

PAULO ROBERTO DIAS DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DAS ONDAS DE
CHOQUE NOS GLICOSAMINOGLICANOS
SULFATADOS E ÁCIDO HIALURÔNICO NA
REGENERAÇÃO ÓSSEA EM FÊMURES DE RATOS
SUBMETIDOS À PERFURAÇÃO CIRÚRGICA.**

**Tese apresentada à Universidade Federal de São
Paulo para obtenção do Título de Doutor em
Ciências.**

ORIENTADOR : Prof. Dr. FLÁVIO FALOPPA

CO-ORIENTADORA: Profa. VALQUIRIA PEREIRA DE MEDEIROS

São Paulo

2011

Santos, Paulo Roberto Dias dos

Avaliação dos efeitos das ondas de choque nos glicosaminoglicanos sulfatados e ácido hialurônico na regeneração óssea em fêmures de ratos submetidos à perfuração cirúrgica / Paulo Roberto Dias dos Santos. - São Paulo, 2011.

xiv; 61f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo. Programa de Pós-graduação em Cirurgia Plástica.

Titulo em Inglês: Assessment of the effects of shock waves in the sulfated glycosaminoglycans and hyaluronic acid in bone repair rats femurs submitted to surgical drilling.

1. Osteogênese. 2. Litotripsia. 3. Condroitim sulfato . 4. Ácido hialurônico.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIRURGIA PLÁSTICA**

**COORDENADOR:
PROF. DR. MIGUEL SABINO NETO**

Dedicatória

*À minha família,
em especial minha esposa Ana pelo incentivo e paciência
e aos meus filhos Bruno e Marcelo.*

Agradecimentos

Ao meu orientador Prof. Dr. Flávio Faloppa, Professor Titular do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo e Presidente do Conselho Gestor do Hospital São Paulo – Hospital Universitário da UNIFESP, pela confiança em mim depositada e grande incentivador.

A Profa. Dra. Helena Bonciani Nader, Professora Titular da Disciplina de Biologia Molecular do Departamento de Bioquímica da UNIFESP, Presidente da SBPC – Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, que propiciou a realização desse trabalho.

À minha co-orientadora Prof^a Valquíria Pereira de Medeiros, Doutora em Ciências pelo Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular da UNIFESP, pelo constante auxílio e aprendizado.

Ao Dr. Luiz Antonio de Souza Merli, Doutor em Ciências pelo Programa de Pós-graduação em Ortopedia e Traumatologia da UNIFESP, pela colaboração na elaboração da metodologia e atenção dispensados.

Ao Dr. Carlos Eduardo da Silveira Franciozi, Doutor em Ciências pelo Programa de Pós-graduação em Cirurgia Plástica da UNIFESP, pela colaboração e presteza para a elaboração deste trabalho.

À Profa. Dra. Maria Regina Regis Silva, Chefe da Disciplina de Patologia Investigativa, e ao **Sr. Antonio Carlos de Sousa**, Técnico em Laboratório, pela disponibilidade e atenção na descalcificação do tecido ósseo.

Ao Dr. João Paulo Freire Martins de Moura, Médico Especialista em Ortopedia e Traumatologia, pelo auxílio na coleta de material e aplicação das ondas de choque, de meu trabalho.

À bióloga Patrícia dos Reis Sousa Gonçalves, pela colaboração no Laboratório de Biologia Molecular.

À secretária da Pós-graduação *Stricto Sensu* Srta. Roseli Paschoa, pelo apoio e orientação recebidos.

Ao Sr. Frans Vermarien, pelo incentivo e idealismo.

Para **CAPES**, pela bolsa de Estudos, modalidade Demanda Social, recebida durante a realização deste trabalho.

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma para que este trabalho pudesse ser concluído, meu reconhecimento e consideração.

Sumário

	Página
<i>Dedicatória</i>	iv
<i>Agradecimentos</i>	v
<i>Lista de Figuras</i>	viii
<i>Lista de Quadros</i>	ix
<i>Lista de Gráficos</i>	x
<i>Lista de Abreviaturas e Símbolos</i>	xi
<i>Resumo</i>	xiv
1. Introdução	1
1.1 Objetivo	8
2. Literatura	9
2.1 Tecido ósseo.....	10
2.2 Ondas de Choque	12
2.3 Glicosaminoglicanos Sulfatados e Ácido Hialurônico ...	16
2.3.1 Glicosaminoglicanos (GAGs) sulfatados	16
2.3.2 Ácido Hialurônico	18
3. Métodos	20
3.1 Animais	21
3.2 Procedimento cirúrgico	22
3.3 Equipamento de ondas de choque	25
3.4 Eutanásia	26
3.5 Descalcificação	27
3.6 Extração dos glicosaminoglicanos sulfatados de fêmur .	28
3.7 Distinção e Quantificação dos glicosaminoglicanos sulfatados	28
3.8 Quantificação do ácido hialurônico	30
3.9 Método Estatístico	31
4. Resultados	33
4.1 Distinção e quantificação dos glicosaminoglicanos sulfatados	34
4.1.1 Eletroforese em gel de agarose.....	34
4.1.2 Grupo IB(contralateral) e Grupo II (controle)	36
4.2. Quantificação do ácido hialurônico.....	37
5. Discussão	38
6. Conclusão	45
7. Referências	47
Normas adotadas	59
Abstract	60
Anexo 1	61
Fontes consultadas	

Lista de Figuras

Figura 1A: Esquematização da estrutura química dos GAGs (Ácido Hialurônico e Dermatan Sulfato)	3
Figura 1B: Esquematização da estrutura química dos GAGs (Condroitim Sulfato e Heparan Sulfato e Heparina)	4
Figura 2. Estrutura química do ácido hialurônico	4
Figura 3. Gerador eletro-hidráulico - Ossatron® – HMT	5
Figura 4. Esquematização de uma onda de choque relacionando pressão e tempo	6
Figura 5. Representação esquemática da mudança de composição e massa do calo de fratura	11
Figura 6. Foto do rato após anestesia e tricotomia	23
Figura 7. Foto da divulsão das partes moles e exposição óssea	23
Figura 8. Foto da perfuração óssea de 2mm de espessura em apenas uma cortical	24
Figura 8: Foto após sutura com fio <i>mononylon 4.0</i>	
Figura 9. Foto da aplicação de ondas de choque	25
Figura 10. Foto do aparelho de ondas de choque – (EVOTRON®-Vet da SwiTech)	25
Figura 11. Foto do fêmur dissecado por cirurgia	26
Figura 12. Foto da demarcação do fragmento ósseo contendo lesão	27
Figura 13. Lâmina de análise da eletroforese em gel de agarose de parte dos grupos IA e II – eutanásia 28 dias	34

Lista de Quadro

Quadro I. Tipos de GAGs, presença de sulfatação, ligação de proteínas e sua distribuição nos tecidos	3
---	---

Lista de Gráficos

Gráfico 1. Valores médios de GAGs e respectivos erros padrões segundo grupos e dia de sacrifícios	35
Gráfico 2. Valores médios de GAGs entre os Grupos IB (contralateral) e Grupo II (controle) que não foram submetidos às ondas de choque	36
Gráfico 3. Valores médios de ácido hialurônico e respectivos erros padrões segundo grupos e dia de sacrifícios	37

Lista de Abreviaturas e Símbolos

AH	Ácido Hialurônico
BMD	<i>Bone Mineral Density</i>
BMP	<i>Bone Morphogenic Protein</i>
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
cc	Centímetro Cúbico
CBFA 1	<i>Specific Osteogenic Transcription Factor</i>
CEP	Comissão de Ética e Pesquisa
CO ₂	Dióxido de Carbono
CS	Condroitin Sulfato
DS	Dermatan Sulfato
EDTA	<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>
ELISA –like	<i>Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay-like</i>
eNOS	<i>Endothelial Nitric Oxid Synthase</i>
ESWT	<i>Extracorporeal Shockwave Therapy</i>
EUA	Estados Unidos da América
et al	<i>et alli</i>
Evotron®-Vet	<i>Evotron®-Veterinary</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
FINEP	Financiadora de Estudos e Projetos
GAGs	Glicosaminoglicanos

GDNF	<i>Glial Cell Line-derived Neurotrophic Factor</i>
GLcA	<i>Glucoronic Acid</i>
GLcNAc	<i>N-acetylglucosamine</i>
g	Gramma
HA	<i>Hyaluronic Acid</i>
HEP	Heparina
HGF	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>
HS	Heparan Sulfato
Hz	<i>Hertz</i>
INFAR	Instituto Nacional de Farmacologia
ISI	<i>International Scientific Information</i>
Kv	Quilovolt
LMHFV	<i>Low-magnitude High-frequency Vibration</i>
M	Mol
mg	Miligrama
MHz	Megahertz
mJ	Milijoule
mJ/mm ²	Milijoule por milímetro quadrado
MPa	Megapascal
mRNA	<i>Messenger-ribonucleic Acid</i>
N	<i>Newton</i>
NaCl	Cloreto de Sódio
n ^o	Número

NO	<i>Nitric Oxide</i>
ns	Nanossegundo
OMS	Organização Mundial de Saúde
Or	Origem
P	Pressão
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCNA	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
PDA	1,3-Diaminopropano Acetato
PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i>
PEMF	<i>Pulsed Electromagnetic Field</i>
pH	Potencial Hidrogeniônico
q.s.p.	Quantidade Suficiente Para
R1	Rato um
R2	Rato dois
R3	Rato três
rpm	Rotações Por Minuto
TGF- β 1	<i>Transforming Growth Factor Beta um</i>
TOC	Terapia por Ondas de Choque
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

Resumo

Introdução: As ondas de choque têm sido utilizadas para estimular a regeneração óssea em pacientes com retardo de consolidação nas fraturas. Dentre as estruturas envolvidas na osteogênese, a matriz extracelular, composta de glicosaminoglicanos (GAGs), tem um papel fundamental. **Objetivo:** Distinguir e quantificar os glicosaminoglicanos sulfatados e ácido hialurônico (AH) de fêmures de ratos, após perfuração óssea e aplicação de ondas de choque. **Métodos:** A amostra foi constituída de 50 ratos machos da linhagem *Wistar*, com três meses de idade e cerca de 300 gramas de peso. Os animais foram divididos em dois grupos e submetidos à cirurgia com perfuração óssea de dois milímetros, associado ou não a aplicação de ondas de choque, sendo feito eutanásia no terceiro, sétimo, 14^o, 21^o e 28^o dias. A análise dos glicosaminoglicanos foi realizada pela eletroforese em gel de agarose, densitometria das bandas de migração e pelo teste *ELISA-like*. **Resultados:** Houve aumento significativo dos valores dos glicosaminoglicanos sulfatados no período de três a 28 dias com predominância do condroitim sulfato. O ácido hialurônico, no terceiro dia de sacrifício, mostrou aumento significativo no grupo submetido às ondas de choque em relação ao grupo controle. **Conclusão:** A aplicação de ondas de choque em fêmures perfurados de ratos estimularam a expressão de glicosaminoglicanos sulfatados durante a reparação óssea e a expressão do ácido hialurônico, no grupo três dias, em relação ao grupo controle.

1. Introdução

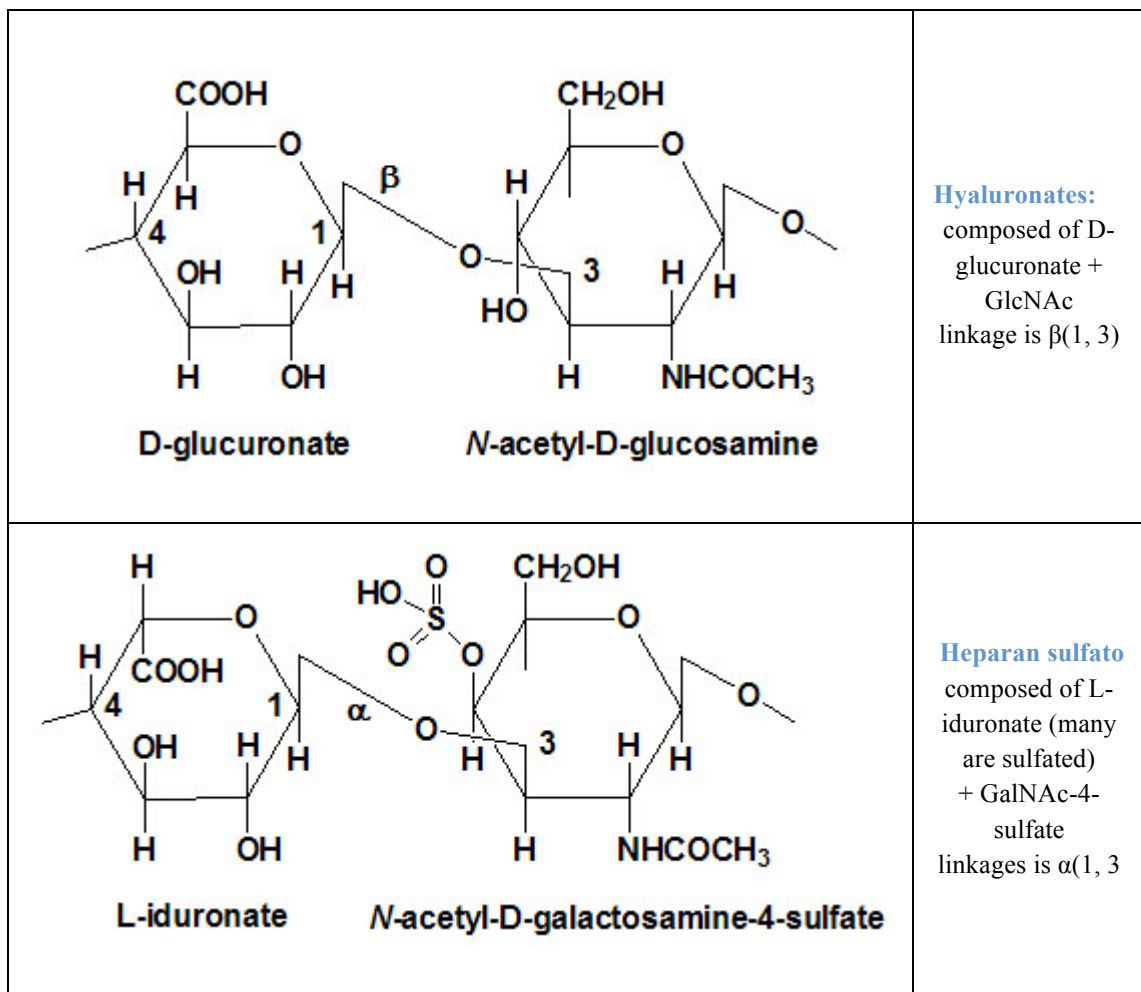
O estudo da reparação óssea é um tema de relevância devido ao aumento da longevidade humana, com conseqüente aumento de pacientes com fraturas osteoporóticas e de acidentes de alta energia, acarretando com maior frequência, fraturas de difícil consolidação óssea e com elevados custos socioeconômicos, decorrentes do prolongado tempo de tratamento e das despesas inerentes aos períodos de internação, de medicação e do uso de implantes ortopédicos. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o número de fraturas de quadril no mundo devido à osteoporose deverá passar de 1,7 milhões em 1990 para 6,3 milhões em 2050.

