



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

**ANÁLISE DOS EFEITOS DAS MICRO-ONDAS SOBRE OS NÍVEIS SÉRICOS DA
FOSFATASE ALCALINA NO REPARO DE FRATURA EXPERIMENTAL DO
FÊMUR DE RATOS**

MACAPÁ
2013

DENILSON HENRIQUE SILVA DE MIRANDA

**ANÁLISE DOS EFEITOS DAS MICROONDAS SOBRE OS NÍVEIS SÉRICOS DA
FOSFATASE ALCALINA NO REPARO DE FRATURA EXPERIMENTAL DO
FÊMUR DE RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Amapá com a finalidade de Obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde. Área de concentração: Ensaios Biológicos.

Orientador: Prof. Dr. José Wagner Cavalcante Muniz

MACAPÁ

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá

537.5344

M672a Miranda, Denilson Henrique Silva de.

Análise dos efeitos das micro-ondas sobre os níveis séricos da fosfatase alcalina no reparo de fratura experimental do fêmur de ratos / Denilson Henrique Silva de Miranda -- Macapá, 2013. 55 f.

Dissertação (mestrado) – Fundação Universidade Federal do Amapá, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. José Wagner Cavalcante Muniz

1. Micro-ondas. 2. Ondas eletromagnéticas. 3. Fosfatase alcalina. 4. Fraturas. 5. Osteoblastos. I. Muniz, José Wagner Cavalcante, orient. II. Fundação Universidade Federal do Amapá. III. Título.

Dedico este trabalho a todas as pessoas que, de alguma forma, me auxiliaram na árdua tarefa de produzir, pois, se não existe produção sem dor, também existem anjos que estendem as mãos e nos ensinam a voar. São eles: Minha companheira Selma Silva Miranda que compreendeu a minha ausência em muitos momentos e, em outros, foi comigo até o trabalho de campo; aos meus filhos Gabriella, Pedro e Daniella que me serviram de inspiração nos momentos em que pensei em fraquejar; aos meus pais Raimundo Batista Miranda e Lindalva Silva Miranda que me inspiraram confiança e me estimularam a continuar no caminho dos estudos. Aos meus irmãos e sobrinhos por fazerem da vida uma grande alegria.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me proporcionou a oportunidade de vivenciar o mundo da experimentação científica, conhecendo pessoas e absorvendo conhecimentos.

Ao orientador Professor Dr. José Wagner Cavalcante Muniz, por acreditar em mim e me auxiliar de forma serena no desenvolvimento do trabalho.

À professora Dr^aJocivânia Oliveira que gentilmente cedeu o Laboratório de Toxicologia da Universidade Federal do Amapá – UNIFAP, onde foram executados os experimentos.

Aos acadêmicos de farmácia Camila, Leide, Chayane, Gabriella, Alberto, Felipe e Rafael pelo auxílio nos cuidados com a alimentação e manutenção de um ambiente limpo para os animais.

À professora Ana Rita Barcessat pela sua presteza e disposição em ajudar sempre que foi solicitada.

Aos professores Manoel Gionovaldo Freire Lourenço e Alessandra Azevedo pelas importantes observações no período de qualificação do trabalho.

Ao amigo Benedito Júnior que esteve comigo durante grande parte desse processo de construção do conhecimento, sendo de grande valia o seu conhecimento prático e sua objetividade no trato com os animais.

RESUMO

MIRANDA, D.H.S Análise dos efeitos das Micro-ondas sobre os níveis séricos da Fosfatase Alcalina no reparo de fratura experimental do fêmur de ratos. Dissertação apresentada à Universidade Federal do Amapá - UNIFAP para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

As Micro-ondas podem ser definidas como radiações eletromagnéticas não ionizantes utilizadas como um eficiente meio de produção de calor profundo, com efeitos terapêuticos bem definidos sobre os tecidos moles, como músculos e tendões, e pouco conhecidos sobre o metabolismo do tecido ósseo. O presente estudo tem por objetivo avaliar a atividade osteoblástica em ratos submetidos à fratura experimental do fêmur através da dosagem da enzima fosfatase alcalina, onde foi realizada fratura experimental do fêmur direito de 30 ratos *Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia* machos com idade aproximada de doze semanas e peso entre 200 e 300 gramas e que foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos denominados Grupo Diatermia GD (N=15) e Grupo Controle GC (N=15). Os animais do grupo Diatermia sofreram irradiação com Microondas a 2450 MHz de frequência e Potência entre 50 e 60% da capacidade máxima do equipamento, por um período de 8 minutos, durante 07, 14 e 20 dias seguidos e o grupo Controle foi manipulado igualmente, porém sem que o equipamento emissor das micro-ondas estivesse ligado. Mediante coleta sanguínea analisou-se os níveis séricos da FA. Concluiu-se que não houve diferença estatisticamente significativa no nível de fosfatase alcalina medido entre os grupos em diferentes momentos da pesquisa ($p = 0,613$) com os parâmetros utilizados para essa amostra.

Palavras-Chaves: Micro-ondas. Fratura. Osteoblastos. Fosfatase.Alcalina.

ABSTRACT

The Microwave can be defined as non-ionizing electromagnetic radiation used as an efficient means to generate deep heat with well-defined therapeutic effects on the soft tissues such as muscles and tendons, and little known about the metabolism of bone tissue. The present study aims to evaluate the osteoblastic activity in rats subjected to experimental fracture of the femur through the measurement of the enzyme alkaline phosphatase, which was conducted experimental fracture of the right femur of 30 rats *Rattus norvegicus albinos*, Rodentia mammalia males aged approximately twelve weeks and weighing between 200 and 300 grams and were randomly divided into two groups: Group Diathermy GD (N =15) and control group CG (N=15). Group animals were irradiated with microwave diathermy 2450 MHz in frequency and power between 50 and 60% of the maximum capacity of equipment for a period of 8 minutes at 07, 14 and 20 consecutive days and the control group also was manipulated, but without the machine emitter of microwave was turned on. By collecting blood analyzed serum levels of FA. It is concluded that there was no statistically significant difference in the level of alkaline phosphatase measured between groups at different times of the study ($p = 0.613$) with the parameters used for this sample.

Keywords: Microwave.Fracture.Osteoblasts.alkaline phosphatase.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01:** Esquema demonstrando os componentes de um equipamento de geração de micro-ondas com as frequências e comprimentos de onda terapêuticos 15
- Figura 02:** Ilustração demonstrando a penetração e a absorção das micro-ondas nos tecidos (pele, tecido subcutâneo, gordura e osso) 16
- Figura 03:** Ilustração esquemática da rotação de dipolos elétricos 17
- Figura 04:** Foto do equipamento de Micro-ondas e do animal em tratamento 33
- Figura 05:** Foto do animal sedado posicionado no aparelho fraturador 34
- Figura 06:** Conjunto de fotos demonstrando o processo de criação do equipamento imobilizador utilizado no experimento 35
- Figura 07:** Gráfico do nível de Fosfatase Alcalina segundo o grupo e o número de dias após o início do experimento 42
- Figura 08:** Gráfico da Raiz quadrada do nível de fosfatase alcalina segundo o grupo e o número de dias após o início do experimento 43

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Valores de mínimo, máximo, média e desvio padrão para o nível de fostatase alcalina segundo o grupo e o número de dias após o início do experimento em que o exame foi realizado 41

Tabela 2: Valores de mínimo, máximo, média e desvio padrão para a raiz quadrada do nível de fostatase alcalina segundo o grupo e o número de dias após o início do experimento em que o exame foi realizado 42

Tabela 3: Resultado da Análise de Variância de dois fatores para a raiz quadrada do nível de fostatase alcalina 44

LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS E SÍMBOLOS

A⁵ - A gama

°C – Graus Celsius

CO₂ – Dióxido de Carbono

cm - Centímetro

COBEA – Colégio Brasileiro de experimentação animal

EGF – Fator de crescimento Epidermal

FA – Fosfatase Alcalina

FAMA – Faculdade de Macapá

FAO – Fosfatase Alcalina óssea

FCA – Departamento Federal de Comunicações dos estados Unidos da América

FDA – Food and drug Administration

FGF – Fator de crescimento Fibroblástico

g - Grama

GC -Grupo Controle

GD – Grupo Diatermia

GM- CFU – Célula granulócito-macrófago

HPS – Heat shok proteins

kg – kilograma

LACEN – Laboratório Central de Saúde Pública do Estado do Amapá

MHZ – Mega Hertz

mA^o- Mili ampere

mm – Milímetros

mg – Miligramas

mg/kg – Miligramas/kilograma

n – Número de animais

PDGF – Fator de crescimento derivado das Plaquetas

PEMF - Campos eletromagnéticos Pulsados

rpm – Rotação por minuto

TGF- α – Fator de crescimento transformador Alfa

U/L- Unidade/ litro

UNIFAP – Universidade Federal do Amapá

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	14
2.1 NATUREZA DAS MICRO-ONDAS	14
2.2 PRODUÇÃO DAS MICRO-ONDAS	14
2.3 ABSORÇÃO DAS MICRO-ONDAS PELOS TECIDOS	15
2.4 EFEITOS FISIOLÓGICOS	16
2.4.1 Rotação de Dipolos	17
2.4.2 Vibração de Íons	17
2.4.3 Distorção da órbita de elétrons	17
2.5 DOSIFICAÇÃO	18
2.6 RESPOSTAS BIOLÓGICAS	19
2.6.1 Aumento da atividade metabólica	19
2.6.2 Aumento no aporte sanguíneo local	19
2.6.3 Analgesia	19
2.6.4 Aumento da extensibilidade do colágeno	20
2.6.5 Incremento da cicatrização	20
2.7 CONTRAINDICAÇÕES	21
2.8 TECIDO ÓSSEO	21
2.9 REPARO DE FRATURAS	23
2.9.1 Fase inflamatória	24
2.9.2 Fase de Cicatrização	24
2.9.3 Fase de Remodelação	25
2.10 A REPARAÇÃO ÓSSEA NO RATO	25
2.11 INTERAÇÃO TECIDOS X DIATERMIA POR MICROONDAS	26
3 JUSTIFICATIVA E PROBLEMATIZAÇÃO	27
3.1 A FOSFATASE ALCALINA COMO MARCADOR BIOQUÍMICO NO REPARO ÓSSEO	27
3.2 MICRO-ONDAS	28
4 OBJETIVOS	30
4.1 GERAL	30
4.2 ESPECÍFICOS	30
5 MATERIAL E MÉTODOS	31

5.1 CARACTERÍSTICAS DO ESTUDO	31
5.2 LOCAL DE REALIZAÇÃO	31
5.3 POPULAÇÃO E AMOSTRA	31
5.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO	31
5.4.1 Critérios de inclusão	31
5.4.2 Critérios de exclusão	32
5.5 APARATO EXPERIMENTAL	32
5.5.1 Preparação das gaiolas	32
5.5.2 Equipamento de Microondas	32
5.5.3 Aparelho Fraturador	33
5.5.4 Equipamento Imobilizador	34
5.5.5 Análise Radiológica	36
5.5.6 Material para Coleta Sanguínea	36
5.5.7 Anestesia	36
5.6 DESCRIÇÃO DO EXPERIMENTO	36
5.7 MÉTODO ESTATÍSTICO	38
5.8 AVALIAÇÃO DO RISCO X BENEFÍCIO DA PESQUISA	38
6 RESULTADOS	41
6.1 ANÁLISE DESCRITIVA	41
6.2 ANÁLISE DE VARIÂNCIA	43
6.3 ANÁLISE COMPLEMENTAR	44
7 DISCUSSÃO	45
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	47
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
ANEXOS	52

1 INTRODUÇÃO

Há muito o uso de agentes físicos e seus efeitos sobre o metabolismo ósseo tem sido objeto de diversas pesquisas publicadas na literatura mundial. Desde que a propriedade piezoelétrica foi descrita no tecido ósseo por Fukada e Iasuda em 1957, percebeu-se que o uso de energias elétrica e eletromagnética poderia influenciar os processos de formação e reabsorção ósseos.

