Kuhn-Spearing L, Zioupos P. Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. *Med Eng Phys*. 1998;20(2):92-102. doi:10.1016/s1350-4533(98)00007-1
31. Cowin SC. Bone mechanics Handbook. Boca Raton/FL: CRC Press; 2001. 322.
32. Gusmão CVB, Mariolani JRL, Belangero WD. Mechanotransduction and Osteogenesis. In: Prof. Yunfeng Lin editor. Osteogenesis. InTech; 2012.

doi:10.5772/34504.

Available

from:

<http://www.intechopen.com/books/osteogenesis/mechanotransduction-and-osteogenesis>

33. Wolff J. The Law of Bone Remodelling. 1st ed. Springer, Berlin, Heidelberg; 1986. p126.
34. Frost HM. Bone's mechanostat: A 2003 update. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2003;275(2):1081-101. doi:10.1002/ar.a.10119
35. Duncan RL, Turner CH. Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain. *Calcif Tissue Int.* 1995;57(5):344-58. doi:10.1007/BF00302070
36. Allori AC, Sillon AM, Warren SM. Biological basis of bone formation, remodeling, and repair-part II: extracellular matrix. *Tissue Eng Part B Rev.* 2008;14(3):275-83. doi:10.1089/ten.teb.2008.0083
37. Gusmão CVB, Alves JM, Belangero WD (2016). Acoustic Therapy as Mechanical Stimulation of Osteogenesis. In: Zorzi AR, Miranda JB editors. Advanced Techniques in Bone Regeneration. InTech, doi: 10.5772/63745. Available from: <http://www.intechopen.com/books/advanced-techniques-in-bone-regeneration/acoustic-therapy-as-mechanical-stimulation-of-osteogenesis>
38. d'Agostino MC, Craig K, Tibalt E, Respizzi S. Shock wave as biological therapeutic tool: From mechanical stimulation to recovery and healing, through mechanotransduction. *Int J Surg.* 2015;24(Pt B):147-53. doi:10.1016/j.ijisu.2015.11.030
39. You L, Cowin SC, Schaffler MB, Weinbaum S. A model for strain amplification in the actin cytoskeleton of osteocytes due to fluid drag on pericellular matrix. *J Biomech.* 2001;34(11):1375-86. doi:10.1016/s0021-9290(01)00107-5
40. Bonewald LF. Mechanosensation and transduction in osteocytes. *Bonekey Osteovision.* 2006;3(10):7-15. doi:10.1138/20060233
41. Taylor AF, Saunders MM, Shingle DL, Cimbala JM, Zhou Z, Donahue HJ. Mechanically stimulated osteocytes regulate osteoblastic activity via gap junctions. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007;292(1):C545-C552. doi:10.1152/ajpcell.00611.2005
42. Salter DM, Robb JE, Wright MO. Electrophysiological Responses of Human Bone Cells to Mechanical Stimulation: Evidence for Specific Integrin Function in Mechanotransduction. *J Bone Miner Res.* 1997;12(7):1133-41. doi:10.1359/jbmr.1997.12.7.1133

43. Zimmermann EA, Ritchie RO. Bone as a Structural Material. *Adv Healthc Mater.* 2015;4(9):1287-304. doi:10.1002/adhm.201500070
44. Hunt HB, Donnelly E. Bone quality assessment techniques: geometric, compositional, and mechanical characterization from macroscale to nanoscale. *Clin Rev Bone Miner Metab.* 2016;14(3):133-49. doi:10.1007/s12018-016-9222-4
45. Bailey S, Vashishth D. Mechanical Characterization of Bone: State of the Art in Experimental Approaches-What Types of Experiments Do People Do and How Does One Interpret the Results? *Curr Osteoporos Rep.* 2018;16(4):423-33. doi:10.1007/s11914-018-0454-8
46. Liu Y, Luo D, Wang T. Hierarchical Structures of Bone and Bioinspired Bone Tissue Engineering. *Small.* 2016;12(34):4611-32. doi:10.1002/smll.201600626
47. Currey JD. The structure and mechanics of bone. *J Mater Sci.* 2012;47:41-54. doi:10.1007/s10853-011-5914-9
48. Goodyear SR, Aspden RM. Mechanical Properties of Bone Ex Vivo. *Methods Mol Biol.* 2012;816:555-71. doi:10.1007/978-1-61779-415-5_35
49. Evans FG. The mechanical properties of bone. *Artif Limbs.* 1969;13(1):37-48.
50. Currey J. Measurement of the mechanical properties of bone: a recent history. *Clin Orthop Relat Res.* 2009;467(8):1948-54. doi:10.1007/s11999-009-0784-z
51. Ammann P, Rizzoli R. Bone strength and its determinants. *Osteoporos Int.* 2003;14 Suppl 3:S13-S18. doi:10.1007/s00198-002-1345-4
52. Cordey J. Introduction: basic concepts and definitions in mechanics. *Injury.* 2000;31 Suppl 2:S-B1-13. doi:10.1016/s0020-1383(00)80039-x
53. Donnelly E. Methods for assessing bone quality: a review. *Clin Orthop Relat Res.* 2011;469(8):2128-38. doi:10.1007/s11999-010-1702-0
54. Guo XE. Mechanical properties of cortical bone and cancellous bone tissue. In: Cowin SC, editor. *Bone Mechanics Handbook*, 2th ed. Boca Raton, FL: CRC Press; 2001. p. 10.1-10.23.
55. Augat P, Schorlemmer S. The role of cortical bone and its microstructure in bone strength. *Age Ageing.* 2006;35 Suppl 2:ii27-ii31. doi:10.1093/ageing/af1081
56. Mirzaali MJ, Schwiedrzik JJ, Thaiwichai S, Best JP, Michler J, Zysset PK, et al. Mechanical properties of cortical bone and their relationships with age, gender, composition and microindentation properties in the elderly. *Bone.* 2016;93:196-211. doi:10.1016/j.bone.2015.11.018