Diversos métodos físicos têm sido propostos para estimular a osteogênese: ultrassom pulsado trans-ósseo de baixa intensidade (Martinez de Albornoz *et al*, 2011), *Low-magnitude high-frequency vibration* - LMHFV (Chow *et al*, 2011), laser (*light amplification by stimulated emission of radiation*) (Merli *et al*, 2005), campo eletromagnético (*pulsed eletromagnetic field* – PEMF (Pilla, 2002) e terapia por ondas de choque extracorpórea (*extracorporeal shock wave therapy*) (Valchanou, Michailov, 1991).

Na reparação óssea estão envolvidos vários processos biológicos dos componentes que formam a estrutura óssea, tais como os osteoblastos, os osteócitos, os osteoclastos, o colágeno, o cálcio e fósforo e a matriz extracelular, entre outros.

A matriz óssea extracelular é composta por glicosaminoglicanos (GAGs), principalmente o condroitim sulfato, heparam sulfato, dermatam sulfato e o ácido hialurônico, que participam no processo de osteogênese e condrogênese. Os GAGs interagem com centenas de proteínas. Tais interações protegem os fatores de crescimento e citocinas contra proteólise. Os GAGs catalizam proteínas (como a trombina), regulam múltiplas vias de sinalização, incluindo FGF (*Fibroblast Growth Factor*), HGF (*Hepatocyte Growth*

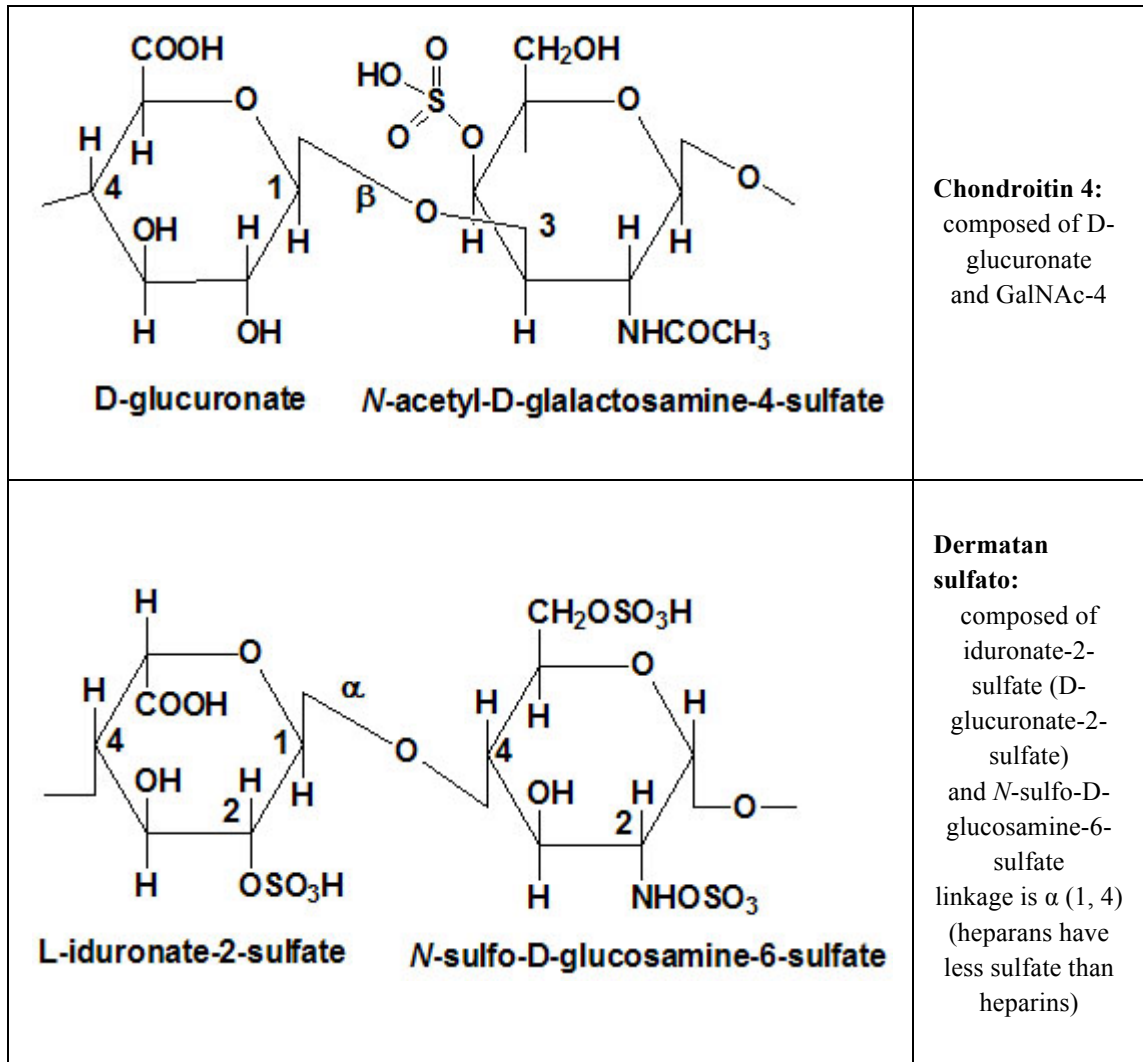
Factor), GDNF (*Glial Cell Line-derived Neurotrophic Factor*), VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*), *Wnt* e BMP (*Bone Morphogenic Protein*) (Zhang, 2010). Os GAGs são cadeias polissacarídicas, longas, não ramificadas, compostas por unidades dissacarídicas repetidas. Estas unidades dissacarídicas são formadas por uma N-acetilglicosamina ligada a um ácido urônico (Fig. 1A e 1B).



Fonte: The Medical Biochemistry Page.

Disponível em: <http://www.themedicalbiochemistrypage.org>

Figura 1A: Esquematização da estrutura química dos glicosaminoglicanos (Ácido Hialurônico e Dermatan Sulfato).



Fonte: The Medical Biochemistry Page.

Disponível em: <http://www.themedicalbiochemistrypage.org>

Figura 1B: Esquematização da estrutura química dos glicosaminoglicanos

(Condroitim Sulfato e Heparan Sulfato e Heparina).

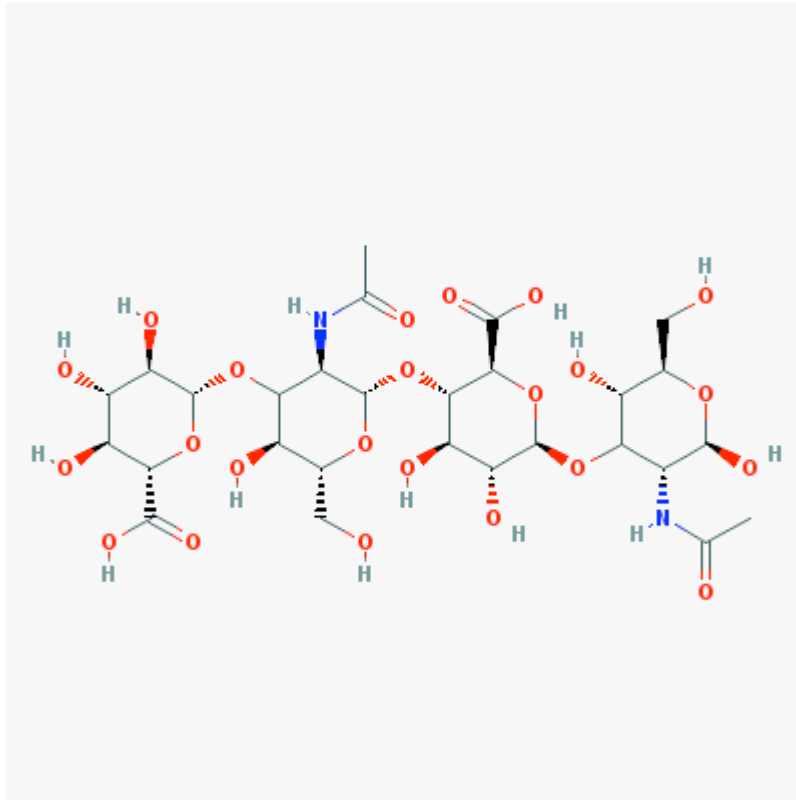
Os glicosaminoglicanos estão distribuídos no organismo em vários tecidos, ligados ou não às proteínas (Quadro I).

Quadro I. Tipos de GAGs, presença de sulfatação, ligação de proteínas e sua distribuição nos tecidos.

Glicosaminoglicanos	Sulfatação	ligados a proteínas	Distribuição
Ácido hialurônico	não	Não	cartilagem, líquido sinovial, pele, tecido de sustentação
Condroitim sulfato	sim	Sim	cartilagem, osso, pele, córnea, artérias, pele, vasos sanguíneos, coração
Dermatam sulfato	sim	sim	
Heparam sulfato	sim	Sim	membranas basais, pulmões, artérias pulmão, fígado, pele, grânulos de mastócito
Heparina	sim	sim	
Queratam sulfato	sim	Sim	cartilagem, córnea, disco vertebral

Fonte: *The Medical Biochemistry Page*.
Disponível em: <http://www.themedicalbiochemistrypage.org>

O ácido hialurônico consiste de dissacarídeos repetidos composto de *N-acetylglucosamine* (GlcNAc) e *glucuronic acid* (GlcA). É o mais largo polissacarídeo encontrado em vertebrados (Fig. 2).



Fonte : PubChem substance SID ([126673760](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/126673760))

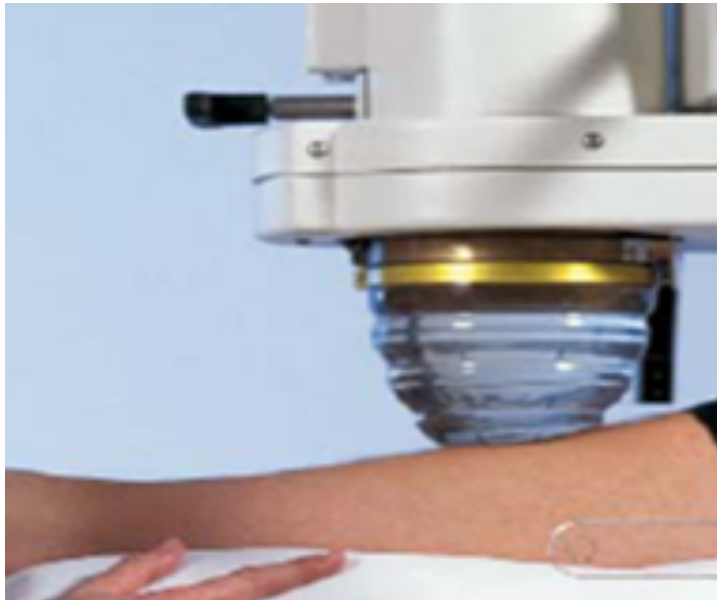
Figura 2. Estrutura química do ácido hialurônico.

Os vários tipos de GAGs podem associar-se às proteínas para constituir os proteoglicanos, com exceção do ácido hialurônico. Os proteoglicanos colaboram para a manutenção de um grande espaço de hidratação na matriz extracelular.

A terapia por ondas de choque extracorpórea foi descrita inicialmente em estudo *in vitro*, para desintegração de cálculo renal (Haeusler, Kiefer, 1971) e introduzida na Medicina em 1980 quando o primeiro paciente com cálculo renal foi tratado em Munique (Alemanha), com um equipamento litotritor desenvolvido pela Dornier® (Thiel, 2001).