Hoje, se conhece a ação benéfica de muitos agentes físicos sobre o tecido ósseo em recuperação, dentre os quais o ultrassom terapêutico de baixa intensidade que se destaca pela sua eficiência como ferramenta auxiliar no estímulo à osteogênese, no ganho de massa óssea e, conseqüentemente, na aceleração do reparo de fraturas em ossos saudáveis e osteoporóticos (LIRANI, 2005; GUERINO, 2008; LUBBERT, 2008; CHEUNG et al, 2011). O laser de baixa potência também tem sido descrito como um recurso eletroterapêutico importante na aceleração de consolidação de fraturas experimentais em modelos animais, porém sem ainda ter comprovação científica em humanos (LIRANI *apud* LUGER, FREITAS, E BARUSHKA, 2005).

As Micro-ondas se enquadram como uma forma de diatermia (do grego dia = através; therm = calor) que atinge os tecidos mais profundos, sem deixar de penetrar nos tecidos superficiais e podem ser definidas como radiações eletromagnéticas, não ionizantes, de alta frequência. Estão localizadas no espectro eletromagnético entre as radiações de ondas-curtas e as de lâmpadas infravermelhas. Seu espectro varia desde 300 MHz a 300 GHz (KITCHEN, 1998).

Em 1947, o Departamento Federal de Comunicações dos Estados Unidos referendou a conferência de *Atlantic City* que ordenou as faixas de radiofrequência e determinou o uso de três faixas terapêuticas para o uso de micro-ondas, sendo elas 433,92MHz; 915MHz e 2450MHz (AGNE,2005).

Recentemente tem-se visto a disseminação do uso das micro-ondas na preparação de alimentos e nos sistemas de comunicação, porém o seu uso terapêutico ainda é pouco conhecido da maioria das pessoas (KITCHEN, 1998).

As Micro-ondas são usadas na prática fisioterapêutica pelo seu conhecido efeito térmico-analgésico; Segundo Low e Reed (2001) estas radiações são indicadas para aquecimento superficial de tecidos como músculos e articulações superficiais como o punho e face anterior do joelho. Em pesquisas com cachorros

conseguiu-se comprovar um aumento substancial na temperatura intramuscular e um aumento no aporte sanguíneo cerca de 85% (LOW e REED, 2001 *apud* RICHARDSON).

Para Agne (2005) o efeito terapêutico das micro-ondas se apoia em sua ação vasodilatadora “que atua tanto movimentando os agentes inflamatórios quanto possibilitando o aporte de substâncias reparadoras” e tem um efeito de estímulo à formação de novos tecidos.

A elevação da temperatura decorrente da aplicação das micro-ondas se deve ao aumento na elevação do movimento iônico nos tecidos, da rotação de dipolos e do movimento de distorção molecular, este último menos importante (LOW e REED, 2001) e, acredita-se, que esse aumento na temperatura, determine os efeitos terapêuticos tais como o alívio da dor, redução no espasmo muscular, efeito sedativo, aumento de amplitude articular decorrente do aumento na extensibilidade do colágeno induzida por temperaturas mais elevadas (LOW e REED, 2001).

A vasodilatação produzida pelas micro-ondas podem ainda produzir um efeito de aumento de edema e perpetuação da inflamação quando aplicado nas fases agudas da lesão e dessa forma provocar aumento no quadro algico (AGNE, 2005).

Segundo Kitchen (1998) a fim de gerenciar os riscos inerentes ao uso de radiação eletromagnética foram criados padrões de exposição por entidades internacionais como o Departamento de Saúde e Bem-Estar do Canadá (1983), o Conselho Nacional de Proteção contra a radiação (1989) e a Associação de Padronização da Austrália (1992).

Dentre as precauções e contraindicações à terapêutica com micro-ondas tem-se a aplicação em estágios agudos de inflamação (antes de 48 horas pós-traumatismo), a aplicação na região dos olhos, testículos, período gestacional, crianças e idosos, implantes metálicos, áreas hemorrágicas e com edemas e marca-passos cardíacos (MACHADO, 1991).

Dessa forma, faz-se necessária criteriosa investigação a fim de esclarecer se há e quais os reais efeitos que a elevação da temperatura provocada pela exposição às micro-ondas, promove sobre o tecido ósseo em processo de reparo de fratura.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 NATUREZA DAS MICRO-ONDAS

As micro-ondas são correntes eletromagnéticas de alta frequência, não ionizantes, cujo comprimento de onda autorizado para terapia é de 12 cm e sua frequência de 2450 MHz. Porém, existem ainda outras duas frequências com emprego terapêutico, sendo estas de 433,92 MHz e 915 MHz (AGNE, 2005). Portanto não se pode utilizar de forma terapêutica equipamentos que emitam em diferentes frequências, conforme, regulamenta o Departamento Federal de Comunicações dos Estados Unidos da América (FCA) (GIOMBINNI, 2007).

2.2 PRODUÇÃO DAS MICRO-ONDAS

As micro-ondas são formadas pela oscilação em alta frequência de correntes elétricas, conseguidas por meio de um dispositivo denominado Magnétron, que gera correntes oscilantes diretamente do movimento de alta velocidade dos elétrons. Essas correntes são canalizadas ao longo de um cabo coaxial, que por sua vez deve possuir capacitância apropriada, até a antena, responsável por emitir a radiação em determinada direção e com feixe mais convergente quanto for possível (LOW e REED, 2001).

A saída da energia do equipamento pode ser controlada variando o suprimento de potência para o Magnétron. Embora os equipamentos disponíveis no mercado possuam controles de intensidade e medidores de saída de energia, estes não refletem objetivamente o grau de aquecimento de um tecido (LOW e REED, 2001). Na prática a potência é sempre determinada de acordo com a referência subjetiva de calor pelo paciente.

<i>Frequência (MHz)</i>	<i>Comprimento de onda (cm)</i>
2450	12,245
915	32,79
433,9	69,14

Na Europa são usadas as três frequências; nos Estados Unidos, apenas as duas primeiras.

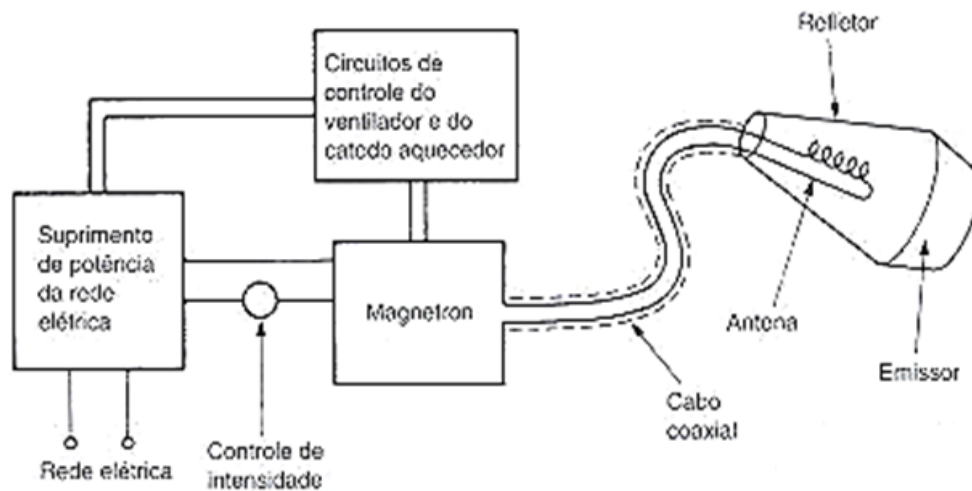


Figura 01- Esquema demonstrando os componentes de um equipamento de geração de micro-ondas. Acima as frequências e comprimentos de onda terapêuticos Adaptada de Low e Reed, (2001. p 356).

2.3 ABSORÇÃO DAS MICRO-ONDAS PELOS TECIDOS

Como todas as ondas eletromagnéticas, as micro-ondas, quando em contato com a superfície dos tecidos corporais, podem ser: 1. Absorvidas, isto é, a energia radiante é absorvida pelos tecidos; 2. Transmitida, ou seja, passam pelos tecidos sem serem absorvidas; 3. Refratadas, isto é, tem sua direção de propagação alterada, divergindo ou convergindo; e 4. Refletidas, ou seja, retornam à superfície (KITCHEN, 1998).

Segundo Low e Reed (2001) as micro-ondas sofrem importante reflexão na interface ar-pele, pele-gordura e gordura-músculo, podendo alcançar um percentual de 50 a 75% de radiação refletida, para os equipamentos de 2450 MHz, dependendo da espessura dos tecidos. Agne (2005) reforça afirmando que na interface ar-pele (coeficiente de reflexão de 0,56) mais da metade da energia irradiada é refletida, ocorrendo penetração de apenas 44% da radiação na pele.

Importante salientar que a propriedade de absorção das ondas eletromagnéticas é inversamente proporcional à sua penetração, ou seja, a

capacidade de absorção da energia cai exponencialmente à medida que aumenta a sua penetração (Fig. 2) (LOW e REED, 2001).

Para Agne (2005) a penetração e a absorção das micro-ondas nos tecidos dependem de três fatores fundamentais, a saber: 1 - do comprimento de onda, ou seja, em menores comprimentos de onda (maior frequência) a penetração diminui; 2 - da condutividade do meio absorvente. Isso quer dizer que quanto mais rico em água for o tecido, maior a absorção e menor a penetração da irradiação e 3 - da espessura do tecido gorduroso, uma vez que a absorção é menor na gordura. Se a espessura do tecido gorduroso subcutâneo for superior a 02 cm os tecidos localizados abaixo desse ponto não aquecem suficientemente.

Segundo Kitchen (1998) o aquecimento promovido pelas micro-ondas sobre os tecidos menos hidratados, como a gordura, é reduzido, pois esta se constitui de moléculas apolares. No tecido ósseo há grande reflexão das micro-ondas quando em contato com a superfície deste. Este efeito pode ser benéfico quando se considera a aplicação em articulações periféricas, pois os tecidos adjacentes se beneficiariam dessa energia refletida.



Figura 02: Absorção das micro-ondas pelos tecidos Adaptada de Agne, J.E. (2005.p.267)

2.4 EFEITOS FISIOLÓGICOS

Os efeitos fisiológicos decorrentes da aplicação da diatermia por micro-ondas. São, principalmente, obtidos pelo aquecimento dos tecidos. Em um estudo realizado para medir os padrões de aquecimento de várias modalidades terapêuticas em uma coxa humana, a diatermia por micro-ondas alcançou uma profundidade de aquecimento de 01 a 04 cm para uma frequência de 915 MHz e de 1,8 cm para uma frequência de 2450 MHz (GIOMBINNI, 2007 *apud* GUY *et al*).