57. Oftadeh R, Perez-Viloria M, Villa-Camacho JC, Vaziri A, Nazarian A. Biomechanics and Mechanobiology of Trabecular Bone: A Review. *J Biomech Eng*. 2015;137(1):0108021-01080215. doi:10.1115/1.4029176
58. Torres AM, Matheny JB, Keaveny TM, Taylor D, Rimnac CM, Hernandez CJ. Material heterogeneity in cancellous bone promotes deformation recovery after mechanical failure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(11):2892-7. doi:10.1073/pnas.1520539113. Epub 2016 Feb 29.
59. Gibson LJ. The mechanical behaviour of cancellous bone. *J Biomech*. 1985;18(5):317-28. doi:10.1016/0021-9290(85)90287-8
60. Bruyère Garnier K, Dumas R, Rumelhart C, Arlot ME. Mechanical characterization in shear of human femoral cancellous bone: torsion and shear tests. *Med Eng Phys*. 1999;21(9):641-9. doi:10.1016/s1350-4533(99)00096-x
61. Kasra M, Grynypas MD. On shear properties of trabecular bone under torsional loading: effects of bone marrow and strain rate. *J Biomech*. 2007;40(13):2898-903. doi:10.1016/j.jbiomech.2007.03.008. Epub 2007 Apr 19
62. Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis P v. Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury*. 2005;36(12):1392-404. doi:10.1016/j.injury.2005.07.019. Epub 2005 Aug 15.
63. Ahmad O, Monazzah S, Bigham-Sadegh A. Bone Injury and Fracture Healing Biology. *Biomed Environ Sci*. 2015;28(1):57-71. doi:10.3967/bes2015.006
64. Jarry L, Uhthoff HK. Differences in Healing of Metaphyseal and Diaphyseal Fractures. *Can J Surg*. 1971;14(2):127-35.
65. Uhthoff HK, Rahn BA. Healing Patterns of Metaphyseal Fractures. *Clin Orthop Relat Res*. 1981;(160):295-303.
66. Baker CE, Moore-Lotridge SN, Hysong AA, Posey SL, Robinette JP, Blum DM, et al. Bone Fracture Acute Phase Response—A Unifying Theory of Fracture Repair: Clinical and Scientific Implications. *Clin Rev Bone Miner Metab*. 2018;16(4):142-58. doi:10.1007/s12018-018-9256-x
67. Phillips AM. Overview of the fracture healing cascade. *Injury*. 2005;36 Suppl 3:S5-S7. doi:10.1016/j.injury.2005.07.027
68. Little N, Rogers B, Flannery M. Bone formation, remodelling and healing. *Surgery(Oxford)*. 2011;29(4):141-5. doi:10.1016/j.mpsur.2011.01.002