Os geradores de ondas de choque podem ser de três tipos, eletro-hidráulico, eletromagnético e piezoelétrico, com características físicas diferentes entre eles (Thiel, 2001).

Os equipamentos eletro-hidráulicos constituem-se na primeira geração de equipamentos utilizados e produzem ondas de choque por meio da passagem de alta energia elétrica por um eletrodo submerso em água dentro de um recipiente em forma de elipsóide, gerando uma explosão que produz uma série de ondas pela variação de pressão súbita (Fig. 3).

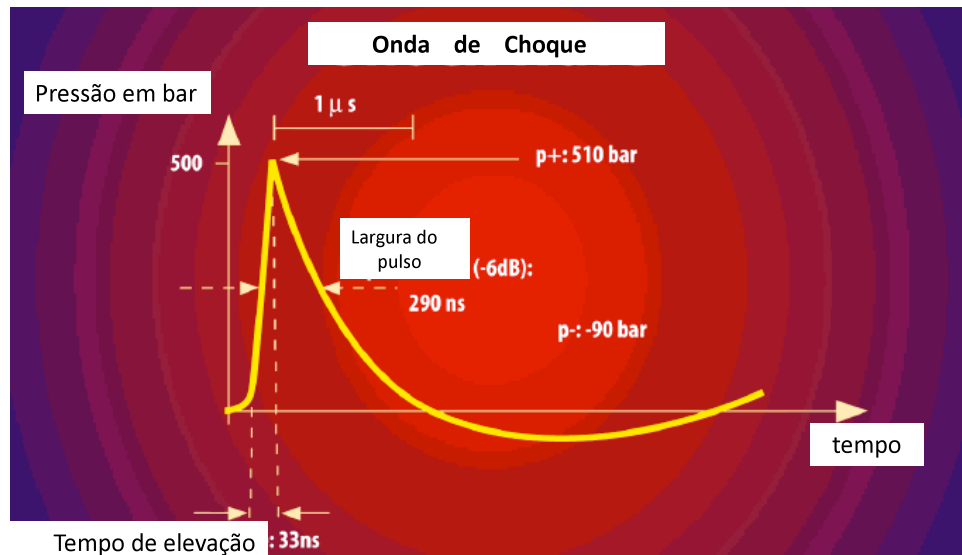


Fonte: Ossatron® –HMT 2002

Figura 3. Gerador eletro-hidráulico - Ossatron® –HMT

A onda de choque é um pulso sônico que apresenta certas características físicas como um alto pico de pressão (mais de 100MPa - 500 bares), com início súbito, durante um curto período de tempo (menor que dez nanosegundos), baixa amplitude tênsil e um pequeno ciclo de duração em

torno de dez microsegundos e um largo espectro de frequência de 16 Hz a 20MHz (Thiel, 2001) (Fig. 4).



Fonte: Chaussy et al (1997).

Figura 4. Esquemática de uma onda de choque relacionando pressão e tempo.

Os efeitos das ondas de choque têm sido estudadas em vários tecidos de animais como osso (Haupt *et al*, 1992, Bassit, Santos, Rezende, 2004), cartilagem (Giusti *et al*, 2005), pele (Haumer *et al*, 2005), tendões (Chao *et al*, 2008) e músculo cardíaco (Di Meglio *et al*, 2011). As ondas de choque extracorpórea têm mostrado um efeito estimulante da osteogênese, principalmente nos casos de retardo de consolidação de fraturas e de pseudartroses (Schaden, Fischer, Sailler, 2001, Elster *et al*, 2011, Santos *et al*, 2011), porém seu mecanismo de ação ainda não é totalmente esclarecido (Martini *et al*, 2003). Os estudos publicados da ação das ondas de choque têm focado a análise da neovascularização, expressão de óxido nítrico, TGFβ1 e do

estímulo de células mesenquimais primárias (Wang *et al*, 2001, Mittermayr *et al*, 2011).

A partir dos trabalhos desenvolvidas no Programa de Pós-graduação em Ortopedia e Traumatologia (Giusti, 2003, Penteado, 2003), com o uso do aparelho de ondas de choque modelo Ossatron®-HMT, propusemos outros estudos para FINEP – (Financiadora de Estudos e Projetos - Convênio 01.08.0524.00), o que ocorreu em 2009 e obtivemos o financiamento para a implantação de um Centro de Pesquisa em Regeneração de Tecidos, com a aquisição do Sistema de Terapia por Ondas de Choque Extracorpórea.

1.1 Objetivo

Distinguir e quantificar os glicosaminoglicanos sulfatados e ácido hialurônico no tecido ósseo dos fêmures de ratos submetidos à perfuração cirúrgica e aplicação de ondas de choque.

2. Literatura

2.1 Tecido ósseo

O tecido ósseo é formado por células e matriz extracelular, que por sua vez é composta de matriz orgânica e sais inorgânicos. A matriz orgânica é composta de fibras de colágeno tipo I embebidas na substância fundamental amorfa que contém os glicosaminoglicanos sulfatados (condroitim-4-sulfato, condroitim-6-sulfato e queratam sulfato) e várias proteínas ósseas (sialoproteína óssea, osteocalcina) (Baron, 1993).

Udupa, Prasad (1963) descreveram que, no tecido ósseo do rato, com fraturas experimentais em fêmures, verificaram que estas atingem a fase de ossificação em torno da quarta semana de evolução, dividindo o processo de consolidação óssea em quatro fases. Primeira semana ou fase fibroblástica, segunda semana ou fase colágena, terceira e quarta semanas ou fase osteogênica e, finalmente, quinta e sexta semanas ou fase de remodelação.

Sandberg, Aro, Vuorio (1993) descreveram que as células mesenquimais no sítio de fratura proliferam, diferenciam e produzem o calo de fratura consistindo de tecido fibroso, cartilagem e tecido ósseo. O osso é formado inicialmente na periferia do calo por formação óssea intramembranosa. O calo mole forma-se na região central com baixa tensão de oxigênio e consiste primariamente de cartilagem e tecido fibroso. Por meio da ossificação endocondral, a cartilagem é substituída gradualmente pelo osso. A composição bioquímica da matriz do calo de fratura muda com o processo de reparação. As células substituem o coágulo de fibrina por uma matriz contendo glicosaminoglicanos, proteoglicanos e colágeno tipo I e III. Com osso novo formado, ocorre a remodelação e o conteúdo de colágeno e outras proteínas retornam aos níveis normais. FGF e TGF- β 1 podem estimular a proliferação de condrócitos, formação de cartilagem e a proliferação de osteoblastos.

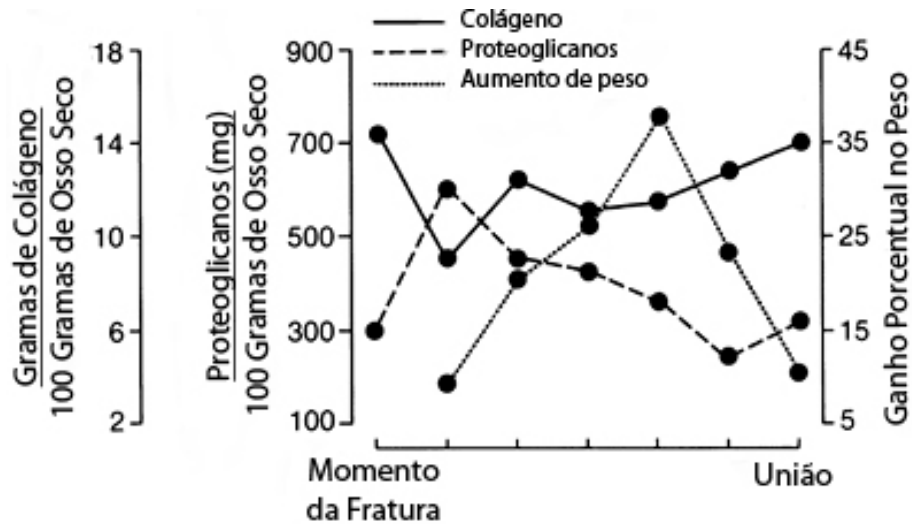
Buckwalter *et al* (1995) descreveram que o colágeno tipo I, componente orgânico da matriz contribui para a resistência óssea e plasticidade do osso. Na matriz óssea existe uma variedade de citocinas, incluindo fatores de crescimento que estimulam a formação óssea. Estes fatores de crescimento tem um importante papel no metabolismo ósseo normal e na consolidação de fraturas.

Einhorn (1998) relatou que após uma fratura óssea ocorre uma sequência de inflamação, reparação e remodelação. A inflamação começa imediatamente após o trauma e é rapidamente seguida pela reparação onde são repostas as células danificadas e a matriz, seguindo-se então uma prolongada fase de remodelação.

Mark *et al* (2004) relataram que a energia requerida para a consolidação da fratura aumenta rapidamente durante a fase de inflamação e requer alto pico durante a fase de reparação, quando as células do calo ósseo estão proliferando e sintetizando grandes volumes de nova matriz. Os mediadores inflamatórios liberados das plaquetas e das células lesadas do trauma causam dilatação de vasos e exsudação de plasma levando a um edema agudo visto na região da fratura recente. Células inflamatórias migram para a região, incluindo polimorfonucleares, leucócitos, macrófagos e linfócitos. Estas células liberam citocinas e estimulam a angiogênese. Com o desaparecimento da resposta inflamatória do tecido, necrose e exsudato são reabsorvidos e fibroblastos e condrócitos começam a produzir uma nova matriz.

Buckwalter, Einhorn, Marsh (2006) apresentaram uma representação esquemática da mudança de composição e massa do calo de fratura. A formação de colágeno precede o acúmulo de minerais. Após um aumento inicial, a concentração de proteoglicanos cai gradualmente com o processo de

reparação da fratura. A massa total do calo de fratura aumenta durante a reparação e diminui durante a remodelação (Fig. 5).



Fonte: Rockwood & Green's Fractures in Adults, 6th Ed, 2006.

Figura 5. Representação esquemática da mudança de composição e massa do calo de fratura.

Marsell, Einhorn (2009) relataram que as proteínas morfogenéticas ósseas (BMP) tem um papel importante nas três fases da consolidação de fraturas: resposta inflamatória, etapa da condrogênese e da osteogênese. A BMP-2 e BMP-4 mostram uma rápida resposta durante a fase inflamatória inicial e a BMP-2 tem mostrado ser essencial na consolidação da fratura.

2.2 Ondas de Choque

Após os trabalhos experimentais iniciais de Haupt em 1971, a terapia por ondas de choque extracorpórea foi introduzida na Medicina, e em 1980 o primeiro paciente com cálculo renal foi tratado, em Munique-Alemanha, com um equipamento litotritor desenvolvido pela Dornier® (Thiel, 2001). Sauerbruch, Delius, Paumgartner (1986) realizaram o primeiro tratamento em paciente com cálculo biliar. Também nos anos 80, observou-se em estudos com animais um padrão de resposta osteoblástica pelo uso das ondas de choque. Não está esclarecido ainda o mecanismo pela qual as ondas de choque estimulam os tecidos biológicos, em especial o tecido ósseo. Valchanou, Michailov (1991) e Haupt *et al* (1992) realizaram aplicações de ondas de choque em ossos, e constataram um efeito osteogênico na consolidação de fraturas, além de maior estabilidade mecânica.

Valchanou, Michailov (1991) relataram o resultado do tratamento de 82 ossos em 79 pacientes com retardo de consolidação ou pseudartrose, utilizando apenas uma sessão de ondas de choque, levando a consolidação em 70 ossos. Os autores acreditavam que as ondas de choque quebravam o osso esclerótico, produziam microfissuras e pequenos fragmentos ósseos, estimulando a osteogênese.

Haupt *et al* (1992) usaram 40 ratos *Sprague-Dawley* e produziram fraturas da diáfise umeral esquerda com pressão digital e, a seguir, fizeram cinco sessões de ondas de choque nos dias dois, cinco, nove, 14 e 19, com 100 choques – 14 ou 18Kv com aparelho litotritor Dornier® e 14 ratos do grupo controle. A análise foi feita pelo peso ósseo, resistência óssea, raios X, histologia e dosagem de cálcio. Como resultados não encontraram diferenças no peso de ambos os úmeros. Os filmes de raios X do grupo tratado com 18Kv mostraram sinais de consolidação óssea mais rápidos.

Delius *et al* (1995), aplicando ondas de choque em osso normal de coelhos, constataram indução de descolamento periosteal, com hemorragia subperiosteal e nas semanas subsequentes notou intensa aposição de osso cortical neoformado, com pouca alteração do tecido esponjoso.

Chaussy *et al* (1997) relataram que os mais importantes parâmetros físicos relacionados ao tratamento das afecções ortopédicas são: a distribuição de pressão, a densidade de energia utilizada e o total de energia acústica.