O aquecimento tecidual decorre de três fenômenos assim descritos:

2.4.1 Rotação de Dipolos

Esse fenômeno está relacionado à movimentação das moléculas de água (dipolos) que constituem os tecidos. Segundo Low e Reed (2001) sempre que moléculas polares como a água são submetidas a cargas que se revertem rapidamente. Elas apresentam contínuo movimento rotacional que produz energia e perturba as moléculas adjacentes. Estas, por sua vez, também desenvolvem movimento aleatório rotacional, aumentando a temperatura do tecido.

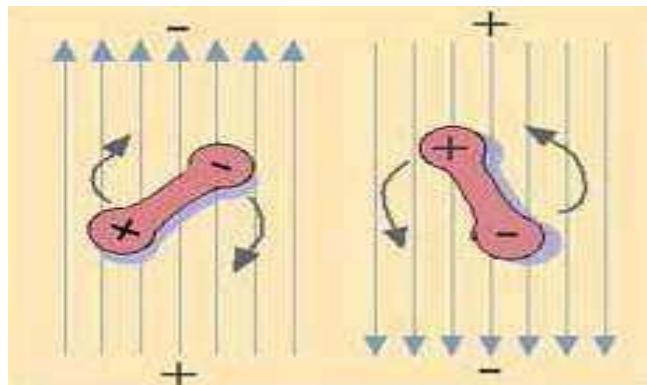


Figura 03 Rotação de dipolos: moléculas de água em movimentos de giro sob influência de campo elétrico alternado. www.albertomonteiro.com.br/materiais/micro-ondas.pdf.

2.4.2 Vibração de Íons

A grande quantidade de íons presentes nos tecidos é acelerada de um modo e depois de outro modo devido à presença de um campo eletromagnético que se alterna, mudando de direção continuamente. Esses íons colidem uns contra os outros, e liberam energia para eles de forma que isso promove aumento na quantidade de movimentação dos íons e maior produção de calor no tecido (LOW e REED, 2001).

2.4.3 Distorção da órbita de elétrons

Esse mecanismo tem menor efeito na produção de calor. Consiste em uma mudança no percurso dos elétrons que constituem as moléculas dos tecidos em

virtude da rápida mudança de direção das correntes. À medida que o campo elétrico muda de direção um lado se torna mais positivo, atraindo a nuvem de elétrons, e outro mais negativo, repelindo a nuvem de elétrons. Esse fenômeno não chega a causar movimento das moléculas, mas alguma forma de interação com as moléculas vizinhas que leva a movimento aleatório e produção de calor (LOW e REED, 2001).

2.5 DOSIFICAÇÃO

A dosagem efetiva da aplicação terapêutica da diatermia por micro-ondas depende de fatores como: potência de emissão do aparelho; distância do aplicador com a superfície e a lei do co-seno; tempo de duração do tratamento e sensação subjetiva de calor referida pelo paciente (AGNE, 2005). Existem algumas escalas de dosagens que facilitam a aplicação de agentes térmicos tais como a escala de Delpizzo e Joyner baseada sempre na sensação subjetiva de calor, conforme quadro 01 abaixo:

Quadro 01: Escalas de dosagem.

DOSE	INTENSIDADE	SENSAÇÃO TÉRMICA
I	BAIXA	NÃO HÁ SENSAÇÃO TÉRMICA
II	MÉDIA	SENSAÇÃO TÉRMICA TÊNUE
III	ALTA	PERCEPÇÃO DE CALOR MODERADA

A recomendação de Agne (2005) para a dosagem da diatermia por micro-ondas é de que a aplicação deve ser mais intensa e mais duradoura quanto mais crônico for o quadro, evitando os estágios agudos e reduzindo o tempo de aplicação nos quadros subagudos. As afecções subagudas são tratadas por um tempo que varia de 5 a 15 minutos, alcançando os níveis I ou II da escala de Delpizzo e Joyner. Para alterações crônicas o tempo determinado é de 10 a 20 minutos com um nível III. Tempos inferiores há 5 minutos mostram-se insuficientes, assim como tempos maiores que 30 minutos (MORILLO, 2009).

2.6 RESPOSTAS BIOLÓGICAS

Dentre os efeitos biológicos que parecem ser decorrentes do aquecimento tecidual produzido pelas micro-ondas, destacam-se:

2.6.1 Aumento da atividade metabólica

O metabolismo tecidual pode ser aumentado pelo aumento da temperatura tecidual, segundo Low e Reed (2001). Tal aumento é da ordem de 13% para cada 1°C. Isto quer dizer que uma elevação de 4°C resultará em aumento de cerca de 60% da taxa metabólica (LOW E REED, 2001). Contudo, nos organismos vivos, as reações químicas ocorrem dentro de um intervalo de temperatura específico e sabe-se que temperaturas superiores a 45°C promovem desnaturação proteica.

2.6.2 Aumento no aporte sanguíneo local

Segundo Guyton (2002) o fluxo sanguíneo local aumenta proporcionalmente de acordo com o metabolismo tecidual local. Uma maior demanda local por oxigênio e nutrientes, por si, promove relaxamento dos vasos sanguíneos que irrigam determinados tecidos hiperativos. Dessa forma, o organismo consegue suprir as necessidades teciduais mais pontuais (teoria da demanda de nutrientes). Com a diatermia por micro-ondas um feixe de energia é dirigido para a área de aplicação e é absorvido pelos tecidos, principalmente por aqueles com maior conteúdo de água. A partir daí essa energia se transfere para os tecidos mais profundos como músculos e ossos, a uma profundidade aproximada de 3 cm (AGNE, 2005). Acredita-se que a terapia com micro-ondas promova vasodilatação local em resposta ao aumento do metabolismo tecidual dos tecidos aquecidos.

2.6.3 Analgesia

Segundo Giombinni (2007) duas hipóteses tentam explicar a alteração na resposta sensorial promovida pela hipertermia: a Hipótese metabólica e a Hipótese neurológica.

A Hipótese metabólica afirma que há intensa liberação de mediadores inflamatórios a partir da área de lesão, o que interromperia os estímulos para as terminações nervosas livres responsáveis pela dor aguda (terminações A δ).

A Hipótese neurológica preconiza que modificações na velocidade de condução nervosa associada a alterações no sistema de comportas de dor produzem analgesia. A dor crônica é conduzida por fibras não mielinizadas do tipo C e pode ser resultante da hiperexcitabilidade do sistema de condução dolorosa em nível da medula espinhal (dor neuroaxial). Estudos experimentais demonstraram diminuição na velocidade de condução nervosa dolorosa do nervo ciático em até 60 minutos após a aplicação de hipertermia. Essa redução na velocidade de condução nervosa pode indiretamente reduzir o conjunto de sinais aferentes que carregam os estímulos de dor, possibilitando uma redefinição do controle das comportas de dor ao nível da medula espinhal (GIOMBINNI, 2007).

2.6.4 Aumento da extensibilidade do colágeno

O aquecimento dos tecidos promove aumento momentâneo da extensibilidade do colágeno a uma faixa terapêutica de 40-45°C, porém isso só pode ocorrer se houver alongamento simultâneo do tecido (LOW e REED, 2001).

2.6.5 Incremento da cicatrização

Segundo Nelson (2003) a reparação de uma lesão ocorre em todos os órgãos e tecidos do corpo, exceto nos dentes, e obedece a uma progressão comum a esses tecidos, que pode ser dividida em fases: fase inflamatória, fase de reparação e fase de remodelamento, conforme já mencionado anteriormente.

Os processos anabolizantes tão necessários para a reparação tecidual requerem um pronto abastecimento de oxigênio e nutrientes, o que é possibilitado pela diatermia com micro-ondas que promove importante efeito de hiperemia local. Além disso, a hiperemia observada quando da terapia com micro-ondas leva a um extravasamento de substâncias e à migração para a área lesada de um maior número de macrófagos e granulócitos (GIOMBINNI, 2007).

Estudos demonstraram que a diatermia por micro-ondas aumenta a quantidade de uma proteína denominada HPS (*Heat shock proteins*) que evitam a

degradação de outras proteínas e promovem apresentação de peptídeos na superfície celular o que ajuda o sistema imune de reconhecimentos de células doentes (GIOMBINNI, 2007). Outro efeito importante é uma melhor drenagem tecidual que removem fluidos e restos necróticos, se presentes, reabsorvendo mais facilmente o hematoma.

2.7 CONTRAINDICAÇÕES

A utilização da diatermia por micro-ondas pode ser danosa, se aplicada sem critério e conhecimento técnico, devido ao risco do advento de lesões por superaquecimento (queimaduras) em tecidos profundos. Suas contraindicações mais conhecidas são: perda de sensibilidade, pacientes com deficiência mental, pacientes gestantes, regiões dos testículos e olhos, pacientes portadores de marca-passos cardíacos e crianças. Nos estados agudos de lesão tecidual o uso da diatermia por micro-ondas pode provocar aumento do quadro inflamatório e piora do quadro clínico (LOW e REED, 2001; AGNE, 2005).

2.8 TECIDO ÓSSEO

O tecido ósseo é um tipo de tecido conjuntivo especializado uma vez que possui matriz mineralizada, o que lhe confere grande rigidez e dureza. Tal característica é decorrente da interação entre seus componentes orgânicos (principalmente colágeno I) e inorgânicos como os íons cálcio e fosfato (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008).

A despeito de sua morfologia, que, em uma visão macroscópica, dá a ideia de um tecido inerte, o tecido ósseo é metabolicamente muito dinâmico e exerce importantes funções, dentre as quais estão a de ordem mecânica (sustentação e locomoção), metabólica (armazenamento de íons e manutenção da homeostase sérica) e de proteção a órgãos vitais (GIORDANO e KNACKFUSS, 2003).

As células que constituem o tecido ósseo são:

- CÉLULAS OSTEOPROGENITORAS

Localizadas na camada celular interna do periósteo, no endósteo e no revestimento dos canais de Havers, estas células derivadas do mesênquima embrionário podem diferenciar-se em osteoblastos e, em situações de baixa tensão de Oxigênio, podem dar origem a células condrogênicas. São mais ativas no período de crescimento ósseo (GARTNER, L.P. e HIATT, J.L, 2003).

- OSTEOLASTOS

Estas células são provenientes das células osteoprogenitoras e são responsáveis pela síntese do material orgânico da matriz óssea, principalmente colágeno tipo I, proteoglicanos e glicoproteicas. Os osteoblastos são bastante ativos nos períodos de formação de tecido ósseo imaturo como nas reparações de fraturas. Também participam da mineralização óssea, pois são capazes de concentrar fosfato de cálcio. Uma vez aprisionadas pela matriz calcificada, estas reduzem suas atividades produtivas e se tornam achatadas e com muitos prolongamentos citoplasmáticos, passando a se chamar OSTEÓCITOS (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008).

Durante a síntese de matriz óssea os osteoblastos produzem grande quantidade de substâncias como a Fosfatase Alcalina e a osteocalcina que são liberadas para a corrente sanguínea.

- OSTEOLASTOS

Os osteoblastos são células grandes, multinucleadas (podem conter até 50 núcleos) e móveis. Segundo Gartner (2003) acreditava-se antigamente que os osteoclastos seriam derivados dos monócitos do sangue, porém, estudos mais recentes evidenciam que essas células têm um precursor em comum com os monócitos denominado célula granulócito-macrófago (GM-CFU). Estas células precursoras, quando na presença de osso, fundem-se e dão origem aos osteoclastos.

