



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CAMPUS ARARANGUÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA REABILITAÇÃO

Ligia Milanez Venturini

**A combinação do exercício aeróbio de moderada intensidade e ultrassom pulsado de  
baixa intensidade na consolidação de fratura tibial em ratos**

Araranguá

2023

Ligia Milanez Venturini

**A combinação do exercício aeróbio de moderada intensidade e ultrassom pulsado de baixa intensidade na consolidação de fratura tibial em ratos**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Reabilitação da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestra em Ciência da Reabilitação.

Orientador(a): Prof. Dr. Alessandro Haupenthal  
Coorientador(a): Prof. Dra. Daniela Pacheco dos Santos Haupenthal

Araranguá

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Venturini, Ligia Milanez

A combinação do exercício aeróbio de moderada intensidade e ultrassom pulsado de baixa intensidade na consolidação de fratura tibial em ratos / Ligia Milanez Venturini ; orientador, Alessandro Hauptenthal, coorientador, Daniela Pacheco dos Santos Hauptenthal, 2023.

54 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Araranguá, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Reabilitação, Araranguá, 2023.

Inclui referências.

1. Ciências da Reabilitação. 2. Fraturas ósseas . 3. Ultrassom pulsado. 4. Consolidação óssea. 5. Exercício. I. Hauptenthal, Alessandro. II. Hauptenthal, Daniela Pacheco dos Santos. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Reabilitação. IV. Título.

Ligia Milanez Venturini

**A combinação do exercício de moderada intensidade e ultrassom pulsado de baixa intensidade na consolidação de fratura tibial em ratos**

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 15 de dezembro de 2023, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Silvio Assis Avila de Oliveira Júnior, Dr.  
Universidade Federal do Mato Grosso do Sul – UFMS

Prof.(a) Livia Arcêncio do Amaral, Dra.  
DCS/CTS/ARA/UFSC

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Meste/Mestra em Ciências da Reabilitação.

---

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

---

Prof.(a) Alessandro Haupenthal, Dr.  
Orientador

Araranguá, 2023.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a Deus e sua presença em minha vida, me permitindo viver momentos tão desejados como este. Tiveram e ainda haverá portas abertas e portas fechadas, mas sei que é sobre Ele.

Agradecer meus pais Lela e Márcia por me proporcionarem muita base, sei que fizeram e fazem o possível pela nossa família. Meus irmãos Donato e Luize pelas distrações e muito acolhimento em momentos de ansiedade. Minha nega afilhada Érica por sempre recarregar minhas energias. Meu namorado e melhor amigo Gui, que muito me escutou e me deu todo o apoio para seguir. A todos vocês FAMÍLIA muito obrigada!!!!

Agradecer a família Haupenthal, meu orientador Alessandro por todo conhecimento compartilhado, pela disponibilidade, paciência e sabedoria nas orientações. Por permitir a realização deste trabalho em parceria com outro grupo de pesquisa, e me apoiar em todo desfecho deste estudo!! Minha coorientadora e muito amiga Dani, sempre muito sábia e um dom para acalmar corações ansiosos! Te admiro muito “amoreca”!!! Muito obrigada por tudo e por tanto, queridos!!!!

Ao grupo de pesquisa Proteção e Reparo Tecidual, aliás, minha segunda família desde os anos de graduação e IC! Agradecer especialmente o Professor Paulo pela parceria para realização deste projeto e por compartilhar conosco muito conhecimento. Pela disponibilidade e incansáveis conselhos na cantina! Você é fera! E junto ao professor seus pupilos, meus colegas e amigos João, pelas figuras maravilhosas!!!! Alice, Camila, Igor e Gabi, meus colegas da iniciação científica, pela mão na experimentação e realização das técnicas! Mateus pelas incansáveis discussões sobre o assunto! Duda, Guga, Carol que também prestaram toda a ajuda para realização deste trabalho e pela parceria no dia a dia de lab!! Beirão por toda a paciência e maestria para execução do modelo! As garotas do 508 Ruby e Laura, duas amigas e irmãs que o lab me deu. Sou tão grata por ter vocês em minha vida! Uma amizade muito além do laboratório e da profissão, amo vocês meninas! A verdade é que com certeza tudo se tornou mais leve porque pude contar com cada um de vocês!! Admiro vocês, grupo!!!!