Wang *et al* (2001) demonstraram que as ondas de choque induzem a hiper-polarização de membrana e ativação Ras com atuação no sinal inicial para a osteogênese em células do tecido ósseo. O efeito das ondas de choque no tecido mesenquimal ósseo, exposto em diferentes doses, de 250 a 1000 impulsos com $0,16\text{mJ/mm}^2$, revelou viabilidade celular normal, no entanto, com doses maiores de 1000 impulsos, ocorria supressão da viabilidade celular. O *specific osteogenic transcription factor (CBFA1)* foi induzido pelas ondas de choque com 500 impulsos em seis horas, com aumento da atividade da fosfatase alcalina. O colágeno tipo I mRNA foi significativamente aumentado em seis dias, além da indução da osteocalcina mRNA após 12 dias, com reforço da mineralização óssea.

Wang *et al* (2003) em trabalho experimental com coelhos, demonstraram que as ondas de choque aplicadas na junção tendão-osso do tendão calcâneo promove um aumento significativo de neovasos e de marcadores angiogênicos, incluindo eNOS, VEGF e PCNA, comparativamente ao grupo controle. O eNOS e VEGF começam a aumentar logo no início com uma semana e permanecem altos até a oitava semana, declinando então até a décima segunda semana, enquanto que, o PCNA e neovasos começam na quarta semana e persistem por 12 semanas.

Maier *et al* (2004) estudaram a ação das ondas de choque em fêmures de coelhos e encontraram neoformação óssea-periosteal em fêmures com fratura cortical e descolamento periosteal, como também na ausência destes.

Wang *et al* (2004) estudaram o efeito das ondas de choque na massa óssea e a resistência óssea após fratura de fêmur no modelo de coelho. Vinte e quatro coelhos *New Zealand* foram divididos em três grupos segundo a energia usada: controle, baixa energia e alta energia, e foi avaliado a densidade mineral óssea, calo formado, conteúdo de cálcio e a resistência óssea em 12 e 24 semanas após aplicação de ondas de choque. O valor da densidade mineral óssea foi significativamente maior no grupo de alta energia em relação ao grupo controle. Não houve diferença significativa entre o grupo controle e o de baixa energia. O grupo de alta energia mostrou maior calo ósseo e maior conteúdo de cálcio e maior resistência óssea que o grupo controle e de baixa energia, concluindo que o efeito das ondas de choque na massa óssea e na resistência óssea é dose dependente na fratura aguda do coelho.

Bassit (2004) estudou o efeito das ondas de choque na consolidação óssea em osteotomias bilaterais de fêmures de cães e osteossíntese com hastes bloqueadas. Radiografias após quatro, oito e 12 semanas revelaram maior proliferação periosteal no grupo tratado. Os resultados dos exames cintilográficos (razão tratado/controle), realizados na segunda, quarta, sexta, oitava, décima e 12 semanas, foram estatisticamente superiores no grupo tratado.

Neuland *et al* (2008) descreveram que as ondas de choque geram um estímulo mecânico através dos tecidos chamado de mecanotransdução.

Jaalouk, Lammerding (2009) definem mecanotransdução como o processo celular que transforma estímulo mecânico em sinais bioquímicos, permitindo as células adaptarem-se em seu ambiente físico.

Wang *et al* (2009) investigaram os efeitos da terapia por ondas de choque na consolidação óssea e na concentração de óxido nítrico (NO), TGF- β 1 e BMP-2 em 42 pacientes com pseudartrose de ossos longos tratados com apenas uma sessão. Após seis meses, houve consolidação em 78,6% dos casos, sendo constatado nestes pacientes um aumento sérico significativo dos níveis de NO, TGF- β 1, VEGF e BMP-2 após um mês de tratamento comparado aos pacientes em que não ocorreu a consolidação óssea.

Suhr, Bloch (2010) citaram que os tecidos biológicos, tais como tendões, ossos, músculos, tecido conectivo, cartilagem, endotélio e epitélio, têm habilidade de sentirem diferentes tipos de estímulos, como metabólico, hormonal, inflamatório e mecânico.

Thamma *et al* (2010) estimularam tecido ósseo em ratos, e concluíram que as ondas de choque estimulam a osteogênese por meio da proliferação e diferenciação dos osteoblastos e pela redução da secreção de fatores pró-osteoclásticos.

Qin *et al* (2010) estudaram os efeitos das ondas de choque na junção ósteo-tendíneo de patela de coelhos. Vinte e quatro coelhos foram usados, criando-se um modelo de regeneração retardada em patela—tendão patelar, após patelectomia parcial por quatro semanas. Os animais foram divididos em dois grupos, com e sem tratamento por ondas de choque. Seis semanas após a cirurgia foi realizado uma sessão de ondas de choque. A angiogênese, condrogênese e osteogênese foram analisados por histologia e microtomografia computadorizada. Após oito e 12 semanas encontrou-se acelerada osteogênese com aumento da *BMD*, que poderia ser explicado pela ossificação endocondral e pela regeneração da zona de fibrocartilagem. Os achados revelaram que o tratamento por ondas de choque aceleraram a qualidade e a taxa de regeneração da junção tendão—osso.

Schaden *et al* (2011) estimularam tíbias de ratos com ondas de choque dislocadas e constataram, por meio de estudo com microtomografia, efeito anabólico, tanto no osso cortical como medular. Realizaram testes mecânicos e análise histológica, notando melhora das propriedades biomecânicas.

2.3 Glicosaminoglicanos Sulfatados e o Ácido Hialurônico

2.3.1 Glicosaminoglicanos (GAGs) Sulfatados

Os GAGs são heteropolissacarídeos lineares que apresentam como estrutura básica unidades dissacarídicas repetitivas. Essas unidades dissacarídicas são constituídas por uma hexosamina (D-glucosamina ou D-galactosamina) e por um açúcar não nitrogenado, que pode ser um ácido urônico (D-glucorônico ou L-idurônico) ou ainda um açúcar neutro (D-galactose), unidas entre si por ligações glicosídicas. Os GAGs mais comuns encontrados em tecidos de mamíferos são os galactosaminoglicanos, que incluem condroitim sulfato e dermatam sulfato, e os glucosaminoglicanos que incluem heparim sulfato, heparina, queratim sulfato e ácido hialurônico. Os GAGs, incluindo heparim sulfato, queratim sulfato, dermatam sulfato, condroitim-4-sulfato, chondroitim-6-sulfato e o ácido hialurônico influem na atividade da BMP-2 por meio de um mecanismo pela qual regulam a osteogênese, de forma não totalmente esclarecida (Roughley, White, 1980, Kjellén, Landahl, 1991).

Kjellén *et al* (1991) referem que o condroitim sulfato está presente nos estágios precoces da formação óssea e está implicado na regulação da deposição mineral e morfologia do cristal na mineralização durante a osteogênese.

Takagi *et al* (1991) estudaram por método imunocitoquímico e bioquímico os proteoglicanos no osso subperiosteal da diáfise de osso longo do rato e constataram que ocorre predominância de condroitim 4-sulfato e de dermatam sulfato ,tendo uma distribuição maior na parede das lacunas ósseas, canaliculos ósseos e canal vascular.

Miller *et al* (1997) descreveram que o queratam sulfato é encontrado na córnea, cartilagem, osso e no tecido do sistema nervoso central, onde participa do desenvolvimento e reparação da glia após trauma.

Yamamoto *et al* (2005) relatam que áreas totalmente calcificadas da medula óssea contém mais glicosaminoglicanos sulfatados do que tecido osteóide, sugerindo que o glicosaminoglicano sulfatado pode ter um papel crucial na formação e calcificação óssea.

Manton *et al* (2007) descreveram que o condroitim sulfato e o heparam sulfato têm sido implicados em processos biológicos, incluindo implantação embriônica, morfogênese de tecidos, reparação de feridas e neovascularização por meio de sua habilidade em regular as atividades de fatores de crescimento.

Du Souich *et al* (2009) relataram que o condroitim sulfato parece ter um efeito anti-inflamatório e imunomodulador, além de seu efeito na cartilagem, líquido sinovial e osso subcondral.

Sato *et al* (2011) demonstraram em modelos de camundongos que a *chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase* é necessária para a ossificação endocondral e sua deficiência diminui o conteúdo de condroitim sulfato na placa de crescimento, além de sua ausência causar rápido catabolismo dos agregans.

2.3.2 Ácido Hialurônico

A matriz extracelular tem papel importante no controle da angiogênese, na distribuição de fatores de crescimento e na regulação da migração de células endoteliais. O ácido hialurônico tem uma função nas propriedades mecânicas do tecido conectivo assegurando sua hidratação (Laurent, Fraser, 2002, Lataillade, Albanese, Ulzan, 2010).

Prince (2004) relatou que o ácido hialurônico está relacionado com a reabsorção óssea pelos osteoclastos.

Jiang *et al* (2005) indicaram que o ácido hialurônico está implicado na regulação da deposição mineral durante a osteogênese e dentinogênese.

Aslan, Simsek, Davi (2006) indicaram que o ácido hialurônico é encontrado em alta concentração nos tecidos que estão sofrendo reparação.

Bastow *et al* (2008) relataram que o ácido hialurônico tem diversas funções na biologia esquelética. A matriz rica em ácido hialurônico facilita a migração e condensação de células mesenquimais e participa na formação da cavidade articular e do crescimento ósseo longitudinal. O ácido hialurônico parece também regular a remodelação óssea por controle do osteoclasto, osteoblasto e comportamento do osteócito.

Matsumoto *et al* (2009) estudaram o efeito da inativação de Has2 (gene para a *Hyaluronic Acid-synthase2*) em camundongos e verificaram que sua deficiência provocava alterações esqueléticas importantes como encurtamento severo de membros, duplicidade de falanges proximais e anormalidades e desorganização das placas de crescimento com diminuição de agregan na matriz óssea, o que sugere que a Has2 é essencial para o crescimento longitudinal normal dos elementos esqueléticos dos membros e de porções

específicas dos dedos. O mesmo estudo mostrou uma redução nos condrócitos hipertróficos indicando que o ácido hialurônico é necessário na progressão normal da maturação dos condrócitos. Em adição aos defeitos esqueléticos, a cavidade articular sinovial foi defeituosa.

Merli (2010), em sua tese de doutorado, realizou estudo sobre o efeito do laser terapêutico no tecido ósseo de fêmures de ratos perfurados, comparando com grupo controle. Observou esse efeito após o sacrifício dos animais em quatro, oito e 14 dias após a aplicação de laser, no comportamento do ácido hialurônico e dos glicosaminoglicanos sulfatados.

Astachov *et al* (2011) relataram que a abundância do ácido hialurônico em tecidos embrionários indica que é altamente importante nos processos de desenvolvimento.

Kawano *et al* (2011), em estudo experimental, investigaram os efeitos positivos do ácido hialurônico na diferenciação osteoblástica induzida pela *BMP-2*.

Martinez-Sanz *et al* (2011) empregaram hidrogel de ácido hialurônico com diferentes doses de *BMP-2* para verificar a formação óssea em ratos e constataram aumento de tecido ósseo em oito semanas em todas as doses; porém o hidrogel subcutâneo induziu menos osso quando comparado a implantação subperiosteal. O exame histológico revelou osso neoformado com alta expressão de osteocalcina, osteopontina e com medula óssea angiogênica quando alta concentração de *BMP-2* foi empregada.

3. Métodos

Nosso estudo é do tipo intervencional, experimental *in vivo* e controlado, realizado no Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Escola Paulista de Medicina da UNIFESP, em colaboração com a Disciplina de Biologia Molecular do Departamento de Bioquímica da UNIFESP. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa sob número CEP 0048/09 (Anexo 1).

3.1 Animais

Foram utilizados 75 fêmures de 50 ratos machos da linhagem *Wistar* com três meses de idade, com peso médio de 300 gramas. Os animais foram obtidos e manipulados no biotério do INFAR-UNIFESP, que possui as condições sanitárias e controle parasitológico e microbiológico necessário para que se apresentem livres de patógenos oportunos.

Os animais em estudo foram mantidos em grupos de cinco animais em cabine de segurança biológica e submetidos por 12 horas de ciclo claro/escuro com água e ração *ad libitum*, em ambiente com temperatura controlada, em torno de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e com 15 trocas de ar/hora.

Os animais foram divididos em dois grupos:

Grupo I – ratos com perfuração da diáfise do fêmur bilateral

Grupo IA – fêmur esquerdo perfurado + aplicação de ondas de choque

Grupo IB – fêmur direito perfurado

Grupo II - ratos submetidos à perfuração da diáfise do fêmur unilateral (lado esquerdo).

Os animais do Grupo I e II foram avaliados conforme o tempo de eutanásia, realizada após a cirurgia em três dias, sete dias, 14 dias, 21 dias e 28 dias (Udupa, Prasad, 1963).

3.2 Procedimento cirúrgico

O procedimento cirúrgico foi realizado de acordo com a tese de Doutorado de Merli (2010). Os animais foram submetidos à anestesia intraperitoneal com Ketamina: Xilazina, na proporção de dois para um, utilizando 0,2 cc/ 100g de animal. Após anestesia intraperitoneal com seringa descartável, as patas posteriores foram tricotomizadas e desinfetadas com álcool 70% e os animais foram imobilizados em decúbito ventral e submetidos à incisão da pele da coxa com bisturi de lamina nº. 15 numa extensão de três centímetros de comprimento e feito divulsão da musculatura com exposição óssea do fêmur (Fig. 6 e 7).



Figura 6. Foto do rato após anestesia e tricotomia.



Figura 7. Foto da divulsão das partes moles e exposição óssea.