69. Florencio-Silva R, Sasso GRDS, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int*. 2015;2015:421746. doi:10.1155/2015/421746. Epub 2015 Jul 13.
70. Blenman PR, Carter DR, Beaupré GS. Role of mechanical loading in the progressive ossification of a fracture callus. *J Orthop Res*. 1989;7(3):398-407. doi:10.1002/jor.1100070312
71. Garcia A. Ensaio dos materiais. 1st ed. Rio de Janeiro: LTC; 2000.
72. Turner C, Burr D. Experimental Techniques for Bone Mechanics. In: Cowin SC, editors. *Bone Mechanics Handbook, Second Edition*. CRC Press; 2001. p. 7-1-7-35.
73. Boerckel JD, Dupont KM, Kolambkar YM, Lin ASP, Guldberg RE. In vivo model for evaluating the effects of mechanical stimulation on tissue-engineered bone repair. *Biomech Eng*. 2009;131(8):084502. doi:10.1115/1.3148472
74. Prodinge PM, Foehr P, Bürklein D, Bissinger O, Pilge H, Kreutzer K, et al. Whole bone testing in small animals: systematic characterization of the mechanical properties of different rodent bones available for rat fracture models. *Eur J Med Res*. 2018;23(1):8. doi:10.1186/s40001-018-0307-z
75. Ghiasi MS, Chen J, Vaziri A, Rodriguez EK, Nazarian A. Bone fracture healing in mechanobiological modeling: A review of principles and methods. *Bone Rep*. 2017;6:87-100. doi:10.1016/j.bonr.2017.03.002
76. Cole JH, van der Meulen MCH. Whole Bone Mechanics and Bone Quality. *Clin Orthop Relat Res*. 2011;469(8):2139-49. doi:10.1007/s11999-011-1784-3
77. Carter DR, Spengler DM. Mechanical properties and composition of cortical bone. *Clin Orthop Relat Res*. 1978;(135):192-217.
78. Vidotto Lemes VT. Avaliação quantitativa de regeneração óssea experimental por meio de ensaios de indentação [tese]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas; 2018. Available from: <http://repositorio.unicamp.br/jspui/handle/REPOSIP/332321>
79. Thiel M, Nieswand M, Dörffel M. Review: The use of shock waves in medicine—a tool of the modern OR: An overview of basic physical principles, history and research. *Minim Invasive Ther Allied Technol*. 2000;9(3-4):247-53. doi:10.1080/13645700009169655
80. Shrivastava SK, Kailash. Shock wave treatment in medicine. *J Biosci*. 2005;30(2):269-75. doi:10.1007/BF02703708

81. Haupt G, Haupt A, Ekkernkamp A, Gerety B, Chvapil M. Influence of shock waves on fracture healing. *Urology*. 1992;39(6):529-32. doi:10.1016/0090-4295(92)90009-l
82. Haupt G. Use of Extracorporeal Shock Waves in the Treatment of Pseudarthrosis, Tendinopathy and Other Orthopedic Diseases. *J Urol*. 1997;158(1):4-11. doi:10.1097/00005392-199707000-00003
83. Valchanou VD, Michailov P. High energy shock waves in the treatment of delayed and nonunion of fractures. *Int Orthop*. 1991;15(3):181-4. doi:10.1007/BF00192289
84. Ogden JA, Tóth-Kischkat A, Schultheiss R. Principles of shock wave therapy. *Clin Orthop Relat Res*. 2001;(387):8-17. doi:10.1097/00003086-200106000-00003
85. Rassweiler JJ, Knoll T, Köhrmann K-U, McAteer JA, Lingeman JE, Cleveland RO, et al. Shock wave technology and application: an update. *Eur Urol*. 2011;59(5):784-96. doi:10.1016/j.eururo.2011.02.033
86. Moya D, Ramón S, Schaden W, Wang C-J, Guiloff L, Cheng J-H. The Role of Extracorporeal Shockwave Treatment in Musculoskeletal Disorders. *J Bone Joint Surg Am*. 2018;100(3):251-63. doi:10.2106/JBJS.17.00661
87. Cheng J-H, Wang C-J. Biological mechanism of shockwave in bone. *Int J Surg*. 2015;24(Pt B):143-6. doi:10.1016/j.ijisu.2015.06.059
88. Chung B, Wiley JP. Extracorporeal shockwave therapy: a review. *Sports Med*. 2002;32(13):851-65. doi:10.2165/00007256-200232130-00004
89. The International Society for Medical Shockwave Treatment. About ESWT – indications [Internet]. 2019. Available from: <https://www.shockwavetherapy.org/about-eswt/indications/>
90. Sociedade Médica Brasileira de Tratamento por Ondas de Choque. Indicações das Ondas de choque [Internet]. 2019. Available from: <https://www.sbtoc.org.br/indicacoes>
91. Wang C-J. An overview of shock wave therapy in musculoskeletal disorders. *Chang Gung Med J*. 2003;26(4):220-32.
92. Cleveland RO, Chitnis P v., McClure SR. Acoustic field of a ballistic shock wave therapy device. *Ultrasound Med Biol*. 2007;33(8):1327-35. doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2007.02.014