Agradeço aos meus colegas de mestrado do PPGCR por tanta troca de conhecimentos ricos! Aos professores que ministraram disciplinas que tanto me acrescentaram! Meu muito obrigada!!!!

Agradeço também ao João Afonso e o pessoal do setor de Odontologia da UNESC pela disponibilidade e toda ajuda com as análises de Raio X. Ao pessoal da IPARQUE pela

parceria com os testes mecânicos. Ao pessoal do biotério da UNESC pelo zelo e atenção durante o período experimental.

Por fim, agradecer ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Reabilitação (PPGCR) apoiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES). Agradecer o Financiamento da Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC). Agradecer a Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) e ao Laboratório de Fisiopatologia Experimental.

“Aqueles que passam por nós não vão sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós.” Antoine de Saint-Exupery.

Obrigada a todos!!!

## RESUMO

Atualmente estratégias terapêuticas que envolvam estresse mecânico adequado se tornam protagonistas para consolidação de fraturas. No entanto, desconhece-se evidências literárias da associação do uso do ultrassom pulsado de baixa intensidade e exercício aeróbio moderado, embora sejam utilizados no dia a dia de profissionais Fisioterapeutas. Diante disso se torna necessário elucidar fatores radiológicos, bioquímicos e biomecânicos das intervenções. Desta forma, este estudo tem como objetivo investigar os efeitos do tratamento com exercício aeróbio moderado e ultrassom pulsado de baixa intensidade, combinados, no processo de consolidação óssea em 28 ratos Wistar divididos em grupos experimentais com “n” de 07 animais por grupo, sendo: G1 – Fratura Tibial (FT); G2 – FT + Ultrassom Pulsado (FT + US); G3 – FT + Exercício aeróbio (FT + Ex); G4 – FT + Ex + US. O modelo de fratura óssea foi realizado por meio de procedimento cirúrgico de osteotomia transversal com fixação de fio de Kirschner. Após 72 h da fratura, os animais receberam intervenção terapêutica por 19 dias, realizada três vezes na semana (em dias intercalados). Os grupos experimentais receberam intervenção de ultrassom pulsado, com gel salina 0,9 %, com tempo de aplicação de 10 minutos, frequência de 1,5 MHz, intensidade de 0,4 W/cm<sup>2</sup> e área de radiação efetiva de 3 cm<sup>2</sup>. O protocolo de exercício moderado teve duração de 30 minutos/dia com progressão de velocidade a cada semana, sendo estas 13, 14 e 15 m/min. As análises radiográficas foram feitas 1, 12 e 24 dias após procedimento cirúrgico. Os animais foram submetidos à eutanásia 72 h após a última sessão de tratamento e a tíbia foi cirurgicamente removida para posteriores análises biomecânicas e bioquímicas. À análise radiográfica o grupo combinado aumentou os escores radiográficos de reparo ósseo quando comparados ao grupo FT. Nos níveis de citocinas anti-inflamatórias, IL-4 e IL-10, houve aumento significativo nos grupos que receberam intervenção de tratamento, assim como nos níveis do fator de crescimento TGF- $\beta$ , que foram significativamente maiores no grupo das terapias combinadas. O tratamento com exercício aeróbio e ultrassom pulsado foi capaz de diminuir os níveis do oxidante nitrito, controlar o dano oxidativo de conteúdo de sulfidrila e aumentar a atividade antioxidante de SOD e GSH. Nas análises biomecânicas de carga máxima (N) e deformação até a carga máxima (mm/mm) o grupo combinado tolerou maior carga e demonstrou melhor capacidade de deformação e propriedade elástica do tecido quando comparado ao grupo fratura tibial. O exercício aeróbio e o ultrassom pulsado de baixa intensidade regulam positivamente a diferenciação osteogênica, mineralização óssea, angiogênese e área de volume ósseo. Os resultados corroboram a hipótese de pesquisa, no qual demonstram que a combinação das intervenções foi capaz de obter melhor escore radiográfico, potencializar a modulação do processo inflamatório e controle de estresse oxidativo e suportar maior carga mecânica.