Os osteoclastos são responsáveis pela reabsorção do osso, sendo importantes no processo de remodelação óssea após o reparo de uma fratura. Estas células devem sofrer apoptose após desempenharem a sua função (Gartner, 2003).

2.9 REPARO DE FRATURAS

O tecido ósseo apresenta grande potencial para o reparo de injúrias, sendo capaz de regenerar fraturas ou mesmo defeitos locais através da reconstrução de um novo tecido com as mesmas características estruturais do tecido anterior, sem a formação de cicatriz (AMADEI, 2006).

Tão logo, ocorra uma lesão óssea, uma sequência de eventos se sucede para que se inicie o reparo do osso. Muitos desses mecanismos ainda não estão totalmente elucidados. Porém, há evidências suficientes que indicam a intensa liberação de fatores de crescimento e citocinas no local como mecanismo de ativação desse reparo (AMADEI, 2006).

Os mecanismos fisiológicos envolvidos no reparo das fraturas são os mesmos que atuam na cicatrização das feridas. É dirigido pelo recrutamento e migração de agregados de células que, em resposta a estímulos, diferenciam-se para formar novo tecido ósseo.

Schwartzmann (2003) divide didaticamente a consolidação de uma fratura em seis etapas sucessivas, lembrando que essa divisão não é rígida, “podendo variar de uma fratura para outra em um mesmo ou em diferentes indivíduos e de uma região para outra em uma mesma fratura”. Sendo elas: fase de hemorragia (período imediato até alguns dias após a fratura), fase inflamatória (dois dias após a fratura), fase de formação do tecido de granulação (2 a 12 dias após a fratura), fase de calo mole (primeira semana após a fratura), fase de calo duro (iniciada após a primeira semana de fratura e perdurando até vários meses após a fratura) e fase de remodelação (se estende por vários meses a anos).

Para Landa (2005) a reparação de um tecido ósseo fraturado deve obedecer a três etapas sucessivas, mas que podem coexistir, com predomínio de uma ou outra: a etapa inflamatória, a etapa de cicatrização e a etapa de remodelação.

Segundo Croci (2004) o modelo habitualmente utilizado para o estudo da consolidação óssea é baseado em uma fratura fechada de diáfise de osso longo, já que os mesmos princípios de reparo podem se estender para todas as fraturas. Segundo este autor a consolidação pode ser dividida em três fases segundo as suas características morfológicas: fase inflamatória inicial, fase reparativa e fase de remodelação. Cada fase tem duração variável dependendo de diversos fatores como a idade e a espécie do animal.

2.9.1 Fase inflamatória

Há rompimento dos vasos sanguíneos com extravasamento de eritrócitos, fibrina e plaquetas que liberam fatores quimiotáticos como PDGF (fator de crescimento derivado das plaquetas) do inglês *plateled derived growth factor* que é quimiotático para macrófagos e fibroblastos, FGF (fator de crescimento fibroblástico) ou *fibroblast growth factore* TGF-alfa (fator de crescimento transformador alfa). Estes fatores tem quimiotaxia para macrófagos, fibroblastos, osteoblastos e induzem a mitose celular de células endoteliais e condrócitos, além de promover angiogênese. Macrófagos fagocitam o coágulo rico em restos celulares e substâncias estranhas. Há necrose tecidual do tecido adjacente à fratura, o que estimula intensa reação inflamatória com vasodilatação, exsudação de plasma, leucócitos e células mesenquimais multipotenciais (AMADEI, 2006). Clinicamente coincide com o aparecimento de inchaço, rubor e dor e termina quando estes sinais desaparecem (SLADE, J.F e CHOU, K.H, 1998).

2.9.2 Fase de Cicatrização

No 3° ao 5° dia após a fratura, o periósteo e o endósteo proliferam-se intensamente, formando um tecido conjuntivo muito rico em células osteogênicas que se projeta em forma de um colar em torno da fratura e penetra entre as extremidades ósseas fraturadas. Células mesenquimais multipotenciais migram e dão origem a novos vasos que permeiam o hematoma. Acredita-se que a hipóxia tecidual e a grande concentração de quimiotáticos como o PDGF, FGF e EGF (fator de crescimento epidermal) sirvam como estímulos à angiogênese (AMADEI, 2006). Tal proliferação celular dá origem a um tecido conjuntivo fibroso com presença de fibroblastos e condrócitos que envolve a fratura, denominado “calo mole”. Os osteoblastos localizados no interior do calo mole produzem matriz óssea e colágeno, dando origem a um tecido denominado tecido osteóide. Com o decorrer dos dias, o tecido osteóide imaturo vai sofrendo mineralização dando origem ao “calo duro”, ou calo ósseo primário. Essa fase já é evidente após a primeira semana de fratura e pode durar vários meses (SCHWARTSMANN, 2003).

2.9.3 Fase de Remodelação

A remodelação é definida como um processo de aposição no qual há remoção localizada do osso antigo (reabsorção) e substituição por osso recentemente formado (AMADEI, 2006).

A remodelação é um processo fisiológico que ocorre constantemente, sendo responsável pela renovação do esqueleto a fim de manter a sua integridade física e estrutural, onde a interação entre a reabsorção de tecido ósseo pelos osteoclastos e sua produção pelos osteoblastos é marcante. É influenciada por fatores variados como a ação de alguns hormônios, fatores intracelulares e fatores externos. O processo de remodelação é o responsável pelo sumiço do calo ósseo após a resolução das fraturas (AMADEI, 2006).

2.10 A REPARAÇÃO ÓSSEA NO RATO

O tecido ósseo do rato é constituído de osso primário com estrutura lamelar sem o sistema de Havers que caracteriza o osso humano, porém a semelhança fisiológica do reparo de uma fratura entre as duas espécies o habilita para a realização de estudos (KUPCZICK, 2008).

O reparo ósseo no rato pode ser dividido em 4 fases, segundo Udupa e Prasad (1963): fase fibroblástica, fase de produção de colágeno, fase osteogênica e, por último, a fase de remodelação.

A primeira semana de fratura caracteriza a fase fibroblástica que é marcada pela proliferação de fibroblastos provenientes do perióstio seguida de proliferação de condroblastos e osteoblastos. A fase de produção de colágeno se inicia na segunda semana onde há produção intensa de fibras colágenas pelos osteoblastos presentes. Essas fibras se depositam nos espaços entre os fragmentos ósseos. Nas terceira e quarta semanas há proliferação dos condroblastos e posteriormente diferenciam-se em osteoblastos que continuam a síntese de matriz óssea. A fase de remodelação em geral se inicia na sexta semana quando o excesso de matriz é reabsorvido pela ação dos osteoclastos.

2.11 INTERAÇÃO TECIDOS X DIATERMIA POR MICROONDAS

Segundo Morillo (1998) a penetração e a absorção das Micro-ondas nos tecidos dependem fundamentalmente de três fatores:

1. Comprimento de Onda – Quanto menor o comprimento de onda (aumento da frequência) menor a penetração;
2. Conteúdo de água nos tecidos - Quanto mais hidratado for o tecido melhor a sua condutividade elétrica, facilitando a absorção da radiação;
3. Espessura do tecido subcutâneo – O tecido celular subcutâneo espesso (superior a 02 cm) dificulta a penetração e a absorção da radiação.

Teoricamente as micro-ondas podem passar através de um osso sólido. Porém, isso pode causar o surgimento de ondas estacionárias devido ao processo de reflexão destas. No entanto, isso pode ser de importância clínica uma vez que as ondas refletidas devem alcançar os tecidos adjacentes (MORILLO, 1998).

Os estudos acerca das diatermias são produzidos na grande maioria dos casos utilizando a diatermia por ondas-curtas e ainda assim tais estudos relatam são direcionados principalmente aos tecidos muscular e tendinoso, tendo Giombinni (2007) relatado com exatidão a eficácia e a segurança desse método termoterapêutico nas injúrias musculares e tendinosas. No que tange aos estudos relativos às diatermias e seus efeitos sobre o tecido ósseo, pouco se tem de produção científica.

Giombini (2007), afirma que a hipertermia produzida pela terapia com micro-ondas pode estimular processos de reparação tecidual, aumentando a efetividade das drogas, permitindo alívio mais eficiente da Dor. Além disso, induz à hiperemia, melhorando a drenagem tecidual local; promove ainda aumento na taxa metabólica e induz alterações na membrana celular.

3 JUSTIFICATIVA E PROBLEMATIZAÇÃO

3.1 A FOSFATASE ALCALINA COMO MARCADOR BIOQUÍMICO NO REPARO ÓSSEO

O Reparo de uma fratura envolve uma sequência ordenada de eventos fisiológicos que demandam um determinado tempo para que se restabeleça a estrutura óssea inicial.

A fim de criar mecanismos que pudessem acelerar o reparo ósseo, diversos estudos recentes utilizando recursos eletrotermofototerapêuticos foram desenvolvidos (GIORDANO, 2005; LANDA, 2005; GUERINO, 2008; FONTES-PEREIRA, 2013).

Os marcadores bioquímicos de formação e reabsorção óssea têm sido comumente usados objetivando não somente o diagnóstico de patologias ósseas, mas também o prognóstico do reparo de fraturas (LEUNG, 1993; PASKALEV, 2005; DINIZ, 2007; SOUSA, 2011; AJAI, 2013).

A Fosfatase Alcalina Total (FA) contida no soro é resultante do somatório de várias isoenzimas provenientes dos ossos, fígado, intestino e placenta, durante a gravidez. Seus níveis tendem a aumentar no período de formação de matriz colágena, durante o crescimento, refletindo a maior atividade osteoblástica, ou em casos de doenças ósseas ou hepáticas (VIGNOCHI, 2011).

Langlois et al (1994) afirma que aumentos nos níveis de FA sugere aumento da atividade osteoblástica.

Em um estudo de Volpin (1986) a atividade da fosfatase alcalina foi detectada na membrana celular de condrócitos de ossos longos de ratos submetidos à fratura experimental, sugerindo uma associação funcional estreita entre a atividade da fosfatase alcalina e a calcificação no processo de cicatrização da fratura.

Segundo Saraiva (2002) elevações nos níveis séricos desta enzima podem sugerir doenças ósseas como a Doença de Paget, Osteomalácia e Raquitismo ou presença de fraturas em fase de reparo, sendo um marcador bioquímico satisfatório para a formação de tecido ósseo.

A isoforma óssea, produzida pelos osteoblastos ativos, é predominante na infância, porém na vida adulta há prevalência da isoforma hepática. Essas duas

isoformas correspondem a mais de 90% de toda a fosfatase circulante (SARAIVA, 2002).

Komnennou et al (2005) afirma que as análises seriadas da fosfatase alcalina no período de reparo de fratura pode ser uma ferramenta adicional na previsão do risco de desenvolvimento de pseudoartrose ou retardo na consolidação.

Segundo Ajai et al(2013) a fosfatase alcalina pode ser útil como biomarcador sugestivo de formação óssea na avaliação do progresso de consolidação de fraturas em diáfises de ossos em pacientes adultos, uma vez que somente as análises radiográficas tem margem de erro significativa para diagnóstico de situações como retardo de consolidação ou mesmo pseudoartrose. Além disso, a utilização de técnicas mais eficientes como a cintilografia estão limitadas aos centros tecnologicamente mais avançados.