93. Soft WaveR: Tissue Regeneration Technologies. Orthopedics Shockwave. [Internet].2009 [cited 2019 Dec 12]. Available from: https://www.trtlc.com/uploads/5/9/7/2/59724091/orthogold_280_brochure.pdf
94. Elvation Medical GmbH. Piezo Shockwave Devices. [Internet]. 2018 [cited 2019 Dec 12]. Available from: https://elvation.de/wp-content/uploads/2018/02/PiezoWave2_0118_en.pdf
95. Gusmão CVB. Estudo comparativo do efeito do ultrassom pulsado de baixa intensidade, ondas de choque eletro-hidráulicas e ondas de pressão radial sobre perfuração óssea produzida em tíbias de ratos medido pela quantificação da expressão e atividade de AKT, BMP-2, ERK-2, FAK e TGF- β 1 [tese]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas; 2018.
96. Wilbert DM. A comparative review of extracorporeal shock wave generation. *BJU Int.* 2002;90(5):507-11. doi:10.1046/j.1464-410x.2002.02961.x
97. Nolting W. Theoretical Physics. 1st ed. Springer International Publishing; 2017. Chapter 1, Basic Physical Principles; p.1–31.
98. Coleman AJ, Choi MJ, Saunders JE. Detection of acoustic emission from cavitation in tissue during clinical extracorporeal lithotripsy. *Ultrasound Med Biol.* 1996;22(8):1079-87. doi:10.1016/s0301-5629(96)00118-4
99. Zhong P, Cioanta I, Cocks FH, Preminger GM. Inertial cavitation and associated acoustic emission produced during electrohydraulic shock wave lithotripsy. *J Acoust Soc Am.* 1997;101(5 Pt 1):2940-50. doi:10.1121/1.418522
100. Chitnis PV, Cleveland RO. Acoustic and Cavitation Fields of Shock Wave Therapy Devices. AIP Conference Proceedings. 2017;829:440-4. doi:10.1063/1.2205513
101. Ohl SW, Klaseboer E, Khoo BC. The dynamics of a non-equilibrium bubble near biomaterials. *Phys Med Biol.* 2009;54(20):6313-36. doi:10.1088/0031-9155/54/20/019
102. Xu J, Chen H, Li X, Huang Z, Xu H, Yang H, et al. Optimal intensity shock wave promotes the adhesion and migration of rat osteoblasts via integrin β 1-mediated expression of phosphorylated focal adhesion kinase. *J Biol Chem.* 2012;287(31):26200-12. doi:10.1074/jbc.M112.349811
103. Tam KF, Cheung WH, Lee KM, Qin L, Leung KS. Osteogenic Effects of Low-Intensity Pulsed Ultrasound, Extracorporeal Shockwaves and Their Combination – An

In Vitro Comparative Study on Human Periosteal Cells. *Ultrasound Med Biol.* 2008;34(12):1957–65. doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2008.06.005

104. Hofmann A, Ritz U, Hessmann MH, Alini M, Rommens PM, Rompe J-D. Extracorporeal shock wave-mediated changes in proliferation, differentiation, and gene expression of human osteoblasts. *J Trauma.* 2008;65(6):1402-10. doi:10.1097/TA.0b013e318173e7c2

105. Tamma R, Dell'Endice S, Notarnicola A, Moretti L, Patella S, Patella V, et al. Extracorporeal shock waves stimulate osteoblast activities. *Ultrasound Med Biol.* 2009;35(12):2093-100. doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2009.05.022

106. Wang F-S, Wang C-J, Huang H-J, Chung H, Chen R-F, Yang KD. Physical Shock Wave Mediates Membrane Hyperpolarization and Ras Activation for Osteogenesis in Human Bone Marrow Stromal Cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;287(3):648-55. doi:10.1006/bbrc.2001.5654

107. Hausdorf J, Sievers B, Schmitt-Sody M, Jansson V, Maier M, Mayer-Wagner S. Stimulation of bone growth factor synthesis in human osteoblasts and fibroblasts after extracorporeal shock wave application. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2011;131(3):303-9. doi:10.1007/s00402-010-1166-4

108. Wang C-J, Yang KD, Ko J-Y, Huang C-C, Huang H-Y, Wang F-S. The effects of shockwave on bone healing and systemic concentrations of nitric oxide (NO), TGF- β 1, VEGF and BMP-2 in long bone non-unions. *Nitric Oxide.* 2009;20(4):298-303. doi:10.1016/j.niox.2009.02.006