**Palavras-chave:** Fraturas ósseas; consolidação óssea; ultrassom pulsado; exercício.

## ABSTRACT

Currently, therapeutic strategies that involve mechanical stress have become protagonists for fracture consolidation. However, there is no known literary evidence of the association between the use of low-intensity pulsed ultrasound and moderate aerobic exercise, although they are used in the daily lives of professional physiotherapists. Elucidate the biochemical and biomechanical factors of interventions, whether isolated or combined, if necessary. Thus, this study aims to investigate the effects of treatment with moderate aerobic exercise and low-intensity pulsed ultrasound, combined, on the bone transfer process in 28 Wistar rats divided into experimental groups with “n” of 07 animals per group, with : G1 – Tibial Fracture (FT); G2 – FT + Pulsed Ultrasonography (FT + US); G3 – FT + Aerobic exercise (FT + Ex); G4 – FT + Ex + USA. The bone fracture model was created using a transverse osteotomy surgical procedure with Kirschner wire fixation. 72 hours after the fracture, the animals underwent therapeutic intervention for 19 days, carried out three times a week (on alternate days). The experimental groups received pulsed ultrasound intervention, with 0.9% saline gel, with an application time of 10 minutes, frequency of 1.5MHz, intensity of 0.4W/cm<sup>2</sup> and effective radiation area of 3cm<sup>2</sup>. The moderate exercise protocol lasted 30min/day with speed progression each week, these being 13m/min, 14m/min and 15m/min. Radiographic analyzes were performed 1, 12 and 24 days after surgical induction. The animals were euthanized 72 hours after the last treatment session and the tibia was surgically removed for subsequent biomechanical and biochemical analyses. Upon radiographic analysis, the combined group increased radiographic bone repair scores when compared to the FT group. There was a significant increase in the levels of anti-inflammatory cytokines, IL-4 and IL-10 in the groups that received treatment intervention, as well as in the levels of the growth factor TGF- $\beta$ , which were significantly higher in the combined therapy group. Treatment with aerobic exercise and pulsed ultrasound was able to reduce the levels of oxidizing nitrite, control the oxidative damage of sulfhydryl content and increase the antioxidant activity of SOD and GSH. In biomechanical analyzes of maximum load (N) and deformation up to maximum load (mm/mm), the combined group tolerated greater load and declared better deformation capacity and metallic properties of the tissue when compared to the tibial fracture group. Aerobic exercise and low-intensity pulsed ultrasound upregulate osteogenic differentiation, bone mineralization, angiogenesis, and bone volume area. The results corroborate the research hypotheses, but do not demonstrate that the combination of interventions was able to obtain a better radiographic score, enhance the modulation of the inflammatory process and control of oxidative stress, and withstand greater mechanical load.

**Keywords:** Bone fractures; bone consolidation; pulsed ultrasound; exercise.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Processo de consolidação óssea.....	15
Figura 2 - Efeitos do ultrassom pulsado na fratura tibial .....	18
Figura 3 - Divisão dos grupos experimentais .....	22
Figura 4 - Modelo de fratura tibial .....	23
Figura 5 - Linha do tempo experimental .....	24
Figura 6 - Imagem da máquina de ensaio mecânico de flexão de três pontos. ....	30
Figura 7 - Análise radiográfica.....	32
Figura 8 - Citocinas pró-inflamatórias .....	33
Figura 9 - Citocina anti-inflamatórias e fator de crescimento .....	34
Figura 10 - Oxidantes .....	35
Figura 11 - Dano oxidativo e antioxidantes .....	36
Figura 12 - Ensaio mecânico .....	37
Figura 13 - Figura resumo .....	43

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Dose de aplicação do ultrassom pulsado .....	25
Quadro 2 - Protocolo de exercício em esteira .....	25
Quadro 3 - Escore radiográfico .....	26