Para a confecção da lesão óssea, foi utilizado motor cirúrgico *Driller* modelo BL 600, trabalhando em velocidade de 1200 rpm (rotações por minuto) e com torque de 50 N (*Newtons*), pré-marcado pelo aparelho, e um contra ângulo cirúrgico redutor da marca *N.S.K.*, produzindo uma redução de velocidade de 16:1.

Inicialmente a perfuração da cortical óssea na diáfise do fêmur foi feita com broca tipo lança da marca Conexão de aço inox com ponta de diâmetro de zero milímetro, montada no contra ângulo redutor, com broca helicoidal de aço inox banhada em nitrato de titânio de dois milímetros de diâmetro, da marca Conexão, também montada em contra ângulo redutor *N.S.K.* de 16:1. Foi feita perfuração na medular óssea até a cortical oposta, entretanto sem atingí-la. Com esta sequência de perfurações foi padronizada uma lesão óssea de dois milímetros, compatível com o diâmetro da última broca utilizado no osso fêmur do rato, em ambas as patas (Fig. 7).



Figura 8. Foto da perfuração óssea de dois milímetros de espessura em apenas uma cortical.

Os fêmures uma vez perfurados foram hidratados com solução fisiológica a 0,9%. Em seguida foi realizada a sutura das partes moles com pontos unitários nas lesões de ambas as patas utilizando fio *mononylon* 4.0 (Fig. 9)

Houve a perda de 4 animais ocorridas nas primeiras 24 horas pós a cirurgia atribuídas à choque anestésico, sendo feito a substituição destes animais por outros.



Figura 9: Foto após sutura com fio *mononylon* 4.0

Após este procedimento as patas esquerdas foram submetidas à aplicação das ondas de choque no nível da perfuração óssea, enquanto que a pata direita não recebeu o tratamento (Fig. 10).



Figura 10: Foto da aplicação de ondas de choque.

3.3 Equipamento de ondas de choque

O aparelho gerador de ondas de choque eletro-hidráulico utilizado foi o EVOTRON®-Vet da *SwiTech* (Suiça) seguindo o protocolo de 500 impulsos – energia E4 (equivalente a $0,13 \text{ mJ/mm}^2$) e com aplicador de cinco milímetros de profundidade (Fig. 11).



Figura 11. Foto do aparelho de ondas de choque – (EVOTRON®-Vet da *SwiTech*)

A escolha deste protocolo baseia-se em estudos prévios em animais com outros modelos de equipamentos (Wang *et al*, 2001). No pós-operatório os animais receberam medicação analgésica e antibioticoterapia por cinco dias.

3.4 Eutanásia

Após um período de três dias, sete dias, 14 dias, 21 dias e 28 dias, os grupos de animais foram sacrificados em câmara de CO₂, com baixo fluxo de gás, levando a sedação, analgesia e morte irreversível.

Foi feito a retirada de todos os fêmures da análise por meio de procedimento cirúrgico (Fig. 12).



Figura 12. Foto do fêmur dissecado por cirurgia.

3.5 Descalcificação

Para a extração dos GAGs foi padronizado a utilização de fragmentos de cinco milímetros de cinco fêmures de cada grupo, que foram previamente pesados em balança de precisão (*Denver Instruments, EUA*) sendo consideradas até quatro casas decimais (Fig. 13).



Fonte: Tese de Doutorado, Merli (2010).

Figura 13. Foto da demarcação do fragmento ósseo contendo lesão.

Os fragmentos de fêmur foram fixados, à temperatura ambiente, em solução de formaldeído 4% em PBS 0,1 M (*Synth*) pH 7,2, por 48 horas, sendo posteriormente submetidos a etapa de descalcificação. O processo de descalcificação foi realizado utilizando-se *EDTA* (*ethylenediamine tetraacetic acid*, *Synth*, São Paulo, Brasil) 0,7g/l (grama por litro), tartarato duplo de sódio e potássio 8mg/l (miligrama por litro), ácido clorídrico 99,2mm/l (mililitro por litro), tartarato de sódio 0,14 g/l e água destilada q.s.p (quantidade suficiente para) para 1 l (litro) por 12 horas.

3.6 Extração dos glicosaminoglicanos sulfatados de fêmur

Os fêmures dos animais dos grupos Terapia por Ondas de Choque (TOC), lado contralateral e controle, foram lavados em tampão fosfato salino (PBS) mantidos em acetona PA a 4°C para posterior extração dos GAGs sulfatados.

Iniciamente os fêmures foram desidratados e delipidados com 10 volumes de acetona e mantidos por 24 horas a 4° C. Após a secagem do material obtêm-se o pó cetônico, que foi pesado individualmente e submetido à proteólise por maxatase 4mg/mL em tampão Tris-HCl 0,05M, pH 8,0 com M de NaCl, *overnight*.

Passado este período 10% do volume foi separado para posterior dosagem do ácido hialurônico. Possíveis peptídeos e ácidos nucleicos foram precipitados com ácido tricloroacético a 90%, concentração final de 10% em banho de gelo por 20 minutos, coletou-se o sobrenadante, adicionando-se dois volumes de metanol para a precipitação dos GAGs, que ocorre a -20°C (18-24 horas). O material foi centrifugado e o precipitado que contém GAG foi ressuspensão na proporção de 5 mg de pó cetônico para 20µL de água destilada.

3.7 Distinção e Quantificação dos glicosaminoglicanos sulfatados

Permite a distinção dos GAGs separando-o de acordo com o tampão utilizado. O tampão PDA (1,3-diaminopropano acetato) 0,05M, pH 9,0 distingue os compostos conforme a interação diferencial (por carga) com a diamina presente no tampão discriminando, por ordem decrescente de mobilidade eletroforética, os condroitim sulfatos (CS), dermatam sulfatos (DS), heparan sulfatos (HS) e heparinas (HEP). Assim a heparina é o composto que mais interage com a diamina.

Para a realização da corrida eletroforética aproximadamente 5µL de cada amostra foi aplicada no gel de agarose a 0,55% com espessura de 0,2 cm preparada em tampão 0,05M, pH 9,0. Após a aplicação, as amostras foram submetidas a corrente elétrica (5V/cm) durante uma hora em caixa refrigerada

a 5°C. Como padrão de corrida eletroforética uma mistura de GAGs (CS, DS, HS), de concentração conhecida, também foi aplicada ao gel de agarose e submetidos às mesmas condições. Como estes compostos possuem carga aniônica, a origem do gel corresponde ao pólo negativo.

Após a corrida eletroforética, os GAGs foram precipitados no gel por meio da imersão em uma solução de Cetavlon 0,1% por duas horas. Posteriormente, o gel foi seco sob uma corrente de ar quente e, a seguir, corado com uma solução de azul de toluidina 0,1% e etanol 50%. O excesso de corante foi removido com a mesma solução sem o corante. O gel foi seco em temperatura ambiente e em seguida os GAGs presentes foram quantificados por densitometria comparando-os com as soluções padrões de concentração conhecida de CS, DS e HS adicionadas ao gel de agarose.

3.8 Quantificação do ácido hialurônico

A quantificação do ácido hialurônico (AH) foi realizada por meio de um ensaio fluorimétrico não competitivo *ELISA-like*, conforme foi descrito por Martins et al (2003). Este método detecta de dois a 500 µg/L de ácido hialurônico presentes nas amostras.

A placa de *ELISA* contendo a sonda absorvida foram adicionados 100µl/poço de soluções de AH padrão em varias concentrações (0 a 500 µg/l), bem como soluções das amostras em estudo diluídas no tampão de ensaio Tris-HCl 0,05 M, pH 7,75 e BSA 1% na diluição de 1:100, em triplicatas.

A incubação foi realizada a 4°C por 12 horas, seguida de três vezes lavagens com tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 7,75. Em seguida, foram adicionadas 100 µl da sonda (1mg/ml) 1:10000 em tampão de ensaio. A placa foi agitada por duas horas e, em seguida, lavada nove vezes com tampão de lavagem.

Após esta etapa, foram adicionados à placa 100 µl/poço de Estreptavidina (Sigma) marcada com európio diluído 1:10000 em tampão de ensaio. A estreptavidina (Sigma) tem afinidade pela biotina conjugada à sonda. A placa foi agitada por meia hora e em seguida lavada com tampão de Tris-HCl 0,05 M, pH 7,75 nove vezes. Por fim, com o objetivo de soltar o európio ligado à estreptavidina (Sigma), adicionou-se uma solução *enhancement*, 280 µl/poço. As placas foram agitadas por cinco minutos e o európio livre da placa foi lido em um fluorímetro. O resultado foi expresso em ng/ml.

3.9 Método Estatístico

Os valores de GAGs e ácido hialurônico foram descritos segundo grupos e dias de sacrifícios com uso de medidas resumo (média, desvio padrão, mediana, mínimo e máximo). Os valores entre os grupos e os dias de sacrifício foram comparados com uso de análises de variâncias (ANOVA) com dois fatores (Neter *et al*, 1996), seguidas de comparações múltiplas de Tukey quando necessárias para saber entre quais grupos ou dias de sacrifícios ocorrem as diferenças.

Os testes foram realizados com nível de significância de 5% e os resultados foram ilustrados com gráficos de linhas com as médias e os respectivos erros padrões das medidas em cada grupo e dias de sacrifício.

4. Resultados

4.1 Distinção e quantificação dos glicosaminoglicanos sulfatados

4.1.1 Eletroforese em gel de agarose

A extração e quantificação dos GAGs por eletroforese em gel de agarose demonstraram após a migração eletroforética predomínio de uma banda semelhante ao condroitim sulfato, tanto no grupo controle como no grupo submetido às ondas de choque (Fig. 14).

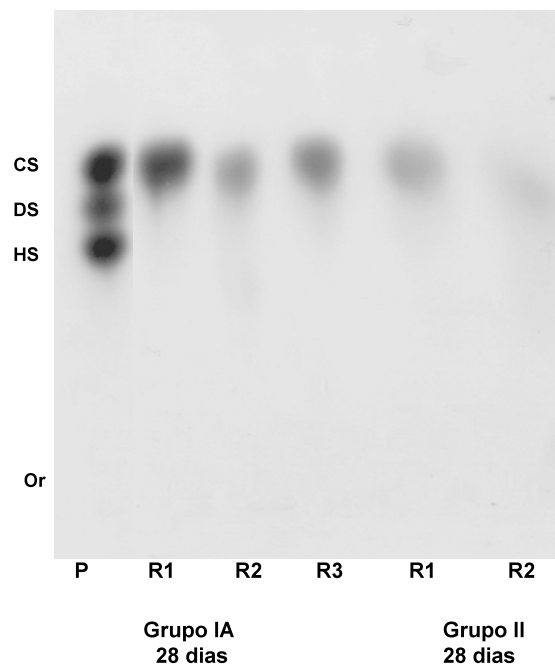
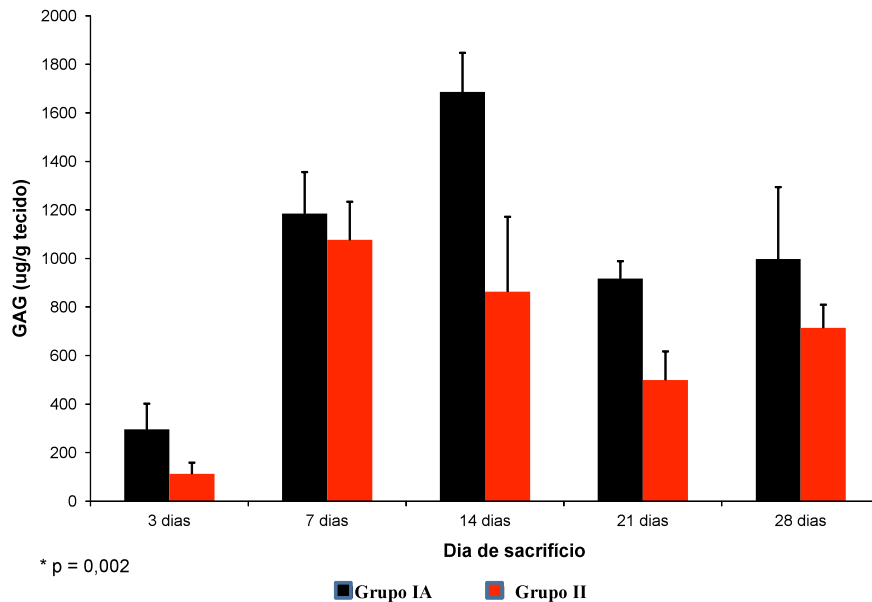


Figura 14. Lâmina de análise da eletroforese em gel de agarose de parte dos grupos IA e II – eutanásia 28 dias.

Os resultados dos GAGs ($\mu\text{g/g}$ tecido) segundo os grupos e os dias de sacrifício mostraram um padrão de comportamento dos GAGs que, em ambos os grupos, aumentam progressivamente do terceiro ao décimo quarto dia, decaindo no vigésimo primeiro dia e voltando a aumentar discretamente no vigésimo oitavo dia. Também evidenciou-se que em todos os dias houve maior quantidade de GAGs no Grupo IA submetido às ondas de choque (TOC) em relação ao Grupo II, sendo essa diferença mais expressiva no grupo 14 dias e estatisticamente significativa em todos os períodos avaliados ($p=0.002$), segundo demonstrado no Gráfico 1.