3.2 MICRO-ONDAS

O aumento da temperatura de determinado segmento corporal, promovido pelas radiações eletromagnéticas, como é o caso das micro-ondas, Tem repercussões benéficas e é bastante utilizado como mecanismo terapêutico, principalmente pelos efeitos analgésicos, aumento do suprimento sanguíneo local, redução do espasmo muscular, efeito sedativo, aumento da extensibilidade dos tecidos, dentre outros efeitos (LOW e REED, 2001).

Os efeitos terapêuticos são atingidos quando o tratamento com micro-ondas promove elevação da temperatura tecidual local entre a 41,5 e 45°C (GIOMBINI,2007).

Segundo Agne (2005), os principais efeitos da terapia com micro-ondas estão relacionado aos efeitos térmicos que, tanto mais elevados são, quanto mais água contém o tecido, sendo o tecido muscular o mais susceptível à ação destas radiações.

A despeito dos benefícios já citados, o uso terapêutico das diatermias tem diminuído consideravelmente nos últimos dez a quinze anos. Prentice (2010) levanta a hipótese de que a dificuldade no uso destas técnicas esteja na ausência de tecnologia atual que possa minimizar a interferência da frequência do rádio, na falta de informações de dosimetria e relatórios das várias contraindicações a ela atribuídas.

A *Food And Drug Administration* (FDA) que controla a produção de Alimentos e Medicamentos nos Estados Unidos, assim como os dispositivos médicos, considera que a segurança e a eficácia dos dispositivos de Diatermia (incluindo as ondas curtas e as Micro-ondas) estão relacionadas unicamente aos seus efeitos térmicos, e que, embora alguns pesquisadores considerem a presença de efeitos não térmicos, esses ainda não são comprovados cientificamente, sendo necessárias pesquisas com tecnologias mais avançadas para que se comprovem tais efeitos (DAVIS,1979).

Decerto ainda são necessários estudos que tragam luz a diversas questões que envolvem as diatermias e seus efeitos sobre o tecido ósseo. Dessa forma, justifica-se este estudo que procura avaliar através do marcador bioquímico Fosfatase Alcalina, a possível atividade osteoblástica no reparo de fraturas induzidas sobre o fêmur de ratos tratados com Micro-ondas.

4 OBJETIVOS

4.1 GERAL

Avaliar os níveis de atividade osteoblástica durante o reparo de fraturas do fêmur de ratos tratados com diatermia por Micro-ondas

4.2 ESPECÍFICOS

Analisar os níveis séricos de Fosfatase Alcalina (FA) nos dias 07,14 e 20 do reparo de fratura experimental de fêmur direito de ratos submetidos à terapia por Micro-ondas.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 CARACTERÍSTICAS DO ESTUDO

O presente estudo será experimental controlado, quantitativo, utilizando o método descritivo, randomizado.

5.2 LOCAL DE REALIZAÇÃO

Este estudo foi realizado nos Laboratórios de Toxicologia e de Fármacos do curso de farmácia da Universidade Federal do Amapá – UNIFAP após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP) sob o registro 003/2013, em conformidade com o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), em concordância com a Lei Federal nº 6.638, de 08 de maio de 1979, que estabelece normas práticas didático-científica de conduta de pesquisa experimental em animais (ZIMMERMANN, 1983).

5.3 POPULAÇÃO E AMOSTRA

Neste experimento, foram utilizados 30 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia*) machos, adultos, com peso entre 200 a 300 gramas e com idade aproximada de doze semanas, procedentes do Biotério do Laboratório Central do Estado do Amapá - LACEN. Os ratos foram mantidos em gaiolas-caixa (três animais por gaiolas), em condições ambientais controladas quanto à luminosidade, com ciclo claro/escuro de 12 horas, temperatura (22-25⁰C) e umidade (40% a 60%), recebendo dieta padrão com ração e água *ad libitum*.

5.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

5.4.1 Critérios de inclusão

Como critério de inclusão, foi padronizada a inclusão de ratos (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia*) machos, adultos, com peso entre 200 a 300 gramas e com idade aproximada de doze semanas.

5.4.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo os animais que evoluíram para óbito durante os experimentos, bem como os animais que, submetidos ao procedimento de fratura, esta não fora imediatamente confirmada pelo exame radiográfico.

5.5 APARATO EXPERIMENTAL

5.5.1 Preparação das gaiolas

Todos os animais foram mantidos em gaiolas-caixa confeccionadas em polipropileno com dimensões padronizadas de 40x34x16 cm com assoalho recoberto por maravalha e tampas em arame de aço inox e identificadas segundo cada grupo de pesquisa.

5.5.2 Equipamento de Microondas

Foi utilizado no estudo em equipamento de microondas terapêutico da marca KLD biossistemas com frequência de 2,45 GHz e potência situada entre 50% e 60% da capacidade total do equipamento. A duração da aplicação foi de 8 minutos a partir de um eletrodo circular indutivo guardando distância de 10 cm do membro fraturado conforme a técnica adaptada de Pereira e Col (2008). Este equipamento foi gentilmente cedido pelo setor de reabilitação da Faculdade de Macapá (FAMA) e atende os requisitos da norma de segurança para equipamentos eletromédicos IEC 601 (ABNT NBR IEC 60601-2-6:1997).



Figura 04: Equipamento de micro-ondas utilizado na pesquisa e animal posicionado sob o feixe de radiação. Foto do autor

5.5.3 Aparelho Fraturador

Com o objetivo de padronizar o mecanismo e a força aplicados para provocar a fratura foi utilizado um equipamento denominado aparelho fraturador. Este funciona como uma guilhotina romba e é formado por um corpo, um suporte para o animal, um sistema para liberar a barra e uma barra de aço romba de 500g (FILHO, 2006).

O corpo do aparelho é formado por uma base e duas plataformas de madeira montadas sobre barras verticais. As duas plataformas tem orifícios que constituem o trajeto da barra romba que, por sua vez, fica presa por um sistema de trava a 30 cm da base do aparelho. A queda da barra romba é limitada por outro sistema de trava que para a barra a 1mm, além do ponto de contato da barra com o fêmur do animal a fim de restringir a deformação angular do osso fraturado. O animal fica posicionado em decúbito dorsal, com o membro posterior direito sobre um suporte metálico, conforme apresentado por Filho (2006) e Vialle (2004) (figuras 4). A barra impactadora, após ser destravada, desce pelos orifícios que constituem seu trajeto até o terço médio da diáfise femural do rato que se encontra no centro de dois suportes metálicos, formando um sistema de três pontos originando uma fratura fechada e padronizada (FILHO, 2006).



Figura 05: Animal posicionado no aparelho fraturador. O membro posterior do animal fica apoiado sobre dois suportes de 1cm de altura, separados por uma distância de 4cm. Foto do autor

5.5.4 Equipamento Imobilizador

Para evitar sobrecargas e conseqüente prejuízo no reparo da fratura foi idealizado um aparelho imobilizador confeccionado em resina acrílica que foi colocado imediatamente após a fratura na pata posterior direita fraturada (figura 06).

O aparelho imobilizador consiste em uma estrutura rígida feita de resina acrílica que pode ser dividida em duas porções para melhor compreensão da descrição. Uma que envolve a cintura pélvica e outra, que circunda o membro posterior direito. Ambas as porções ficam interligadas por hastes metálicas. O membro do animal quando colocada dentro do imobilizador, fica posicionada com quadril e joelho em extensão e tornozelo em 90° de flexão.

Apesar da rigidez do material, o aparelho imobilizador é removível, de forma que se pode retirá-lo a qualquer momento para exame de inspeção do membro. Para tanto, foram colocados pinos metálicos e travas sulcadas no aparelho. Tiras de esparadrapo foram usadas fixar os imobilizadores, dificultando sua retirada pelo animal.

A confecção deste equipamento imobilizador obedeceu aos seguintes passos:

1º PASSO: Com o rato parcialmente sedado com éter etílico foi feito um molde usando silicone ortodôntico da marca clonage® sobre o corpo do rato

de forma que se mantivesse a posição de extensão de quadril e joelho e flexão de tornozelo em 90°. Este material tem endurecimento rápido quando misturado a um catalisador (Figura. 06 A).

2° PASSO: A partir do molde em silicone foi feito uma peça em gesso imitando o corpo do rato de forma a preenchê-lo (Figura 06 B).

3° PASSO: Sobre a peça de gesso foi feito um novo molde em silicone de vedação (Figura 06 C).

4° PASSO: Agora, em silicone ortodôntico, foi confeccionado o corpo parcial do rato e sobre este foi moldado o equipamento definitivo feito em resina acrílica (Figura 06 D).

Todos esses passos ou etapas foram necessários para evitar que os materiais usados aderissem, facilitando as desmoldagens.

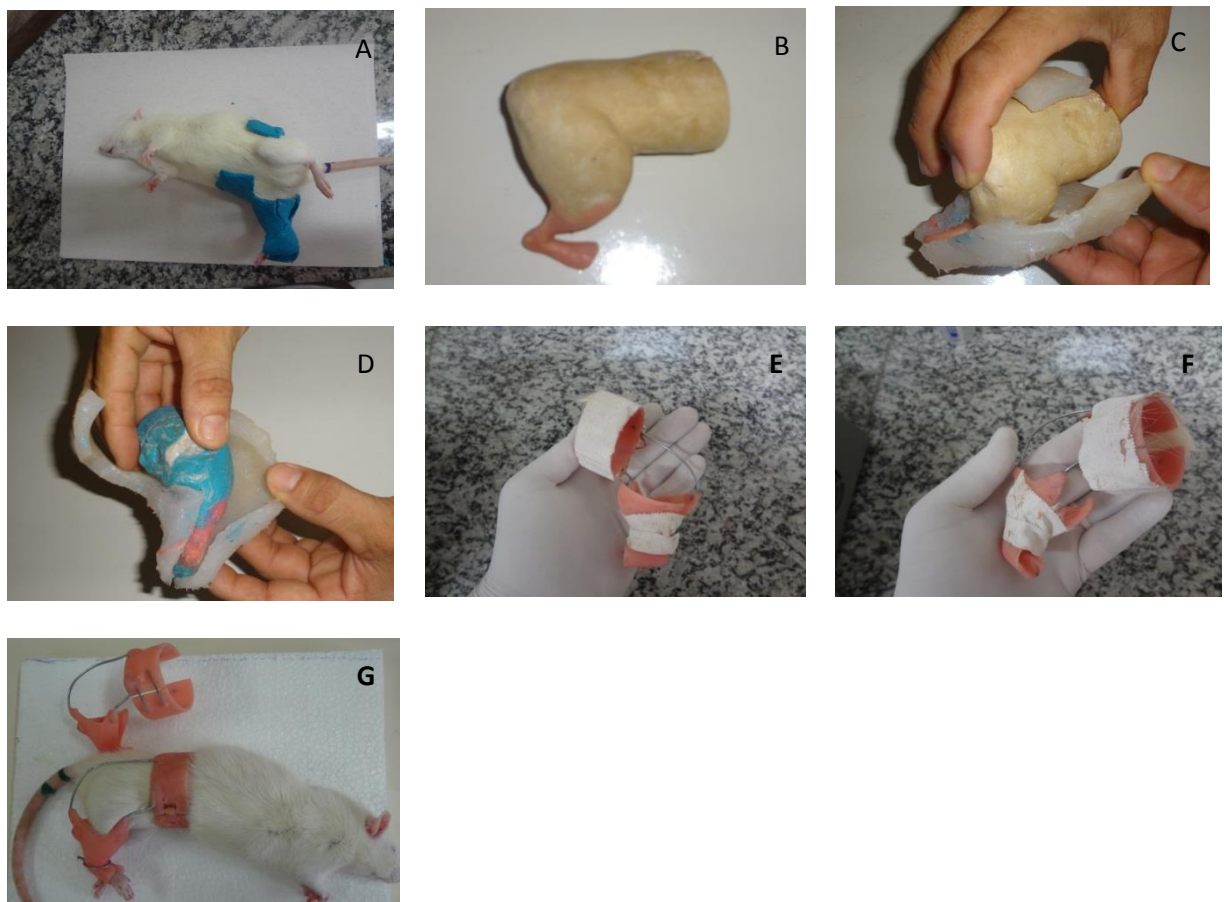


Figura 06: Demonstração passo a passo do processo de criação do aparelho imobilizador. (A) sobre o rato sedado foi feito um molde em silicone ortodôntico; (B) foi criada uma peça em gesso imitando o corpo do rato; (C) sobre a peça em gesso foi feito um molde em silicone de vedação; (D) outro molde de preenchimento em silicone ortodôntico(azul); (E) o aparelho definitivo em resina acrílica;(F e G) aparelho imobilizador com seus mecanismos de abertura e travamento. Foto do autor