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>12</b>
2.1	OBJETIVO GERAL .....	12
<b>2.1.1</b>	<b>Objetivos específicos .....</b>	<b>12</b>
2.2	HIPÓTESE .....	12
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>13</b>
3.1	CONSOLIDAÇÃO ÓSSEA .....	13
3.2	PROPRIEDADES BIOMECÂNICAS ÓSSEA .....	15
3.3	MECANOTRANSDUÇÃO.....	16
3.4	ULTRASSOM PULSADO DE BAIXA INTENSIDADE E CONSOLIDAÇÃO ÓSSEA	17
3.5	EXERCÍCIO E CONSOLIDAÇÃO ÓSSEA .....	19
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>21</b>
4.1	TIPO DE ESTUDO .....	21
4.2	PROCEDIMENTOS ÉTICOS.....	21
4.3	ANIMAIS .....	21
4.4	MODELO DE FRATURA TIBIAL .....	22
4.5	DESENHO EXPERIMENTAL .....	23
4.6	INTERVENÇÕES .....	24
<b>4.6.1</b>	<b>ULTRASSOM PULSADO DE BAIXA INTENSIDADE.....</b>	<b>24</b>
<b>4.6.2</b>	<b>EXERCÍCIO .....</b>	<b>25</b>
4.7	RADIOGRAFIA.....	25
4.8	DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE CITOCINAS.....	26
4.9	CONTEÚDO DE PROTEÍNAS .....	27
4.10	OXIDANTES .....	27
<b>4.10.1</b>	<b>DCFH-DA.....</b>	<b>27</b>
<b>4.10.2</b>	<b>Indicador da formação de óxido nítrico (NO<sup>•</sup>).....</b>	<b>27</b>
4.11	MARCADORES DE DANOS OXIDATIVOS.....	28
<b>4.11.1</b>	<b>Grupos sulfidrílica.....</b>	<b>28</b>
<b>4.11.2</b>	<b>Carbonilação de proteínas .....</b>	<b>28</b>
4.12	DEFESAS ANTIOXIDANTES .....	28
<b>4.12.1</b>	<b>Superóxido dismutase (SOD).....</b>	<b>29</b>

4.12.2	<b>Glutationa (GSH)</b> .....	<b>29</b>
4.13	ANÁLISE BIOMECÂNICA .....	29
4.14	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>31</b>
5.1	ANÁLISES RADIOGRÁFICAS .....	31
5.2	CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS .....	33
5.3	CITOCINAS ANTI-INFLAMATÓRIAS E FATOR DE CRESCIMENTO .....	34
5.4	NÍVEIS DE OXIDANTES .....	35
5.5	NÍVEIS DE DANO OXIDATIVO E ANTIOXIDANTES .....	35
5.6	ENSAIO MECÂNICO .....	36
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>38</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>44</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>45</b>
	<b>ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</b> .....	<b>52</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Fraturas são uma realidade comum no Brasil, frequentemente associadas a acidentes, especialmente no trânsito, e têm um impacto significativo em termos de custos sociais e econômicos, resultando em um aumento na demanda por serviços de saúde pública (HERNLUND et al., 2013). O processo de regeneração óssea é um desafio ortopédico que ocorre em três fases sobrepostas: a fase inflamatória, a fase de formação do calo mole e a fase de formação do calo duro (SCHMIDT-BLEEK et al., 2015; XIE et al., 2017). Tratamentos inadequados ou tardios podem levar a diversas complicações, como enfraquecimento ósseo, cicatrização anormal e perda de função (PALANISAMY et al., 2022). Portanto, fica evidente a importância de compreender e aprimorar as intervenções no processo de reparação de tecidos ósseos.

A literatura traz o uso de intervenções mecânicas adequadas, controle do processo inflamatório local e aumento da vascularização como intervenções terapêuticas indispensáveis em fraturas. Dentre as possíveis intervenções o uso do ultrassom pulsado de baixa intensidade se destaca por regular positivamente a diferenciação osteogênica, mineralização óssea, angiogênese e área de volume ósseo (MCCARTHY; CAMCI-UNAL, 2021). Além de ser uma técnica não invasiva e com possibilidade de aplicação junto com fixações metálicas (PALANISAMY et al., 2022).

Outra intervenção eficaz é o exercício físico (GERMAIN et al., 2022). É evidente que a prática de atividades físicas é benéfica para o desenvolvimento esquelético (MUSTAFY et al., 2019). O exercício regula positivamente a diferenciação de células ósseas e regula todo o metabolismo da arquitetura óssea (ZHANG et al., 2022).

Esses efeitos são exibidos devido à capacidade de mecanotransdução, ou seja, a conversão do estímulo mecânico em um sinal bioquímico, na qual a deformação da membrana celular com tensão amplificada no citoesqueleto sensibiliza os mecanossensores da membrana e produz uma resposta bioquímica (STEWART et al., 2020).

A partir da literatura atual, são raras as evidências do uso isolado ou combinado do exercício aeróbio de intensidade moderada e ultrassom pulsado de baixa intensidade em modelos experimentais e clínicos de fratura óssea, embora sejam utilizados no dia a dia de profissionais Fisioterapeutas. Elucidar os fatores bioquímicos, radiológicos e biomecânicos das intervenções, sejam isolados ou combinados, se torna necessário. Desta forma, esse estudo busca resolver a seguinte pergunta de pesquisa: O exercício aeróbio de moderada intensidade

combinado ao ultrassom pulsado de baixa intensidade acelera o processo de consolidação óssea em ratos Wistar machos submetidos à um modelo de fratura tibial?