109. Stewart S, Darwood A, Masouros S, Higgins C, Ramasamy A. Mechanotransduction in osteogenesis. *Bone Joint Res.* 2020;9(1):1-14. doi:10.1302/2046-3758.91.BJR-2019-0043.R2

110. Dietz-Laursonn K, Beckmann R, Ginter S, Radermacher K, de la Fuente M. In-vitro cell treatment with focused shockwaves-influence of the experimental setup on the sound field and biological reaction. *J Ther Ultrasound.* 2016;4:10. doi:10.1186/s40349-016-0053-z

111. Kearney CJ, Lee JY, Padera RF, Hsu H-P, Spector M. Extracorporeal shock wave-induced proliferation of periosteal cells. *J Orthop Res.* 2011;29(10):1536-43. doi:10.1002/jor.21346

112. Zelle BA, Gollwitzer H, Zlowodzki M, Bühren V. Extracorporeal Shock Wave Therapy: Current Evidence. *J Orthop Trauma.* 2010;24 Suppl 1:S66-S70. doi:10.1097/BOT.0b013e3181cad510

113. Schaden W, Mittermayr R, Haffner N, Smolen D, Gerdesmeyer L, Wang C-J. Extracorporeal shockwave therapy (ESWT)--First choice treatment of fracture non-unions? *Int J Surg.* 2015;24(Pt B):179-83. Epub 2015 Oct 9. doi:10.1016/j.ijisu.2015.10.003
114. Haffner N, Smolen D, Dahm F, Schaden W, Mittermayr R. Significance of Extracorporeal Shockwave Therapy in Fracture Treatment. In: Wang CJ, Schaden W, Ko JY, editors. *Shockwave Medicine. Transl Res Biomed.* Basel, Karger, 2018, vol.6, pp. 42–63
115. Petrisor B, Lisson S, Sprague S. Extracorporeal shockwave therapy: A systematic review of its use in fracture management. *Indian J Orthop.* 2009;43(2):161-7. doi:10.4103/0019-5413.50851
116. Notarnicola A, Moretti L, Tafuri S, Gigliotti S, Russo S, Musci L, et al. Extracorporeal shockwaves versus surgery in the treatment of pseudoarthrosis of the carpal scaphoid. *Ultrasound Med Biol.* 2010;36(8):1306-13. doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2010.05.004
117. Alvarez RG, Cincere B, Channappa C, Langerman R, Schulte R, Jaakkola J, et al. Extracorporeal shock wave treatment of non- or delayed union of proximal metatarsal fractures. *Foot Ankle Int.* 2011;32(8):746-54. doi:10.3113/FAI.2011.0746
118. Furia JP, Juliano PJ, Wade AM, Schaden W, Mittermayr R. Shock wave therapy compared with intramedullary screw fixation for nonunion of proximal fifth metatarsal metaphyseal-diaphyseal fractures. *J Bone Joint Surg Am.* 2010;92(4):846-54. doi:10.2106/JBJS.I.00653
119. Kuo S-J, Su I-C, Wang C-J, Ko J-Y. Extracorporeal shockwave therapy (ESWT) in the treatment of atrophic non-unions of femoral shaft fractures. *Int J Surg.* 2015;24(Pt B):131-4. doi:10.1016/j.ijisu.2015.06.075
120. Xu Z-H, Jiang Q, Chen D-Y, Xiong J, Shi D-Q, Yuan T, et al. Extracorporeal shock wave treatment in nonunions of long bone fractures. *Int Orthop.* 2009;33(3):789-93. doi:10.1007/s00264-008-0553-8
121. Narasaki K, Shimizu H, Beppu M, Aoki H, Takagi M, Takashi M. Effect of extracorporeal shock waves on callus formation during bone lengthening. *J Orthop Sci.* 2003;8(4):474-81. doi:10.1007/s00776-003-0664-4
122. Wang F-S, Yang KD, Kuo Y-R, Wang C-J, Sheen-Chen S-M, Huang H-C, et al. Temporal and spatial expression of bone morphogenetic proteins in extracorporeal

shock wave-promoted healing of segmental defect. *Bone*. 2003;32(4):387-96.

doi:10.1016/s8756-3282(03)00029-2

123. Chen Y-J, Wurtz T, Wang C-J, Kuo Y-R, Yang KD, Huang H-C, et al. Recruitment of mesenchymal stem cells and expression of TGF- β 1 and VEGF in the early stage of shock wave-promoted bone regeneration of segmental defect in rats. *J Orthop Res*. 2004;22(3):526-34. doi:10.1016/j.orthres.2003.10.005