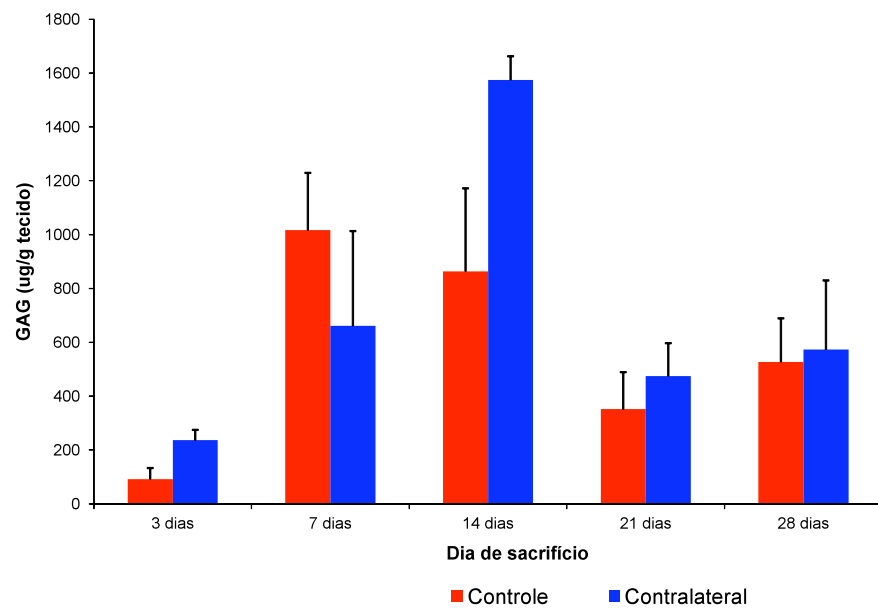
Gráfico 1. Valores médios de GAGs e respectivos erros padrão segundo grupos e dias de sacrifício.



4.1.2 Grupo IB (contralateral) e Grupo II (controle)

Os resultados do conteúdo de GAGs no Grupo IB e Grupo II mostraram um padrão de comportamento dos GAGs que aumenta progressivamente do terceiro ao décimo quarto dia, decaindo no vigésimo primeiro dia e voltando a aumentar discretamente no vigésimo oitavo dia, porém não houve diferença estatisticamente significativa entre o conteúdo de GAGs do Grupo IB e do Grupo II ($p=0,287$) (Gráfico 2).

Gráfico 2. Valores médios de GAGs entre os Grupos IB (contralateral) e Grupo II (controle) que não foram submetidos às ondas de choqu

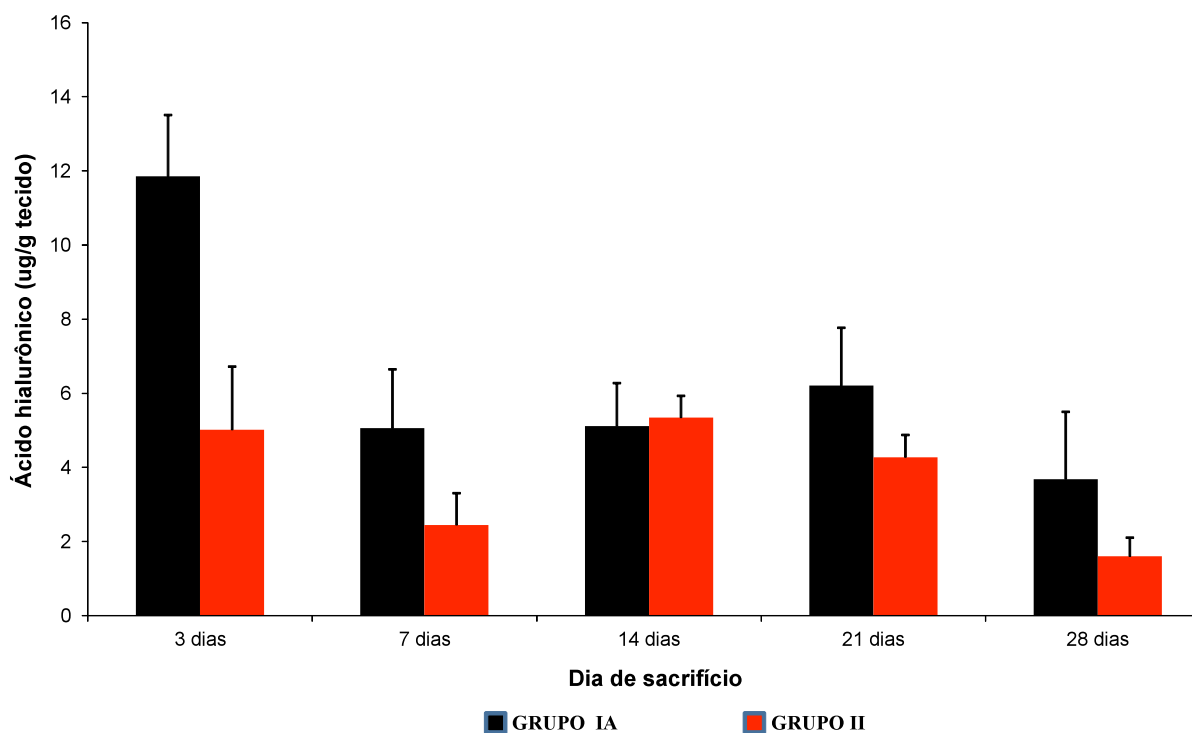


$P > 0,287$

4.2 Quantificação do ácido hialurônico

Os resultados obtidos do ácido hialurônico ($\mu\text{g/g}$ tecido) pelo ensaio não competitivo *ELISA-like* mostraram diferença estatística ($p=0,003$) no grupo IA submetido às ondas de choque (TOC) em relação ao controle no grupo três dias, sendo que nos demais dias de sacrifício não houve diferença significativa (Gráfico 3).

Gráfico 3. Valores médios de ácido hialurônico e respectivos erros padrão, segundo grupos e dia de sacrifícios.



$p= 0,003$

5. Discussão

A utilização das ondas de choque em Medicina ocorreu há mais de trinta anos no tratamento de pacientes portadores de cálculos renais, mas sua aplicação em outras indicações médicas, principalmente na área ortopédica remontam pouco mais de vinte anos, quando Valchanou, Michailov (1991) publicaram os resultados de pacientes portadores de retardo de consolidação de fraturas tratados com ondas de choque, mostrando um efeito de estimulação na osteogênese. A partir de então, outros autores surgiram, tentando comprovar e explicar esse mecanismo de ação.

Wang *et al* (2001) e Wang *et al* (2003) demonstraram que as ondas de choque em animais produzem um efeito de neoangiogênese com aumento dos marcadores angiogênicos, como eNOS, VEGF e PCNA, além de induzirem a hiperpolarização de membrana e ativação Ras que atuam no sinal inicial para a osteogênese em células do tecido ósseo. Demonstraram que as ondas de choque têm um efeito dose dependente na massa e na resistência óssea (Wang *et al*, 2002, Wang *et al*, 2004).

O estudo na área dos glicosaminoglicanos vem tendo grande interesse, pois, no processo de formação óssea demonstrou-se que ocorre uma importante participação dos componentes da matriz óssea, em especial do condroitim sulfato, heparam sulfato e ácido hialurônico. Esse trabalho faz parte de uma Linha de Pesquisa em regeneração óssea, realizado no Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Unifesp.

Optamos pelo aparelho de gerador de ondas de choque do tipo eletro-hidráulico, por ser um sistema semelhante utilizado em pesquisa nesta área e pela praticidade de seu manuseio. Os parâmetros de energia utilizados em nosso estudo, equivalente a $0,13\text{mJ/mm}^2$, 500 impulsos e aplicador de cinco milímetros de profundidade foram baseados em estudos de outros autores, que utilizaram níveis de energia semelhantes estimulando a consolidação óssea, sem complicações (Haupt *et al*, 1992, Wang *et al*, 2001, Chen *et al*, 2003).

Níveis de energia acima de 0,28mJ/mm² não devem ser aplicados em ratos por risco de lesão tecidual (Chen *et al*, 2003).

A equipe envolvida no procedimento cirúrgico e na aplicação das ondas de choque foi treinada e executada de forma padronizada. A realização de somente uma aplicação de ondas de choque foi baseada nos trabalhos em animais de Haupt *et al* (1992) e Wang *et al* (2002) que demonstraram já ser suficiente esta única aplicação para acarretar efeitos que influenciaram positivamente a consolidação óssea, além de que, na maioria dos trabalhos experimentais, foram utilizados aplicação única, visando padronização que permita a comparação de diferentes estudos.

A metodologia empregada foi semelhante à realizada no estudo da avaliação do efeito do laser terapêutico no tecido ósseo de ratos (Merli *et al*, 2005). O padrão de perfuração óssea em fêmur de ratos com diâmetro de dois milímetros foi desenvolvida por Merli *et al* (2005) e previamente por Silva Jr *et al* (2002) com diâmetro de perfuração de um milímetro.

Em nosso estudo, optamos por grupos com sacrifício no terceiro dia, sétimo dia, 14 dias, 21 dias e 28 dias após a aplicação das ondas de choque, baseados em estudos que indicam que a consolidação óssea no rato se processa em quatro semanas, já apresentando as três fases clássicas de inflamação, reparo e remodelação (Udupa, Prasad, 1963, Einhorn, 1998)

Podemos observar em nosso trabalho que os GAGs apresentaram padrão de comportamento homogêneo em todos os três grupos avaliados com aumento progressivo do terceiro ao décimo quarto dia, decaindo no vigésimo primeiro dia e voltando a aumentar discretamente no vigésimo oitavo dia, sendo esse mesmo padrão o clássico já apresentado no estudo de consolidação de Buckwalter, Einhorn, Marsh (2006), demonstrando que a terapia por ondas de choque não alterou a curva de comportamento geral dos GAGs. Ademais dessa manutenção comportamental, houve uma importante alteração na

quantidade de GAGs ao longo dos períodos de consolidação avaliados com a terapia de ondas de choque demonstrando um efeito anabólico sobre os mesmos, sendo evidenciadas importantes diferenças com o Grupo IA expressando maiores quantidades em todas as fases avaliadas quando comparado ao grupo II (controle) ($p=0,002$).

Merli (2010) realizou metodologia com grupos de animais sacrificados em quatro, oito e 14 dias e mensurou o conteúdo dos GAGs sulfatados no tecido ósseo de ratos após aplicação com laser terapêutico e seus resultados mostraram maior aumento dos GAGs sulfatados nos dias oito e 14 dias tratados com laser terapêutico em relação ao grupo, semelhante ao encontrado em nosso estudo.

Em relação aos GAGs sulfatados quantificados pelo gel de agarose encontramos banda predominante em condroitim sulfato (CS), o que está de acordo com Kiellén, Lindahl (1991), que indicaram que o mesmo estava presente nos estágios da formação óssea e na regulação da deposição mineral e morfologia do cristal na mineralização, durante a osteogênese e, pelo estudo de Takagi *et al* (1991), que encontraram no tecido ósseo de ratos predominância de condroitim 4-sulfato e, em menor quantidade, de condroitim 6-sulfato.

O resultado obtido em relação ao conteúdo do ácido hialurônico em fêmures perfurados de ratos do Grupos IA (submetido a TOC) e do Grupo II (controle) demonstram que houve diferença estatística ($p=0,003$) no terceiro dia. Comparando com os achados de Merli (2010), que mediu o efeito do laser no ácido hialurônico de fêmures de ratos, seus resultados indicam um aumento do ácido hialurônico quatro dias após a aplicação. Aparentemente, tanto o laser quanto as ondas de choque, aumentam a expressão de ácido hialurônico no período de três a quatro dias após a aplicação. Segundo Bastow *et al* (2008) e Matsumoto *et al* (2009), o ácido hialurônico se mostrou importante,

parecendo apresentar características de uma modulação mais precoce nos diferentes processos do tecido ósseo, ou seja, atuando em mecanismos iniciais de sinalização. Em nossos resultados, o aumento precoce (grupo três dias) do ácido hialurônico, no grupo ondas de choque em relação ao controle, passa a ser importantíssimo, apesar de não serem encontradas diferenças significantes nos demais dias, pois, quando realizado um paralelo aos estudos supracitados, percebe-se que a maior atuação dessa molécula concentra-se nas fases iniciais dos diversos decursos de atividades do osso.

Nos resultados obtidos nos grupos II (controle) e IB (contralateral), que não foram expostos diretamente às ondas de choque, não se evidenciou diferença estatística. Apesar de não existirem trabalhos mostrando efeito sistêmico das ondas de choque em relação ao tecido ósseo, existe uma polêmica entre os estudiosos sobre este tema. Em nosso trabalho, não foi evidenciado diferença do conteúdo dos GAGs sulfatados entre os grupos IB (contralateral) e II (controle) em todos os dias de sacrifício ($p=0,287$), o que sugere que não exista efeito sistêmico da aplicação de ondas de choque em relação aos GAGs sulfatados no tecido ósseo.