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Investigar os efeitos do tratamento com exercício aeróbio de intensidade moderada e/ou ultrassom pulsado de baixa intensidade no processo de consolidação óssea em modelo de fratura tibial em ratos Wistar.

#### **2.1.1 Objetivos específicos**

- a) Identificar a partir da análise radiográfica a formação de calo ósseo dos ratos Wistar submetidos ao modelo de fratura tibial;
- b) Avaliar os níveis proteicos de citocinas inflamatórias da tíbia dos ratos Wistar submetidos ao modelo de fratura tibial;
- c) Avaliar o quadro de estresse oxidativo da tíbia dos ratos Wistar submetidos ao modelo de fratura tibial;
- d) Avaliar as propriedades biomecânicas da tíbia dos ratos Wistar submetidos ao modelo de fratura tibial;
- e) Comparar o resultado das intervenções nas avaliações realizadas entre os grupos experimentais.

### **2.2 HIPÓTESE**

Nossa hipótese é de que a combinação do exercício aeróbio de intensidade moderada e ultrassom pulsado de baixa intensidade acelera o processo de consolidação de fraturas ósseas.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 CONSOLIDAÇÃO ÓSSEA

As fraturas estão entre as lesões traumáticas mais frequentes e comumente o osso inicia o processo de cicatrização e restaura sua forma, estrutura e função. O processo regenerativo pode variar de acordo com as condições biomecânicas e biológicas. Os fragmentos ósseos devem estar alinhados e estabilizados para reduzir o movimento interfragmentário resultante da carga externa exercida e da atividade muscular. A presença de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento desencadeiam vias de sinalização permitindo a migração, proliferação e diferenciação celular promovendo cicatrização óssea (WILDEMANN et al., 2021).

A gravidade da fratura, comorbidades, vascularização deficiente, tratamentos inadequados e alimentação deficiente de vitaminas pode levar a falha no processo de regeneração (GARCIA et al., 2013; LEIGHTON et al., 2021; ZURA et al., 2016). O tipo de consolidação óssea é dependente da distância entre os fragmentos, das condições mecânicas e a localização anatômica da fratura, podendo ser uma cicatrização óssea primária e direta ou uma cicatrização óssea secundária e indireta (CLAES; RECKNAGEL; IGNATIUS, 2012; EINHORN; GERSTENFELD, 2014; LOI et al., 2016; WILDEMANN et al., 2021).

Na cicatrização óssea primária e direta os fragmentos ósseos estão em contato sob fixação e compressão rígidas por placas e parafusos permitindo movimento interfragmentário mínimo. Na medida que os osteoclastos avançam com a reabsorção óssea no local da fratura, os osteoblastos seguem com deposição óssea, unindo sistemas de Havers e preenchendo com deposição direta de tecido ósseo intramembranoso. Esse tipo de cicatrização é semelhante ao processo fisiológico de remodelação óssea (CLAES; RECKNAGEL; IGNATIUS, 2012; EINHORN; GERSTENFELD, 2014).

Por outro lado, na cicatrização óssea secundária e indireta os fragmentos ósseos não alcançam rigidez completa, permitindo movimento interfragmentário quando fixados por talas externas, hastas intramedulares ou fixadores externos. Neste caso, a regeneração é endocondral e alcançada indiretamente por eventos celulares que iniciam na fase inflamatória com recrutamento e proliferação celular; posteriormente tem início a formação de tecido cartilaginoso conhecido como formação de calo mole; em seguida, esse tecido é substituído por fragmentos ósseos conhecido como formação de calo duro; e finalizado com remodelação da arquitetura óssea (SCHMIDT-BLEEK et al., 2015; XIE et al., 2017).