124. Graff J, Pastor J, Senge T, Richter K-D, Funke W. The Effect of High Energy Shock Waves on Bony Tissue – An Experimental Study. *J Urology*. 1987;137(6):278A. doi:10.1016/S0022-5347(17)75848-X

125. Johannes EJ, Kaulesar DMKS, Matura E. High-Energy Shock Waves for the Treatment of Nonunions: An Experiment on Dogs. *J Surg Res*. 1994;57(2):246-52. doi:10.1006/jsre.1994.1139

126. Augat P, Claes L, Suger G. In vivo effect of shock-waves on the healing of fractured bone. *Clin Biomech (Bristol, Avon)*. 1995;10(7):374-8. doi:10.1016/0268-0033(95)00009-a

127. Belangero WD, Mariolani JRL et al. Estudo biomecânico e biomolecular de métodos terapêuticos de regeneração óssea. Projeto de Pesquisa FAPESP (nº2014/26729-0. Campinas, 2017.

128. Andreollo NA, Santos EF, Araújo MR, Lopes LR. Idade dos ratos versus idade humana: qual é a relação? ABCD, arq. bras. cir. dig.[Internet].2012 Mar;25(1):49-51. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-67202012000100011&lng=pt doi:10.1590/S0102-67202012000100011.

129. Scholz JA, Ramos CC, VanLith CJ, de la Vega RE, Boschen SL, Evans CH, et al. Use of the Rat as a Model in Regenerative Medicine. In: Suckow MA, Wilson RP, Hankenson C, Foley PL, editors. *The Laboratory Rat*. 3th ed. Academic Press; 2019. p.1077-1015.

130. Weber B, Lackner I, Haffner-Luntzer M, Palmer A, Pressmar J, Scharffetter-Kochanek K, et al. Modeling trauma in rats: Similarities to humans and potential pitfalls to consider. *J Transl Med*. 2019;17(1):1-19. doi:10.1186/s12967-019-2052-7

131. Balmayor ER, Geiger JP, Aneja MK, Berezhanskyy T, Utzinger M, Mykhaylyk O, et al. Chemically modified RNA induces osteogenesis of stem cells and human tissue explants as well as accelerates bone healing in rats. *Biomaterials*. 2016;87:131-46. doi:10.1016/j.biomaterials.2016.02.018

132. Bagi CM, Beeryman E, Moalli MR. Comparative bone anatomy of commonly used laboratory animals: implications for drug discovery. *Comp Med*. 2011;61(1):76-85.
133. Mills LA, Simpson AHRW. In vivo models of bone repair. *J Bone Joint Surg Br*. 2012;94(7):865-74. doi:10.1302/0301-620X.94B7.27370
134. Garcia P, Histing T, Holstein J, Klein W, Laschke M, Matthys R, et al. Rodent animal models of delayed bone healing and non-union formation: a comprehensive review. *Eur Cell Mater*. 2013;26:1-14. doi:10.22203/ecm.v026a01
135. Vidotto VT, Batista NA, Mariolani JRL, Belangero WD. Quantitative Evaluation of Experimental Bone Regeneration Using Indentation Tests. *Acta Ortop Bras*. 2017;25(2):71-6. doi:10.1590/1413-785220172502164015
136. Bartnikowski N, Claes LE, Koval L, Glatt V, Bindl R, Steck R, et al. Modulation of fixation stiffness from flexible to stiff in a rat model of bone healing. *Acta Orthop*. 2017;88(2):217-22. doi:10.1080/17453674.2016.1256940
137. Bak B, Jensen KS. Standardization of tibial fractures in the rat. *Bone*. 1992;13(4):289-95. doi:10.1016/8756-3282(92)90073-6
138. Rompe JD, Kirkpatrick CJ, Küllmer K, Schwitalle M, Krischek O. Dose-related effects of shock waves on rabbit tendo Achillis: A sonographic and histological study. *J Bone Joint Surg Br*. 1998;80(3):546-52. doi:10.1302/0301-620x.80b3.8434
139. Wang C-J, Liu H-C, Fu T-H. The effects of extracorporeal shockwave on acute high-energy long bone fractures of the lower extremity. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2007;127(2):137-42. doi:10.1007/s00402-006-0236-0
140. Reilly JM, Bluman E, Tenforde AS. Effect of Shockwave Treatment for Management of Upper and Lower Extremity Musculoskeletal Conditions: A Narrative Review. *PM R*. 2018;10(12):1385-403. doi:10.1016/j.pmrj.2018.05.007
141. Wang C-J, Huang C-C, Yip H-K, Yang Y-J. Dosage effects of extracorporeal shockwave therapy in early hip necrosis. *Int J Surg*. 2016;35:179-86. doi:10.1016/j.ijssu.2016.09.013
142. Chow DHK, Suen PK, Fu LH, Cheung WH, Leung KS, Wong MWN, et al. Extracorporeal shockwave therapy for treatment of delayed tendon-bone insertion healing in a rabbit model: a dose-response study. *Am J Sports Med*. 2012;40(12):2862-71. doi:10.1177/0363546512461596
143. Zhang Q, Liu L, Sun W, Gao F, Cheng L, Li Z. Extracorporeal shockwave therapy in osteonecrosis of femoral head: A systematic review of now available clinical