Os efeitos produzidos pelas ondas de choque nos tecidos geram respostas bioquímicas ainda não totalmente esclarecidas, mas segundo Jaalouk, Lammerding (2009) as células traduzem os estímulos mecânicos em sinais bioquímicos levando à mudanças adaptativas da função celular, e a sinalização por mecanotransdução tem um papel fundamental na manutenção de vários tecidos tensionados mecanicamente, como músculo, osso, cartilagem e vasos sanguíneos, sendo que os condrócitos adaptados a grandes variações de estresse secretam glicosaminoglicanos, moléculas responsáveis por parte das propriedades mecânicas dinâmicas, principalmente a resistência às forças de compressão.

Chen *et al* (2003) sugerem que o estímulo físico gerado pelas ondas de choque, rapidamente transmitem energia e pressão que perturba a membrana celular e altera os potenciais de membrana, que por sua vez, ativa proteínas de membrana e iniciam uma cascata de sinalização de mitogênese e osteogênese para formação óssea.

Wang *et al* (2004) demonstraram que as ondas de choque promoveram no tecido ósseo um aumento da densidade mineral óssea, maior calo ósseo, com maior conteúdo de cálcio, e podemos induzir que estes achados podem estar relacionados ao aumento do conteúdo dos glicosaminoglicanos sulfatados e do ácido hialurônico no processo de mineralização óssea, induzidos pelas ondas de choque, achado corroborado por nosso estudo.

Sabe-se que muitos outros fatores que participam do metabolismo ósseo estão implicados neste processo e que as ondas de choque atuam de vários modos, como estimulando a neovascularização por meio da indução de precursores neoangiogênicos (Wang *et al*, 2003), estimulação da BMP-2 (Wang *et al*, 2009), estimulação de osteoblastos (Thamma *et al*, 2010), entre outros efeitos, pressupondo uma interação muito complexa entre os participantes do processo de regeneração óssea.

Nosso estudo contribui para o conhecimento do que ocorre com os glicosaminoglicanos sulfatados e o ácido hialurônico, no tecido osso de rato após a estimulação por ondas de choque. Com nossos resultados podemos pressupor que o aumento do conteúdo dos GAGs no tecido ósseo, mediante a aplicação de ondas de choque, pode ser um dos fatores determinantes que propiciam a formação de osso com maior resistência e maior conteúdo de calo, conforme os achados de Wang *et al* (2004).

Nossos resultados propiciaram a realização de novo estudo com as ondas de choque, por meio da análise histológica complementar no tecido ósseo (Comissão de Ética e Pesquisa da UNIFESP sob no. CEP 0070/11), e

perspectivas de outros projetos que estudarão os efeitos em outros tecidos, em que os GAGs estão presentes, como pele e cartilagem.

Apesar das ondas de choque terem aplicação clínica há mais de três décadas, como no tratamento de cálculos renais, muito pouco se sabe sobre seus efeitos em outros órgãos. A sua aplicabilidade tem sido pesquisada na cicatrização de feridas de pele, principalmente em úlceras de pés diabéticos (Wang *et al*, 2009) e em várias situações onde há necessidade de se estimular a vascularização, como na osteonecrose de cabeça femural com resultados promissores (Wang *et al*, 2005). Existem, ainda, muitas dúvidas em relação a forma de se aplicar esta tecnologia, como qual o gerador de ondas de choque (eletro-hidráulico, eletromagnético ou piezoelétrico) mais indicado, quais níveis de energia, número de impulsos e, qual o número de aplicações são necessários para se obter a melhor resposta para cada tipo de tecido. A análise comparativa com outros sistemas (ultrassom pulsado trans-ósseo de baixa intensidade, *LMHFV*, *PEMF*, *laser*) que induzem a regeneração óssea, deve ser realizada para se verificar quais são os mais efetivos e de melhor custo-benefício socioeconômico e com menor risco de efeitos adversos.

6. Conclusão

A aplicação de ondas de choque em fêmures perfurados de ratos estimularam:

- a expressão do condroitin sulfato durante a reparação óssea,
- a expressão do ácido hialurônico, no grupo IA (TOC) três dias, em relação ao grupo II (controle).

7. Referências

Aslan M, Simsek G, Dayi E. The Effect of Hyaluronic Acid-supplemented Bone Graft in Bone Healing: Experimental Study in Rabbits. *J Biomater Appl.* 2006 Jan; 20(3):209-20.

Astachov L, Vago R, Aviv M, Nevo Z. Hyaluronan and mesenchymal stem cells: from germ layer to cartilage and bone. *Front Biosci.* 2011 Jan 1; 16:261-76.

Baron J. Metabolism Bone. In: *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism.* 2nd edition; 1993, 3p.

Bassit AC. Efeito da Terapia por ondas de choque na consolidação óssea após osteossíntese de fêmur com hastes bloqueadas: estudo experimental em cães [dissertação]. *Fac Med USP; São Paulo.* 2004.

Bassit ACF, Santos PRD, Rezende MU. Efeito da terapia por ondas de choque sobre a consolidação óssea em caso de pseudoartrose de rádio e ulna em cão. *Bras Vet Res Anim Sci.* 2004; V.41 (supl).

Bastow ER, Byers S, Golub SB, Clarkin CE, Pitsillides AA, Fosang AJ. Hyaluronan synthesis and degradation in cartilage and bone. *Cell Mol Life Sci.* 2008 Feb; 65(3):395-413.

Buckwalter JA, Einhorn TA, Marsh JL. Bone and Joint Healing. In: *Rockwood & Green's Fractures in Adults, 6th Edition,* Ed. Bucholz RW, Heckman JD, Court-Brown CD. 2006; Chapter 8, 301p.

Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R. Bone biology. Part I. Structure, blood supply, cells, matrix and mineralization. *J Bone Joint Surg* 1995; 77A:1256-1275.

Chao YH, Tsuang YH, Sun JS, Chen LT, Chiang YF, Wang CC, Chen MH. Effects of shock waves on tenocyte proliferation and extracellular matrix metabolism. *Ultrasound Med Biol*. 2008 May; 34(5):841-52.

Chaussy C, Eisenberger F, Jocham D et al (eds). High energy shock waves in medicine. Stuttgart Thieme 1997.

Chen Y, Kuo Y, Yang K, Wang C, Huang H, Wang F. Shock wave application enhances pertussis toxin protein-sensitive bone formation of segmental femoral defect in rats. *J Bone Min Res*. 2003; 18(12):2169-79.

Chow DH, Leung KS, Qin L, Leung AH, Cheung WH. Low-magnitude high-frequency vibration (LMHFV) enhances bone remodeling in osteoporotic rat femoral fracture healing. *J Orthop Res*. 2011 May; 29(5):746-52.

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

Delius M. History of shock wave lithotripsy. *AIP Conf Proc*. 2000 July; 524: 23-32.

Di Meglio F, Nurzynska D, Castaldo C, Miraglia R, Romano V, De Angelis A, Piegari E, Russo S, Montagnani S. Cardiac shock wave therapy: assessment of safety and new insights into mechanisms of tissue regeneration. *J Cell Mol Med* 2011 Jul 27. doi: 10.1111/j.1582-4934.2011.01393.x.

Du Souich P, Garcia AG, Vergés J, Montelli E. Immunomodulatory and anti-inflammatory effects of chondroitin sulphate. *J Cell Mol Med*. 2009 Aug; 13(8A):1451-63.

Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. Clin Orthop Relat Res. 1998 Oct; (335 Suppl):S7-21

Elster EA, Stojadinovic A, Forsberg J, Shawen S, Andersen RC, Schaden W. Extracorporeal shock wave therapy for nonunion of the tibia. J Orthop Trauma. 2010 Mar; 24(3):133-41.

Eames BF, Yan YL, Swartz ME, Levic DS, Knapik EW, Postlethwait JH, Kimmel CB. Mutations in *fam20b* and *xyll11* Reveal that cartilage matrix controls timing of endochondral ossification by inhibiting chondrocyte maturation. PloS Genet. 2011 Aug; 7(8):e1002246.

Giusti G. Efeito de Ondas de Choque na Placa de Crescimento de Coelhos [Dissertação de Mestrado]. Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2003.

Giusti G, Penteado FT, dos Santos JBG, Alves MTS, Faloppa F. Efeito de ondas de choque na placa de crescimento de coelhos. Acta ortop bras. 2005, 13(1):31-34.

Götting C, Prante C, Kuhn J, Kleesiek K. Proteoglycan biosynthesis during chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. Scientific World Journal. 2007 Aug; 17;7:1207-10.

Grimes R, Jepsen KJ, Fitch JL, Einhorn TA, Gerstenfeld LC. The transcriptome of fracture defines mechanisms of coordination of skeletal and vascular development during endochondral bone formation. J Bone Miner Res. 2011 Nov; 26(11):2597-609.

Haupt G, Haupt A, Ekkernkamp A. Influence of shock waves on fracture healing. Urology. 1992; 39(6):529-532.

Haupt G. Use of extracorporeal shock wave in the treatment of pseudoarthrosis, tendinopathy and other orthopaedic disease. *J Urology*. 1997. 158:4-11

Haupt LM, Murali S, Mun FK, Teplyuk N, Mei LF, Van Wijnen AJ, Nurcombe V, Cool SM. The heparin sulfate proteoglycan (HSPG) glypican-3 mediates commitment of MC3T3-E1 cells toward osteogenesis. *J Cell Physiol*. 2009 Sep; 220(3):780-91.

Haeusler E, Kiefer W. Anregung von Stogwellen in flüssigkeiten durch hochgeschwindigkeitswassertropfen. *Verhand Dish Physikal Gesellsch*. 1971; 6:786.

Huemer GM, Meirer R, Gurunluoglu R, Kamelger FS, Dunst KM, Wanner S, Piza-Katzer H. Comparison of the effectiveness of gene therapy with transforming growth factor β or extracorporeal shock wave therapy to reduce ischemic necrosis in an epigastric skin flap model in rats. *Wound Repair Regen*. 2005 May-Jun ; 13(3):262-8.

Jaalouk DE, Lammerding J. Mechanotransduction gone awry. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009; 10,63-73.

Jiang H, Liu XY, Zhang G, Li Y. Kinetics and template nucleation of self-assembled hydroxyapatite nanocrystallites by chondroitin sulfate. *J Biol Chem*. 2005; 23:42061-6.

Kawano M, Ariyoshi W, Iwanaga K, Okinaga T, Habu M, Yoshioka I, Tominaga K, Nishihara T. Mechanism involved in enhancement of osteoblast differentiation by hyaluronic acid. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Feb 25; 405(4):575-80.

Kjellén L, Lindahl U. Proteoglycans: structures and interactions. *Annu Rev Biochem.* 1991; 60:443-75

Lataillade JJ, Albanese P, Uzan G. Implication of hyaluronic acid in normal and pathological angiogenesis. Application for cellular engineering. *Ann Dermatol Venereol.* 2011 Apr; 137 Suppl 1:S15-22.

Laurent TC, Fraser JR. Hyaluronan. *Faseb J.* 1992 Apr; 6(7):2397-404.

Ling L, Dombrowski C, Foong KM, Haupt LM, Stein GS, Nurcombe V, Van Wijnen AJ, Cool SM. Synergism between Wnt3a and heparin enhances osteogenesis via a phosphoinositide 3-kinase/Akt/RUNX2 pathway. *J Biol Chem.* 2010 Aug 20; 285(34):26233-44.

Maier M, Hausdorf J, Tischer T, Milz S, Weller C, Refior HJ, Schmitz C. New bone formation by extracorporeal shock waves. Dependence of induction on energy flux density. *Orthopäde.* 2004 Dec; 33(12):1401-10.

Mark H, Penington A, Nannmark U, Morrison W, Messina A. Microvascular invasion during endochondral ossification in experimental fractures in rats. *Bone.* 2004 Aug; 35(2):535-42.

Marsell R, Einhorn TA. The role of endogenous bone morphogenetic proteins in normal skeletal repair. *Injury.* 2009 Dec; 40 Suppl 3:S4-7.

Martinez de Albornoz P, Khanna A, Longo UG, Forriol F, Maffulli N. The evidence of low-intensity pulsed ultrasound for in vitro, animal and human fracture healing. *Br Med Bull.* 2011 Jun 22. [Epub ahead of print]

Martinez-Sanz E, Ossipov DA, Hilborn J, Larsson S, Jonsson KB, Varghese OP. Bone reservoir: injectable hyaluronic acid hydrogel for minimal invasive bone augmentation. *J Control Release.* 2011 Jun 10; 152(2):232-40.

Martini L, Giavaresi G, Fini M, Torricelli P, de Pretto M, Schaden W, Giardino R. Effect of extracorporeal shock wave therapy on osteoblastike cells. Clin Orthop Relat Res. 2003 Aug; (413):269-80.

Manton KJ, Leong DF, Cool SM, Nurcombe V. Disruption of heparin and chondroitin sulfate signaling enhances mesenchymal stem cell-derived osteogenic differentiation via bone morphogenetic protein signaling pathqays. Stem Cells. 2007 Nov; 25(11):2845-54.

Martins JR, Passerotti CC, Maciel RM, Sampaio LO, Dietrich CP, Nader HB. Practical Determination of Hyaluronan by a New Noncompetitive Fluorescence-Based Assay on Serum of Normal and Cirrhotic Patients. Anal Biochem. 2003. 319:65-72.

Matsumoto K, Li Y, Jatuba C, Sugiyama Y, Sayo T, Okuno M, Dealy C, Toole B, Takeda J, Yamaguchi Y, Kosher R. Conditional inactivation of Has2 reveals a crucial role for hyaluronican in skeletal growth, patterning, chondrocyte maturation and joint formation in the developing limb. Development. 2009; 136:2825-2835.