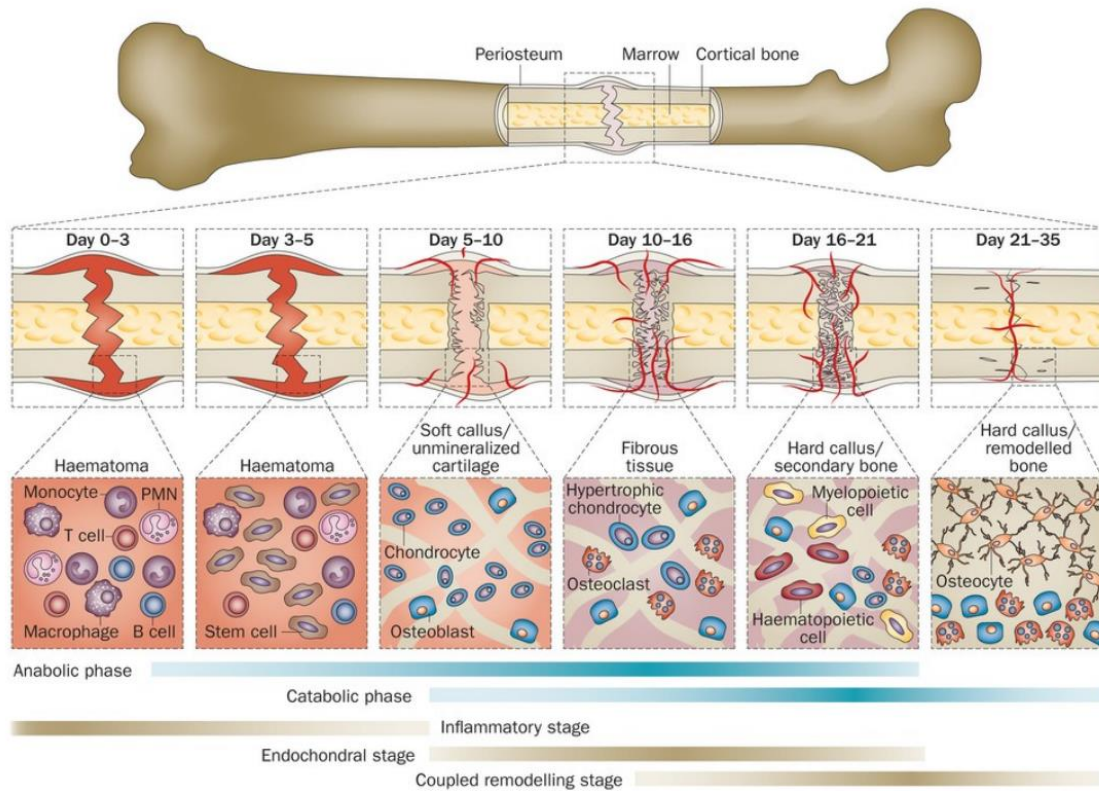
O processo inflamatório inicial do reparo envolve a formação de hematoma e indução da resposta imune. Devido a fragmentação óssea há uma ruptura na vascularização local e dos tecidos circundantes, desencadeando ativação de plaquetas e a formação do hematoma fibroso. Em conjunto, osteócitos, osteoblastos e células endoteliais locais iniciam resposta imune liberando citocinas inflamatórias, atraindo células imunes no local da fratura. Os neutrófilos e monócitos invadem o local da fratura, e recrutam linfócitos e eosinófilos. Os monócitos, no primeiro momento, diferenciam-se em macrófagos pró-inflamatórios do tipo M1 sustentando a resposta pró-inflamatória, sendo a depleção de M1 desvantajosa para o processo de consolidação óssea por reduzir níveis de citocinas como IL-6 e TNF- $\alpha$ . Nesse ambiente cicatricial há grande presença de citocinas inflamatórias como IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$  (HOZAIN; COTTRELL, 2020a; HUANG et al., 2017; NEWMAN; SHIH; VARGHESE, 2021).

A resolução da fase inflamatória é impulsionada por macrófagos anti-inflamatórios M2, importantes para supressão da resposta inflamatória, secretando citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e IL-4 (HUANG et al., 2017). Em conjunto ao processo, as células tronco se diferenciam em condrócitos e na medida que se proliferam secretam proteínas da matriz extracelular (MEC) formando um tecido cartilaginoso que caracteriza a formação do calo mole não mineralizado (LEE; JAIN; ALIMPERTI, 2021). A partir da hipertrofia e apoptose do condrócitos, os osteoclastos degradam o tecido cartilaginoso formado, permitindo a formação de novos vasos. Em conjunto as células osteoblásticas se ligam nessa matriz cartilaginosa secretando matriz óssea (EINHORN; GERSTENFELD, 2014).