5.5.5 Análise Radiológica

Foi utilizado um equipamento XD4 da empresa Metalvet® modelo VS 100/200 com ampola posicionada a 80 cm do chassi e uma carga de 65 mA⁰, conforme a técnica adaptada de Vialle (2004) a fim de confirmar a fratura do fêmur direito.

5.5.6 Material para coleta sanguínea

Utilizando-se de um tubo capilar de 75 mm de comprimento e diâmetros interno de 1,0 mm e externo de 4,5 mm, da marca perfecta® foi coletado o volume de até 5ml do plexo retro-orbital conforme Taborda (2004)

5.5.7. Anestesia

Para a realização da fratura, os animais foram anestesiados com Tiopental (45 mg/kg) por via intraperitoneal, em concordância a Paiva (2005).

5.6 DESCRIÇÃO DO EXPERIMENTO

Os animais foram randomizados em dois grupos, sendo denominados de GD (n=15) e GC (n=15). Posteriormente foram criados de forma aleatória seis subgrupos com cinco animais cada, sendo eles GD7 e GC7 (que participaram da pesquisa durante 07 dias após a fratura), GD14 e GC14 (com participação na pesquisa por 14 dias após a fratura) e GD 20 e GC 20 (participação por 20 dias após a fratura).

Todos os animais foram submetidos a um período de adaptação de 05 dias no laboratório de toxicologia e fármacos da UNIFAP, onde foi realizado o experimento.

Passado o período de adaptação os ratos foram anestesiados com Tiopental (45mg/kg) por via intraperitoneal conforme o protocolo da Fundação Osvaldo Cruz para o trabalho com animais experimentais (PAIVA, 2005). Em plano anestésico, os animais foram submetidos à fratura do fêmur direito pelo método da guilhotina romba, já descrito; a fratura foi confirmada por análise radiológica imediatamente após a realização da mesma.

A imobilização incruenta foi realizada logo após a fratura utilizando-se um equipamento imobilizador confeccionado em resina acrílica, conforme já descrito. O imobilizador foi posicionado no membro posterior direito, sendo retirado temporariamente somente em casos onde há necessidade comprovada de inspeção do membro, como por exemplo, edema de grande porte. Seis animais evoluíram ao óbito após o procedimento de fratura e foram prontamente excluídos do estudo.

O tratamento com diatermia por micro-ondas foi iniciado 24 horas após a provocação da fratura para os animais do grupo diatermia (GD), com exposições diárias às micro-ondas por um tempo determinado de 8 minutos por um período de 07, 14 ou 20 dias consecutivos, dependendo do grupo em estudo. Os animais do grupo GC foram manipulados e posicionados sob o eletrodo do equipamento de micro-ondas por igual período e tempo, porém sem que o equipamento estivesse ligado.

Com os animais em jejum de 12 horas, foi feita a coleta sanguínea nos dias 07, 14 ou 20 do experimento dos respectivos grupos conforme a técnica de Taborda (2004) já descrita. O sangue foi centrifugado a 300 rpm durante 10 minutos e o soro foi retirado com uma pipeta e armazenado em um eppendorf. A análise sanguínea da FA foi realizada no Laboratório de Fármacos da UNIFAP, pelo método colorimétrico utilizando um kit da Labtest® cujos reagentes foram utilizados de acordo com as normas estipuladas pelo fabricante.

A quantificação da reação foi feita em espectrofotômetro previamente calibrado. Após a coleta sanguínea seguiu-se a eutanásia dos grupos em câmara de CO₂ conforme o protocolo da Fundação Osvaldo Cruz para o trabalho com animais experimentais (PAIVA, 2005). Após a eutanásia, as carcaças dos animais foram armazenadas em sacos plásticos apropriados e destinadas ao *freezer* (exclusivo para este fim), do Laboratório de Toxicologia do curso de farmácia da Universidade Federal do Amapá – UNIFAP, onde permaneceram por um período de no máximo 02 (dois) dias até serem recolhidos por uma empresa privada especializada que possui convênio com a Universidade Federal do Amapá- UNIFAP a fim de ser incinerado.

5.7 MÉTODO ESTATÍSTICO

Para testar a hipótese de normalidade dos dados foi realizada a transformação dos mesmos aplicando o teste de Shapiro-Wilks à raiz quadrada, considerando $p > 0,05\%$.

Também foi utilizado o teste 566566 não paramétrico de Wilcoxon (que não requer a hipótese de normalidade dos dados) comparando os grupos diatermia e controle em diferentes dias. Os dados medidos aos 14 e 20 dias foram agrupados enquanto que a análise dos dados medidos aos 07 dias foi feita separada uma vez que a relação entre os grupos é diferente aos 07 dias (diatermia > controle) do que aos 14 e 20 dias (controle > diatermia).

As análises foram divididas em duas subseções:

- A)** Análise descritiva, onde são apresentadas tabelas com valores da raiz quadrada de mínimo, máximo, média e desvio padrão do nível de fosfatase alcalina observado em cada subgrupo e gráficos de dispersão;
- B)** Análise de variância para testar se há diferença significativa entre os grupos e entre os tempos em que os exames foram realizados em relação ao nível médio de fosfatase alcalina.

Todas as análises foram realizadas utilizando o software estatístico R 2.15.3 (www.r-project.org)

5.8 AVALIAÇÃO DO RISCO X BENEFÍCIO DA PESQUISA

Conforme o Artigo III dos Princípios Éticos de Experimentação Animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) que diz: “Procedimentos que envolvam animais, devem prever e se desenvolver considerando sua relevância para a saúde humana e animal, a aquisição de conhecimentos ou bem estar da sociedade”.

Podemos delinear alguns aspectos específicos em relação aos riscos e benefícios do experimento em questão, levando em conta suas contrapartidas para

os pesquisadores, para os animais envolvidos na pesquisa e para a ciência como um todo.

Os animais configuram elemento de fundamental importância no experimento, e por isso, os pesquisadores devem ter consciência que o animal é dotado de sensibilidade, de memória e que sofre sem poder escapar à dor. Os possíveis riscos associados aos animais envolvidos no experimento podem ser os seguintes:

- Ocorrência de processos infecciosos durante os procedimentos da pesquisa.
- Sofrer dor ou angústia intensa ou crônica durante o processo de indução da terapia e retirada das amostras;
- Os animais podem morrer em consequência da anestesia, da lesão ou do sofrimento;

Os pesquisadores também possuem riscos associados aos procedimentos da pesquisa. São eles:

- Ocorrência de mordedura dos animais, causando processos infecciosos ou doenças transmissíveis, como é o caso da raiva;
- Lesão epitelial durante a manipulação dos instrumentos cirúrgicos;

Ocorrerá medidas de proteção para evitar os riscos no trabalho com animais, tais como:

- Uso de equipamentos de proteção individual (EPIs), como roupas protetoras, luvas, gorros, máscaras, protetores faciais e oculares, para uso exclusivo na sala de animais;
- Lavagem de mãos e banhos após a manipulação de animais e subprodutos;
- Adoção de procedimentos operacionais padronizados (POPs) e programas educacionais para prevenção de riscos (CCAC, 1993).

Os benefícios para a ciência são consequência dos resultados gerados pela pesquisa. São eles:

- Respeito às normas de dissecação animal em vigor, respaldando o trabalho e os pesquisadores;
- Respostas para o problema da pesquisa;
- Base científica para futuros estudos em humanos;
- Formulação de protocolos para o tratamento de processo inflamatório com diclofenaco sódico e/ou ultra-som terapêutico, seja em animais como em seres humanos.

Para os pesquisadores os benefícios da pesquisa são de natureza técnica:

- Qualificação técnica nos procedimentos experimentais com o uso de fármacos;
- Estimulo à produção científica;
- Aprimoramento e atualização técnica.

É preciso tomar providências para que haja o controle dos riscos inerentes à pesquisa, ou mesmo prevenção destes. Para tanto, os animais serão tratados com instrumental adequado, anestesiados de forma segura e controlada, assegurando a reversibilidade da depressão do sistema nervoso. Além disso, os animais são provenientes de uma instituição idônea, a fim de assegurar sua integridade de saúde, proporcionando maior segurança aos pesquisadores, pois se trata de um biotério com normas rígidas no trato com os animais de pesquisa.

6 RESULTADOS

6.1 ANÁLISE DESCRITIVA

A Tabela 01 apresenta algumas medidas descritivas para o nível de fosfatase alcalina segundo grupo (controle e diatermia) e o número de dias (07, 14 e 20). O valor médio observado varia de 10,9 U/L no grupo GD14 (onde há apenas 2 ratos) a 31,09 U/L no grupo GD7 (grupo com maior número de ratos, 6). Observa-se tanto na Tabela 01 quanto na Figura 01 que entre os animais examinados 07 dias após o início do experimento o grupo diatermia apresentou, em média, maior nível de fosfatase alcalina comparados aos ratos do grupo controle. Entretanto, nos exames feitos aos 14 e 20 dias há uma inversão e o grupo controle apresentou média ligeiramente maior. Além disso, quando olhamos apenas para o grupo diatermia observa-se uma diminuição da fosfatase alcalina média ao longo do tempo. Já no grupo controle o pico (maior média) é observado no subgrupo de 14 dias. Esse resultado indica uma interação entre grupo e tempo.

Tabela 01 – Valores de mínimo, máximo, média e desvio padrão para o nível de fosfatase alcalina segundo o grupo e o número de dias após o início do experimento em que o exame foi realizado.