- evidences. *Medicine (Baltimore)*. 2017;96(4):e5897. doi:10.1097/MD.0000000000005897
144. Wang C-J, Yang KD, Wang F-S, Hsu C-C, Chen H-H. Shock wave treatment shows dose-dependent enhancement of bone mass and bone strength after fracture of the femur. *Bone*. 2004;34(1):225-30. doi:10.1016/j.bone.2003.08.005
145. Tischer T, Milz S, Weiler C, Pautke C, Hausdorf J, Schmitz C, et al. Dose-Dependent New Bone Formation by Extracorporeal Shock Wave Application on the Intact Femur of Rabbits. *Eur Surg Res*. 2008;41(1):44-53. doi:10.1159/000128279
146. Martini L, Giavaresi G, Fini M, Borsari V, Torricelli P, Giardino R. Early Effects of Extracorporeal Shock Wave Treatment on Osteoblast-like Cells: A Comparative Study Between Electromagnetic and Electrohydraulic Devices. *J Trauma*. 2006;61(5):1198-206. doi:10.1097/01.ta.0000203575.96896.34
147. Tam K-F, Cheung W-H, Lee K-M, Qin L, Leung K-S. Delayed Stimulatory Effect of Low-intensity Shockwaves on Human Periosteal Cells. *Clin Orthop Relat Res*. 2005;438:260-5. doi:10.1097/00003086-200509000-00042
148. Wang F-S, Wang C-J, Sheen-Chen S-M, Kuo Y-R, Chen R-F, Yang KD. Superoxide Mediates Shock Wave Induction of ERK-dependent Osteogenic Transcription Factor (CBFA1) and Mesenchymal Cell Differentiation toward Osteoprogenitors. *J Biol Chem*. 2002;277(13):10931-7. doi:10.1074/jbc.M104587200
149. Wang FS, Yang KD, Chen RF, Wang CJ, Sheen-Chen SM. Extracorporeal shock wave promotes growth and differentiation of bone-marrow stromal cells towards osteoprogenitors associated with induction of TGF- β 1. *J Bone Joint Surg Br*. 2002;84(3):457-61. doi:10.1302/0301-620x.84b3.11609
150. Faria LD. Terapia por ondas de choque eletrohidráulicas aumenta a atividade da ERK-1/2 e Akt em tíbias íntegras de ratos por 21 dias após estímulo inicial [tese]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas; 2015.
151. Mackert GA, Schulte M, Hirche C, Kotsougiani D, Vogelpohl J, Hoener B, et al. Low-energy extracorporeal shockwave therapy (ESWT) improves metaphyseal fracture healing in an osteoporotic rat model. *PLoS One*. 2017;12(12):e0189356. Published 2017 Dec 12. doi:10.1371/journal.pone.0189356
152. Gadowski BC, McGilvray KC, Easley JT, Palmer RH, Jiao J, Li X, et al. An investigation of shock wave therapy and low-intensity pulsed ultrasound on fracture

healing under reduced loading conditions in an ovine model. *J Orthop Res.* 2018;36(3):921-9. doi:10.1002/jor.23666

153. Liebschner MAK, Chun K, Kim N, Ehni B. In vitro biomechanical evaluation of single impulse and repetitive mechanical shockwave devices utilized for spinal manipulative therapy. *Ann Biomed Eng.* 2014;42(12):2524-36. doi:10.1007/s10439-014-1115-4

154. Lee T-C, Yang Y-L, Chang N-K, Lin T-S, Lin W-C, Liu Y-S, et al. Biomechanical testing of spinal fusion segments enhanced by extracorporeal shock wave treatment in rabbits. *Chang Gung Med J.* 2009;32(3):276-82.