Merli LAS. O efeito do laser terapêutico na dinâmica de reparação da matriz óssea [Tese de Doutorado]. Universidade Federal de São Paulo, São Paulo. 2010.

Merli LAS, Santos MTB, Genovese WJ, Faloppa F. Effect of Low Intensity Laser Irradiation on the Process of Bone Repair. Photomed Laser Surg. 2005. 23:212-15.

Miguez PA, Terajima M, Nagaoka H, Mochida Y, Yamauchi M. Role of glycosamynoglicans of biglycan in BMP-2signaling. Biochem Biophys Res Commun. 2001. 405(2):262-6.

Miller B, Miller B, Sheppard AM, Pearlman AL. Developmental expression of keratan sulfate-like immunoreactivity distinguishes thalamic nuclei and cortical domain. *J Com Neurol.* 1997; 380(4):533–52.

Mittermayr R, Hartinger J, Antonic V, Meinel A, Pfeifer S, Stojadinovic A, Schaden W, Redl H. Extracorporeal shock wave therapy (ESWT) minimizes ischemic tissue necrosis irrespective of application time and promotes revascularization by stimulating angiogenesis. *Ann Surg.* 2011 May; 253(5):1024-32.

Mollon B, da Silva V, Busse JW, Einhorn TA, Bhandari M. Electrical stimulation for long-bone fracture-healing: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Bone Joint Surg Am.* 2008 Nov; 90(11):2322-30

Muller B, Prante C, Gastens M, Kuhn J, Kleesiek K, Gotting C. Increased levels of xylosyltransferase I correlate with the mineralization of the extracellular matrix during osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Matrix Biol.* 2008 Mar; 27(2):139-49.

Murali S, Manton KJ, Tjong V, Su X, Haupt LM, Cool SM, Nurcombe V. Purification and characterization of heparin sulfate from human primary osteoblasts. *J Cell Biochem.* 2009 Dec 1; 108(5):1132-42.

Neuland H, Delhase Y, Duchstein HJ, Schmidt A, Bloch W. Extracorporeal shock waves influence migration, proliferation and growth of mesenchymal stem cells. *ISMST Newsletter.* 2008 May; 14(1):13-16.

Neter J, Kutner MH, Nacshheim CJ, Wasserman W. *Applied Linear Statistical Models.* 4. ed. Illinois: Richard D. Irwing. 1996; 1408p.

Penteado FT. Efeito da Aplicação de Ondas de Choque Extracorpóreas de Alta Energia na Vascularização do Ligamento Patelar de Coelhos [Dissertação de Mestrado]. Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2003.

Pilla AA. Low-intensity electromagnetic and mechanical modulation of bone growth and repair: are they equivalent? *J Orthop Sci.* 2002; 7(3):420-8.

Prince CW. Roles of Hialuronan in Bone Resorption. 2004 Apr 29; 5:12.

Qin L, Wang L, Wong M, Wang G, Zhang G, Chan K, Cheung W, Leung K. Osteogenesis induced by extracorporeal shockwave in treatment of delayed osteotendinous healing. *Journal of Orthopaedic Research.* 2010 Jan.; 28(1):70-76.

Roberts HC, Moseley R, Sloan AJ, Youde SJ, Waddington RJ. Lipopolysaccharide alters decorin and biglycan synthesis in rat alveolar bone osteoblasts: consequences for bone repair during periodontal disease. *Eur J Oral Sci.* 2008; 116: 207-16.

Roughley PJ, White RJ. Age-related changes in the structure of the proteoglycan subunits from human articular cartilage. *J Biol Chem.* 1980 Jan; 10:255(1):217-24.

Sandberg MJ, Aro HT, Vuorio EL. Gene expression during bone repair. *Clin Orthop Relat Res* 1993;289:292-312.

Santos P, Boatto H, Nishimura M, Bitar R. Uso da terapia por ondas de choque em retardo de consolidação de fraturas: relato de casos. *RBM Ortopedia.* 2011; 68:30-34

Sauerbruch T, Delius M, Paumgartner G. Fragmentation of gallstones by extracorporeal shock waves. *N Engl J Med.* 1986; 314: 318.

Schaden W, Fischer A, Sailler A. Extracorporeal shock wave therapy of non union or delayed osseous union. *Clin Orthop Relat Res.* 2001; 387:90-4.

Sato T, Kudo T, Ogawa H, Hirano T, Kyohara K, Togayachi A, Ema M, Takahashi S, Kimata K, Watanabe H, Narimatsu H. Chondroitinsulfate N-acetylgalactosaminyltransferase 1 is necessary for normal endochondral ossification and aggrecan metabolism. *J Biol Chem.* 2011 Feb 18; 286(7): 5803-12.

Silva Junior DN, Pinheiro ALB, Oliveira MG, Weismenn R, Ramalhol MPE, Nicolau RA. Computerized morphometric assessment of the effect of low-level laser therapy on bone repair: an experimental animal study. *J Clin Laser Med Sur.* 2002; 20:83-87.

Suhr F, Bloch W. Mechanotransduction – Mediators, Sensors, and Effects on Tissues and Stem Cells. *Newsletter – ISMST.* 2010 May; 6(1):24-7.

Takagi M, Maeno M, Kagami A, Takahashi Y, Otsuka K. Biochemical and immunocytochemical characterization of mineral binding proteoglycans in rat bone. *J Histochem Cytochem.* 1991 Jan; 39(1):41-50.

Thiel M . Application of shock waves in medicine. *Clin Orthop.* 2001; 387:18-21.

Udupa KN, Prasad GC. Chemical and histochemical studies of organic constituents in fracture repair in rats. *J Bone Joint Surg.* 1963; 45(B):770-9.

Valchanou VD, Michailov P. High-energy shock waves in the treatment of delayed and nonunion of fractures. *Int Orthop.* 1991; 151:181-4.

Van der Jagt OP, Piscaer TM, Schaden W, Li J, Kops N, Jahr H, Van der Linden JC, Waarsing JH, Verhaar JA, De Jong M, Weinans H. Unfocused extracorporeal shock wave induce anabolic effects in rat bone. *J Bone Joint Surg Am.* 2011 Jan 5; 93(1):38-48.

Thama R, dell'Endice S, Notarnicola A, Moretti L, Patella S, Patella V, Zallone A, Moretti B. Extracorporeal shock waves stimulate osteoblast activities. *Ultrasound Med Biol.* 2009 Dec; 35(12):2093-100.

Toole BP. Hyaluronan in morphogenesis. *J Inter Med.* 1997; 242:35-40.

Toole BP. Hyaluronan is not just a goo! *J Clin Invest.* 2000a 106:335-336.

Toole BP. Hyaluronan in morphogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* 2000; 12:79-87.

Udupa KN, Prasad GC. Chemical and histochemical studies of organic constituents in fracture repair in rats. *J Bone Joint Surg Br.* 1963; 45:770-9.

Wang FS, Wang CJ, Huang HJ, Chung H, Chen RF, Yang KD. Physical shock wave mediates membrane hyperpolarization and Ras activation for osteogenesis in human bone marrow stromal cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2001; 287:648-55.

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 Surg.* 2002; 84-B:457-61.

Wang FS, Wang CJ, Shyr M, Kuol YR, Chen RF, Yang KD. Superoxide mediates shock wave induction of ERK-dependent osteogenic transcription factor (CBFA1) and mesenchymal cell differentiation toward

osteoprogenitors. *The Journal of Biological Chemistry*. 2002; 277(13): 10931-10937.

Wang CJ, Wang FS, Kuender DY, Weng LH, Hsu CC, Haung CS, Yang LC. Shock wave therapy induces neovascularization at the tendon-bone junction. *Journal of Orthopaedic Research*. 2003; 21:984-989.

Wang CJ, Yang KD, Wang FS, Hsu CC, Chen HH. Shock wave treatment shows dose-dependent enhancement of bone mass and bone strength after fracture of the femur. *Bone*. 2004 Jan; 34(1):225-30.

Wang CJ, Wang FS, Huang CC, Yang KD, Weng LH, Huang HY. Treatment of osteonecrosis of the femoral head - Comparison of extracorporeal shockwave and core decompression and bone grafting. *Journal of Bone and Joint Surgery [Am]*. 2005; 87(11):2380-7.

Wang CJ, Yang KD, Ko JY, Huang CC, Huang HY, Wang FS. 2009 .The effects of shockwave on bone healing and systemic concentrations of nitric oxide (NO), TGF-beta1 and BMP-2 in long bone non unions. *Nitric Oxide*. 2009 Jun; 20(4):298-303.

Wang CJ, Kuo YR, Wu RW, Liu RT, Hsu CS, Wang FS, Yang KD. Extracorporeal shockwave for diabetic foot ulcers. *Journal of Surgical Research*. 2009; 152:96-103.

Yamamoto T, Nagaoka N, Hirata A, Nakamura H, Inoue M, Kawai M, Ikegame M. Ultrastructural and immunohistochemical studies of medullarybone calcification, with special reference to sulphated glycosaminoglycans. *J Electron Microsc (Tokyo)*. 2005 Jan; 54(1):29-34.

Zhang L. Glycosaminoglycan (GAG) biosynthesis and GAG-binding proteins. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2010; 93:1-17.

Normas adotadas

- 1. ICMJE –International Comittee of Medical Journals Editors**
<http://www.icmje.org>
- 2. COBEA –Colégio Brasileiro de Experimentação Animal**
- 3. Consulta ao DeCs –Descritores em Ciências da Saúde**
[Http://decs.bvs.br/-terminologia em saúde](Http://decs.bvs.br/-terminologia%20em%20saude)
- 4. Orientação Normativa para Elaboração de Teses. Coordenação**
Lydia Masako Ferreira; organização Saul Goldenberg ... [et al];
colaboradores Leila Blanes, José Luis Gonçalves Bretos – São
Paulo: Livraria Médica Paulista Editora, 2008. Guia prático.

Abstract

Introduction: Several cases of delayed bone consolidation in fractures treated with shock waves for bone healing are related in scientific literature. Some of these studies point to a key role of Glycosaminoglycans extracellular matrix in the osteogenesis process. **Objective:** Sulfated Glycosaminoglycans (GAGs) and Hyaluronic Acid (HA) distinguish and quantification in rat femurs, after bone drilling and shock waves. **Methods:** The study included 50 male *Wistar* rats, aged three months and 300g weighted. These animals were divided in two groups, both submitted to bone drilling, but only one of them treated with shock wave. All rats were sacrificed by euthanasia in different days after bone drilling: third, seventh, 14th, 21th and 28th days. The glycosaminoglycans were analysed by agarose gel electrophoresis, migration bands densitometry and by *ELISA*-like test. **Results:** Sulfated glycosaminoglycans statistically significant increased since the third day group to the 28th day group, with chondroitin sulfate predominance. The hyaluronic acid statistically significant increased in the third day group treated with shock waves compared with control group. **Conclusion:** The application of shock waves in perforated femurs of rats stimulated the expression of sulfated glycosaminoglycans during bone repair and expression of hyaluronic acid in the group three days in the control group.

Anexo 1

São Paulo, 6 de março de 2009.
CEP 0048/09

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a) PAULO ROBERTO DIAS DOS SANTOS
Co-Investigadores: Valquiria Pereira Medeiros, Flavio Faloppa (Orientador)
Disciplina/Departamento: Ortopedia e Traumatologia da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo
Patrocinador: Recursos Próprios.

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: “**Comportamento dos GAGs na regeneração óssea após a aplicação de terapia por ondas de choque em ossos longos de ratos**”.

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: EXPERIMENTAL - CATEGORIA C - ESTUDO CRÔNICO.

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: Não se aplica - experimental.

OBJETIVOS: O projeto visa estudar de forma detalhada e específica a ação da terapia por ondas de choque sobre a reparação da matriz óssea neoformada buscando analisar as possíveis alterações no comportamento dos glicosaminoglicanos sulfatados realizando para isso a extração, caracterização e quantificação destes GAGs no processo de regeneração nos ossos longos de ratos submetidos à perfuração cirúrgica e terapia por ondas de choque; analisar a matriz óssea nos ossos longos de ratos submetidos à perfuração cirúrgica e terapia por ondas de choque por meio de imunomarcagem de componentes específicos da matriz extracelular..

RESUMO: Serão utilizados 80 fêmures de 40 ratos machos da linhagem Wistar com 3 meses de idade. Os animais serão obtidos e manipulados no Biotério do INPAR que possui as condições necessárias para tal manipulação. O anestésico utilizado será Ketamina-xilazina e a eutanásia será através de câmara de CO₂..

FUNDAMENTOS E RACIONAL: Fundamentação adequada.

MATERIAL E MÉTODO: Materiais e métodos adequadamente descritos.

DETALHAMENTO FINANCEIRO: Sem financiamento externo.

CRONOGRAMA: 24 meses.

OBJETIVO ACADÊMICO: Doutorado.

ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: **01/03/10 e 01/03/11**.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU e APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.

3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,



Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

0048/09

Fontes Consultadas

Biblioteca Virtual em Saúde – www.bireme.br

ISI Web of Knowledge - www.isiofknowledge.com

PubMed – www.pubmed.gov

SciELO – Scientific Eletronic Library Online – www.scielo.br