Fosfatase Alcalina U/L						
Grupo	Dias	N	Mínimo	máximo	Média	desvio padrão
Controle	7	3	5,52	20,73	15,20	8,41
	14	4	4,14	42,84	24,53	16,09
	20	5	4,14	29,02	17,69	9,74
Diatermia	7	6	9,67	58,04	31,09	22,94
	14	4	4,14	40,07	19,69	16,17
	20	2	3,84	17,96	10,90	9,98

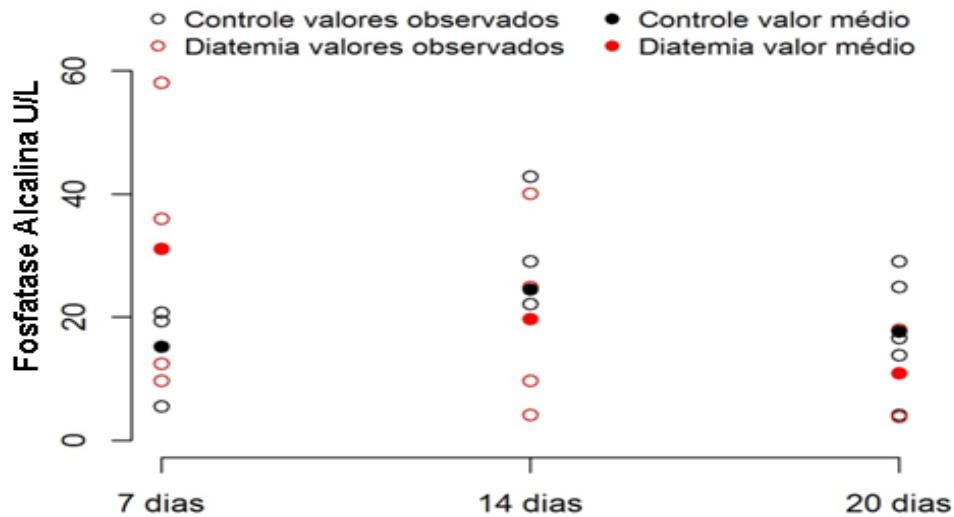


Figura 07: Nível de fosfatase alcalina segundo o grupo e o número de dias após o início do experimento.

Na tabela 01 observa-se grande variação no desvio-padrão dos grupos o que pode ser facilmente constatado ao se comparar os valores de 9,74 U/L no grupo GC20 e 22,94 U/L no grupo GD7.

Uma maneira de contornar a grande variação do desvio-padrão é realizar uma transformação nos dados. No estudo em questão, uma transformação que apresentou resultado satisfatório foi à raiz quadrada. A Tabela 02 e a Figura 02 apresentam o resultado da análise descritiva apresentada acima em relação à raiz quadrada do nível de fosfatase alcalina.

Tabela 02 – Valores de mínimo, máximo, média e desvio padrão para a raiz quadrada do nível de fosfatase alcalina segundo o grupo e o número de dias após o início do experimento em que o exame foi realizado.

Raiz quadrada da Fosfatase Alcalina U/L						
Grupo	Dias	n	Mínimo	máximo	média	desvio padrão
Controle	7	3	2,35	4,55	3,77	1,23
	14	4	2,03	6,55	4,67	1,91
	20	5	2,03	5,39	4,04	1,31
Diatermia	7	6	3,11	7,62	5,23	2,11
	14	4	2,03	6,33	4,12	1,92
	20	2	1,96	4,24	3,10	1,61

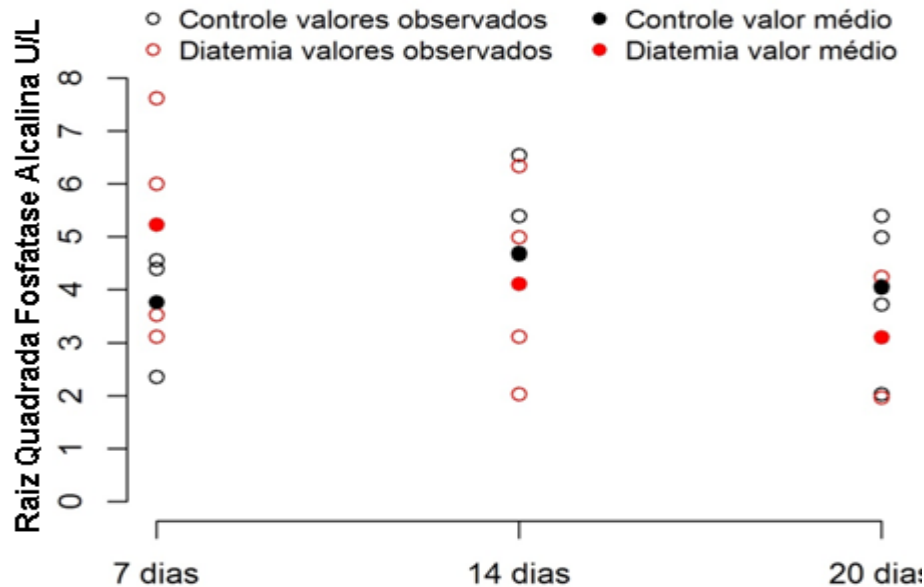


Figura 08– Raiz quadrada do nível de fosfatase alcalina segundo o grupo e o número de dias após o início do experimento.

Como se observa na Tabela 02 há uma maior homogeneidade da estimativa dos desvios padrões entre os sub grupos para a raiz quadrada da fosfatase alcalina. Além disso, aplicando o teste de Shapiro-Wilks a raiz quadrada da fosfatase alcalina obtém-se o valor $p = 0,2932$. Não se rejeitando, portanto, ao nível 5%, a hipótese de normalidade dos dados.

6.2 ANÁLISE DE VARIÂNCIA

A Tabela 03 apresenta o resultado da Análise de variância para dois fatores (grupo e tempo) aplicados para a raiz quadrada das medidas observadas de fosfatase alcalina. Não houve efeito significativo da interação entre grupo e dias (valor $p = 0,397$). Não houve diferença significativa no nível de fosfatase alcalina medido em diferentes dias após o início do experimento (valor $p = 0,613$) e também não houve diferença significativa entre os grupos (valor $p = 0,613$).

Tabela 03 – Resultado da Análise de Variância de dois fatores para a raiz quadrada do nível de fostatase alcalina.

Anova			
Fonte de variação	g.l.	F	valor p
Grupo	1	0,200	0,660
Dias	2	0,503	0,613
Grupo vs Dias*	2	0,972	0,397

g.l. : graus de liberdade

*interação entre grupo e dias

6.3 ANÁLISE COMPLEMENTAR

Em uma análise complementar foram comparados os grupos controle e diatermia em diferentes dias aplicando o teste 566566 não paramétrico de Wilcoxon (que não requer a hipótese de normalidade dos dados). Porém, como a amostra é pequena agruparam-se os dados medidos aos 14 dias com os dados medidos aos 20 dias. A análise dos dados medidos aos 07 dias foi feita separada, pois, como visto nas Figuras e Tabelas acima, a relação entre os grupos é diferente aos 07 dias (diatermia > controle) do que aos 14 e 20 dias (controle > diatermia).

Quando comparado controle versus diatermia aos 07 dias o valor $p = 0,515$; e quando comparado os grupos aos dias 14 e 20 o valor $p = 0,477$. Portanto, também nesta análise, não se detectou diferença significativa entre os grupos, ao nível de 5%.

7 DISCUSSÃO

A utilização da Fosfatase Alcalina total como biomarcador de formação óssea é comum e, embora a isoforma óssea tenha maior especificidade, pode-se afirmar que a fração total é um marcador considerado confiável da atividade osteoblástica, quando se trata do reparo de fraturas e seus níveis séricos podem servir como medida para avaliar o processo de reparo (AJAI, 2013; VOLPIN, 1986). Assim, neste estudo, adotou-se a medida dos níveis séricos da FA como indicador da presença de osteoblastos ativos a fim de presumir a síntese de matriz óssea.

Observando o comportamento da média da fosfatase alcalina sérica neste trabalho verifica-se que há uma tendência de queda no grupo diatermia a partir do sétimo dia, que se mantém até o vigésimo dia do estudo. Por outro lado, no grupo controle há um pico no 14º dia e, neste ponto, segue-se uma curva descendente a o 20º dia, ainda que com valores superiores ao grupo tratado. Esse achado encontra sustentação no estudo de Kommenou (2005) que em estudos sobre o reparo de ossos longos em cães, afirma que há elevação dos níveis de fosfatase alcalina entre o 10º e 15º dia após a fratura, com tendência de queda após esse dia. No entanto, nas condições metodológicas do presente estudo, ainda não se pode verificar diferença estatisticamente significativa nessa redução, o que solicita uma confirmação com uma amostra um pouco maior.

Considerando que os níveis séricos de fosfatase alcalina sugerem aumento da atividade osteoblástica durante o reparo de fraturas (KOMMENOU, 2005), a comparação das médias e a análise de variância desta pesquisa dá conta que não ocorreram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos diatermia e controle, assim como nos exames realizados em diferentes momentos da pesquisa. Também uma provável interação entre os grupos observada no 14º dia é considerada não significativa. Muito embora tenha havido níveis séricos mais elevados no grupo de 07 dias (GD7 e GC7), coincidindo com os achados de Guerino (1995) e Kommenou (2005), estas diferenças não foram significativas, o que pode sugerir que não ocorreu influência das diatermias sobre a neoformação óssea, nessas condições experimentais.

Em consonância com os resultados do presente trabalho, um estudo realizado por Chang e Col. (2002) comparou os efeitos das micro-ondas e do ultrassom pulsado no reparo de fraturas em coelhos e observaram aumento na

neoformação óssea e na resistência à torção apenas no grupo tratado com ultrassom, e concluiu que o efeito térmico produzido pelas micro-ondas não tem eficácia sobre a atividade osteoblástica e a resistência mecânica de ossos de coelho em fase de reparo de fraturas.

Lirani (2005) relata diversos benefícios decorrentes do uso de agentes físicos como o laser, ultrassom pulsado e campos elétricos e eletromagnéticos de baixas intensidades na terapia com células ósseas in vitro e in vivo. Dentre os quais se destacam o aumento na diferenciação e proliferação de osteoblastos, aceleração da formação mineral óssea, melhoria das propriedades mecânicas e aumento nos níveis séricos de fosfatase alcalina e fosfatase ácida tartarato-resistente. No entanto, nenhum desses estudos faz referência às micro-ondas.

Importante ressaltar que a medida da fosfatase alcalina, a despeito da sua importância já citada, necessita de métodos complementares como a histomorfometria e o exame radiológico a fim de se avaliar aspectos como a população celular e o calo ósseo neoformado.

Segundo Prentice (2010) a falta de pesquisas sobre a dosimetria e a falta de relatórios que possam nortear o uso terapêutico das micro-ondas, tem diminuído consideravelmente o seu uso nas clínicas de fisioterapia.

Uma limitação do estudo foi à dificuldade em ajustar os parâmetros de tratamento baseada na sensação subjetiva de calor referida pelo paciente. Dessa forma, os parâmetros terapêuticos utilizados foram baseados nas recomendações de Agne (2005), Low e Reed (2001) e Morillo (2009). Buscou-se adaptar o tempo de aplicação bem como a potência de emissão do equipamento através de testes-piloto. A escolha do tempo de 8 minutos de aplicação se deu em virtude de observarmos a presença de necrose tecidual local em aplicações superiores há esse tempo (10 e 15 minutos) em potências superiores à utilizada no experimento.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise bioquímica da fosfatase alcalina demonstrou não haver diferenças significativas entre os grupos controle e diatermia em diferentes momentos da pesquisa quando da intervenção com microondas 2450 Mhz e potência entre 50% e 60% por 8 minutos na fratura de fêmur de ratos. Portanto, esses dados sugerem que os efeitos térmicos produzidos pelas microondas não tenham influência sobre a atividade osteoblástica quando se considera essa enzima.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGNE, J.E. **Eletrotermoterapia teoria e prática**. Santa Maria: Orium. RS, 2005.