155. Moretti B, Notarnicola A, Moretti L, Patella S, Tatò I, Patella V. Bone healing induced by ESWT. *Clin Cases Miner Bone Metab.* 2009;6(2):155-8.

156. Lee T-C, Huang H-Y, Yang Y-L, Hung K-S, Cheng C-H, Lin W-C, et al. Application of extracorporeal shock wave treatment to enhance spinal fusion: a rabbit experiment. *Surg Neurol.* 2008;70(2):129-34. doi:10.1016/j.surneu.2007.05.050

157. Lai J-P, Wang F-S, Hung C-M, Wang C-J, Huang C-J, Kuo Y-R. Extracorporeal Shock Wave Accelerates Consolidation in Distraction Osteogenesis of the Rat Mandible.

J Trauma. 2010;69(5):1252-8. doi:10.1097/TA.0b013e3181cbc7ac

158. Aleem IS, Bhandari M. Cochrane in CORR®: Ultrasound and Shockwave Therapy for Acute Fractures in Adults (Review). *Clin Orthop Relat Res.* 2016;474(7):1553-9. doi:10.1007/s11999-016-4816-1

159. Koolen MKE, Kruyt MC, Zadpoor AA, Öner FC, Weinans H, van der Jagt OP. Optimization of screw fixation in rat bone with extracorporeal shock waves. *J Orthop Res.* 2018;36(1):76-84. Epub 2017 Jun 13. doi:10.1002/jor.23615

160. Delius M, Draenert K, al Diek Y, Draenert Y. Biological effects of shock waves: In vivo effect of high energy pulses on rabbit bone. *Ultrasound Med Biol.* 1995;21(9):1219-25. doi:10.1016/0301-5629(95)00030-5

161. McClure SR, van sickle D, White MR. Effects of Extracorporeal Shock Wave Therapy on Bone. *Vet Surg.* 2004;33(1):40-8. doi:10.1111/j.1532-950x.2004.04013.x

162. Russell WMS, Burch RL. The Principles of Humane Experimental Technique. <https://caat.ihsp.edu/principles/the-principles-of-humane-experimental-technique>

ANEXO 1 – Comitê de Ética em Pesquisa no uso de animais – CEUA



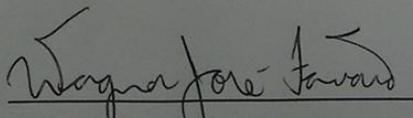
CERTIFICADO

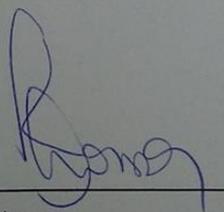
Certificamos que a proposta intitulada **Estudo biomecânico e biomolecular de métodos terapêuticos de regeneração óssea**, registrada com o nº **4703-1/2017**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. William Dias Belangero**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, 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)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em **06 de dezembro de 2017**.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	02/01/2018-02/01/2019
Vigência da autorização para manipulação animal:	02/01/2018-02/01/2019
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib: WH (Wistar)
No. de animais:	100
Idade/Peso:	12 semanas / 350g
Sexo:	machos
Origem:	CEMIB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA**, **SISBIO** ou **CIBio** e é **restrita** a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 06 de dezembro de 2017.


 Prof. Dr. Wagner José Fávaro
 Presidente


 Fátima Alonso
 Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

ANEXO 2 – Submissão de artigo científico

Journal of Orthopaedic Research



Journal of Orthopaedic Research

Biomechanical evaluation of tibial bone healing in rats: analysis of the role of shockwave therapy

Journal:	<i>Journal of Orthopaedic Research</i>
Manuscript ID	JOR-20-0827
Wiley - Manuscript type:	Research Article (Non-Member)
Date Submitted by the Author:	28-Oct-2020
Complete List of Authors:	da Costa Gagliardi, Isabella; Universidade Estadual de Campinas Faculdade de Ciências Médicas, Department of Orthopedics and Traumatology Lenzi Mariolani, José Ricardo; Universidade Estadual de Campinas Faculdade de Ciências Médicas, Department of Orthopedics and Traumatology Aizira Batista, Nilza; Universidade Estadual de Campinas Faculdade de Ciências Médicas, Department of Orthopedics and Traumatology Belangero, William; Universidade Estadual de Campinas, Depto de Ortopedia e Traumatologia
Areas of Expertise:	Orthopedics and Traumatology, Experimental Research
Keywords:	Biomechanics, Bone, Fracture, Therapeutics, Trauma

SCHOLARONE™
Manuscripts