AJAI, A.S; MAHDI, S.A.A; SRIVASTAVA, R.N **Evaluation of serum Alkaline Phosphatase as a biomarker of healing process progression of simple diaphyseal fractures in adults patients**. International Research Journal of Biological Sciences; Vol 2(2), 40-43, February (2013).

AMADEI, U.S. **A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea**. J. Bras Patol Med Lab.v.42. n.1. p 5-12. Fevereiro, 2006

CHANG, W.H. et al. Study of thermal effects of ultrasound stimulation on fracture healing. **Bioeletromagnetics**. 2002:256-63

CHEUNG, W.H; **Low-intensity Pulsed Ultrasound Accelerated Callus formation, Angiogenesis and Remodeling in Osteoporotic Fracture Healing**. **Ultrasound in Medicine e Biology**, vol.37nº2. Pp.231-238, 2011.

CROCI, A.T. **O uso do aspirado de medula óssea de íliaco em falhas ósseas de fêmures de camundongos-Estudo experimental**; Acta Ortopédica Brasileira, vol.12,nº1.São Paulo jan/Mar.2004.

DAVIS, J.B; **Clinical Aplications of Microwave Radiation: Hypothermy and Diathermy**. Director, Medical and Scientific Review Staff Bureau of Medical Devices. Food and Drug Administration Silver Spring, Maryland, 1979.

DINIZ, S. F **Influência do diabetes mellitus no processo de reparação de fraturas**. **Estudo experimental em Ratos**.Universidade de Brasília, 2007.

FILHO, S. **Estudo experimental dos efeitos da heparina de baixo peso molecular (enoxaparina) na formação do calo ósseo em fêmures de ratos**. Acta Ortopédica Brasileira.Vol.14 nº2, 2006.

FONTES-PEREIRA, A.J **Efeitos do ultrassom terapêutico de baixa intensidade em fratura induzida em tibia de ratos**. ActaOrtop.Bras.Vol.21 N° 1: pp. 18-22; 2013.

FUKADA, E. e YASUDA,I. **On the Piezoelectric Effect of Bone**, Journal of the Physical Societ of Japan.Vol12 nº10, October, 1957.

GARTNER,L.P e HIATT,J.L. **Tratado de Histologia em cores**, 2º ed. Guanabara Koogan.RJ.2003.

GIOMBINI, A. **Hipertermia Induced by Microwave Diathermy in the management of Muscle and Tendon Injuries**. Department of Trauma and Orthopedic Surgery, Keele University School of Medicine, 2007.

GIORDANO, V. e KNACKFUSS, I. **Perspectives on fracture healing**. Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia – RJ. Programa de Educação continuada, Fascículo 1. maio, 2003.

GIORDANO, V. **Influência do laser de baixa energia no processo de consolidação de fratura de tíbia: estudo experimental em ratos**. Revista Brasileira de Ortopedia. Vol 36, N° 5, Maio. 2005

GUERINO, M.R. **Influence of ultrasound and Physical activity on bone Healing. Ultrasound in Medicine e Biology**. Vol 34 nº9 pp.1408-1413, 2008.

GUYTON, A.C e HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**; 10º ed. Guanabara Koogan. RJ. 2002.

JUNQUEIRA, L.C. e CARNEIRO, J. **Histologia Básica**, Guanabara Koogan 11ª ed; RJ. 2008.

KITCHEN, S. e BAZIN, S. **Eletroterapia de Clayton**. 1ª edição brasileira. Manole, SP. 1998.

KOMNENOU, A. **Correlation of serum Alkaline Phosphatase activity with the healing process of long bone fractures in dogs**. Clinic of Surgery, School of Veterinary Medicine, Aristotle University of Thessalonica, Greece, 2005.

KUPCZIK, F. **Influência da ciprofloxacina na resistência do calo ósseo de fraturas padronizadas de fêmures de ratos**. Pontifícia Universidade Católica do Paraná, 2008.

LANDA, L.V; **Estudo Comparativo entre Terapia com Laser de Baixa Potência e Terapia Ultrassônica na da promoção Osteogênese em Rádio de Coelhos**. Dissertação apresentada no Programa de Pós-graduação em Bioengenharia da Universidade do Vale do Paraíba, SP. 2005.

LEUNG, K.S; FUNG, K.P; SHER, A.H.L; LI, C.K; LEE, K.M **Plasma bone-specific alkaline Phosphatase as indicator of osteoblastic activity**. The journal of bone and joint Surgery Vol. 75-B, N° 2. March, 1993.

LIRANI, A.P.R. **Evidências da ação de agentes físicos sobre o metabolismo do tecido ósseo e seus potenciais usos clínicos**; Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia. Vol.49 nº6 São Paulo Dec 2005.

LONGLOIS, M.R et al. **Post translational heterogeneity of bone Alkaline Phosphatase in metabolic bone disease.** Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. V.32, p.675-680, 1994.

LOW, J. e REED,A. **Eletroterapia Explicada, Princípios e Prática.** 3ª ed. Manole. SP, 2001.

LUBERT, P.H.W. **Low-intensity pulsed ultrasound(LIPUS) in fresh clacicle fractures: A multi-centre double blind randomized controlled trial.** Injury, International Journal of the Care of the Injured (2008) 39, 1444 – 1452.

MACHADO, C.M. **Eletrotermoterapia Prática,** 2ª edição. Pancast editorial, SP.1991

MORILLO, M.M; VEGA, P.M.J; PORTERO, S.F **Manual de Medicina Física.** Harcourt Brace, 1998.

NELSON, R.M; HAYES, K.W. e CURRIER, D.P. **Eletroterapia Clínica.** 3º ed. Manole; Barueri, SP.2003.

PAIVA,F.P; **Curso de manipulação de Animais de Laboratório.** Centro de pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ, BA. 2005.

PASKALEV, M; KRASDEV, S; FILIPOV, J. **Changes in some serum bone markers after experimental fracture and intramedullary osteosynthesis in dogs.** Trakia journal of sciences. Vol3, N° 5, pp 46-50. 2005.

PEREIRA,W.M;**Influência da diatermia por Micro-ondas na força dos músculos flexores do cotovelo e na atividade Eletromiográfica do músculo bíceps braquial.** Fisioterapia e Movimento. 2008.

PRENTICE, E.W **Modalidades Terapêuticas em Medicina Esportiva.** 1ªedição Brasileira. Manole. SP 2002

SCHWARTSMANN, C; LECH, O. e TELOKEN,M. **Fraturas Princípios e Prática.** Artmed. Porto Alegre, 2003.

SARAIVA, G.L. **Marcadores bioquímicos da remodelação óssea na prática clínica.** Arquivos Brasileiros de endocrinologia e metabologia. Vol. 46 nº 1. São Paulo. Fev 2002.

SLADE, J.F e CHOU, K.H; **Bony tissue Repair.** Journal of Hand Therapy. Vol. 11 issue 2. Abr/Jun, Pg 118 – 124. 1998

SOUSA, C; ABREU, H; VIEGAS, C; AZEVEDO, J; REIS, R; GOMES, M; DIAS, I. **Serum total and bone alkaline phosphatase and tartrate-resistant acid phosphatase activities for the assessment of bone fracture healing in dogs.** Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.63, n4, p.1007-1011, 2011.

TABORDA, C. Manual de Normas técnicas do biotério de experimentação animal do departamento de Microbiologia do Instituto de ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo – USP, 2004.

UDUPA, K.N. PRASAD, G.C. **Chemical and histochemical studies of organic constituents in fracture repair in rats.** Journal Bone joint surgeon, vol. 45, pg 770-9. 1963.

VIALLE, E. **Produção de fratura padronizada de fêmur de ratos.** Revista Brasileira de Ortopedia, vol39,nº6 – jun,2004.

VIGNOCHI, C.M. **Análise dos marcadores bioquímicos Fosfatase alcalina e Deoxipiridinolina no metabolismo ósseo de recém-nascidos pré-termo submetidos à fisioterapia motora.** Tese de doutorado apresentada no programa de pós-graduação saúde da criança e do adolescente da faculdade de medicina da UFRGS. Porto Alegre, 2011.

VOLPIN, G; REES, J.A; ALI, S.Y; BENTLEY, G. **Distribution of Alkaline Phosphatase activity in experimentally produced callus in rats.** British editorial society of bone and joint surgery, vol 68-B nº4. August, 1986.

ZIMMERMANN, M. **Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals.** Pain. 1983; 16:109-110.

ANEXOS



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo no. 003/2013 – CEP sobre **"ANÁLISE HISTOLÓGICA E MORFOMÉTRICA DA INTERVENÇÃO POR MICROONDAS EM DIFERENTES FASES DO REPARO DE FRATURAS E FÊMUR DE RATOS"**, sob a responsabilidade de **Denilson Henrique Silva de Miranda**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação de Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal(COBEA), e foi aprovado pela comissão de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP), em reunião realizada em 12/03/2013.

CERTIFICATE

We certify that the protocol number 003/2013 about **"ANÁLISE HISTOLÓGICA E MORFOMÉTRICA DA INTERVENÇÃO POR MICROONDAS EM DIFERENTES FASES DO REPARO DE FRATURAS E FÊMUR DE RATOS"**, **Denilson Henrique Silva de Miranda** is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adapted by Brazilian College of Animal Experimentation(COBEA) and was approved by the Research Ethical Committee(CEP-UNIFAP) in 12/03/2013.

Macapá, 12 de março de 2013

Prof. Msc. Alexandre Souto Santiago
Coordenador - CEP-UNIFAP



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - PPGCS

Ao Dr. Fernando Medeiros

Presidente do Laboratório Central do Estado do Amapá /LACEN

Assunto: Solicitação de parceria para pesquisa experimental em animais.

Como docente vinculado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Amapá – UNIFAP solicito a Vossa Senhoria parceria deste laboratório, no sentido da disponibilização de 30 ratos da espécie *Rattus norvegicus albinus Rodentia mammalia* para a realização de pesquisa experimental do mestrando **Denilson Henrique Silva de Miranda** Matrícula CS 6152011, conforme projeto de pesquisa anexo.

Atenciosamente,

Assinatura manuscrita em tinta azul, com o nome 'José Wagner Cavalcante Muniz' claramente legível.

Prof. Dr. José Wagner Cavalcante Muniz

Orientador



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - PPGCS

À Prof^a. Dra. Jocivânia Oliveira da Silva

Coordenadora do Laboratório de Toxicologia e fármacos

Assunto: Solicitação de parceria para pesquisa experimental em animais.

Senhora Coordenadora,

Como docente vinculado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Amapá - UNIFAP solicito a Vossa Senhoria parceria, no sentido da disponibilização do espaço do referido laboratório para armazenagem de 30 ratos com 12 semanas para a realização de pesquisa experimental do mestrando **Denilson Henrique Silva de Miranda** Matrícula CS 6152011, conforme projeto de pesquisa anexo.

Atenciosamente,

Assinatura manuscrita em tinta azul, com o nome 'José Wagner Cavalcante Muniz' legível.

Prof. Dr. José Wagner Cavalcante Muniz

Orientador