A presença de fatores de crescimento como TGF- $\beta$  e VEGF também exibem funções moduladoras de células imunes e induzem um ambiente pró-regenerativo atuando nas células endoteliais (contribuindo para a angiogênese) e células osteogênicas (NEWMAN; SHIH; VARGHESE, 2021). A atividade dos osteoblastos e osteoclasto é contínua por um período prolongado de absorção e remodelação óssea. Desta forma, o espaço medular se reestabelece na presença das células mieloproteicas e hematoproteicas (EINHORN; GERSTENFELD, 2014).



Figura 1 - Processo de consolidação óssea.



Fonte: Lee; Jain; Alimperto (2021)

### 3.2 PROPRIEDADES BIOMECÂNICAS ÓSSEA

O osso é um órgão de suporte mecânico com propriedades mecânicas únicas. Sua estrutura pode ser afetada por fatores ambientais como estímulos mecânicos e durante a manutenção da saúde do tecido ósseo (WEINER; WAGNER, 2003). A matriz óssea é composta principalmente por hidroxiapatita (40 – 45% do volume) e colágeno (55 – 60% do volume) (JI; GAO, 2004) e capaz de atingir propriedades mecânicas de resistência e tenacidade devido a sua composição. Desta forma, estímulos mecânicos como estresse compressivo, estresse de tração, estresse de cisalhamento e estresse de envergamento impactam significativamente nos componentes da matriz (SHUAI et al., 2018).

Para avaliar a tenacidade e resistência da matriz óssea ensaios mecânicos são realizados com influências de forças aplicadas externamente. A carga gera deformação na estrutura e pode ser mensurada a partir de uma curva de carga-deformação ou estresse-deformação. Esta curva revela a elasticidade, plasticidade até a falha da estrutura. Cargas na região elástica não sofrem deformação permanente, porém quando excedido o ponto de cadência (limite elástico) haverá deformação permanente. A curva da região elástica representa

a tenacidade do tecido, e pode ser calculada a partir do módulo de Young através da divisão do estresse na porção elástica pela deformação alcançada naquele ponto. Quanto maior o módulo de Young mais rígido será o tecido (NORDIN, 2003).

Em diferentes níveis estruturais as propriedades mecânicas ósseas variam. Por exemplo: o módulo de Young do osso cortical é maior do que o do osso esponjoso. Isto pode ser justificado ao fato de que o principal papel do osso cortical humano é fornecer suporte mecânico, por vez, em direção longitudinal sua resistência é maior do que quando em direção transversal (MA et al., 2022). Um estudo de TURNER et al., (1999) objetivou medir e comparar os módulos de Young de tecidos ósseos trabeculares e corticais de um doador humano comum. Obtiveram como resultado que o módulo de Young do osso cortical na direção longitudinal foi cerca de 40% maior do que ( $p < 0,01$ ) o módulo de Young na direção transversal.

Além disso, o comportamento biomecânico ósseo varia conforme atividade imposta. Por ter características viscoelásticas em altas cargas de estresse é mais resistente e sustenta mais energia antes da falha. Isto impacta no padrão de fraturas, pois quando alcança a falha (fratura) há liberação de energia através da fissura. Em baixa carga de estresse a energia dissipa em uma única fissura com pouco ou sem deslocamento de fragmentos ósseos. Em alta carga de estresse a energia se dissipa rápido em uma única fissura e pode resultar em fragmentos ósseos (NORDIN, 2003).

### 3.3 MECANOTRANSDUÇÃO

A estimulação mecânica, segundo alguns autores, pode induzir a formação óssea das seguintes formas: ao estimular células ósseas, a estimulação mecânica pode ativar várias vias de sinalização e converter sinais mecânicos extracelulares (SHUAI et al., 2018). A estimulação mecânica pode ativar canais iônicos de cálcio na membrana celular, induzir o influxo de íons cálcio extracelulares e aumentar a concentração intracelular de íons cálcio (MORITA et al., 2013). A deformação devido a carga aumenta a pressão do fluido que se acumula no osso e direciona o fluxo de fluido de correntes iônicas nos microcanais desempenhando um papel na remodelação óssea (XU; HOU; WANG, 2011).

O processo pelo qual as células convertem os estímulos mecânicos em uma resposta química, ou seja, desencadear processos intracelulares, é descrito como mecanotransdução. Segundo DUNCAN; TURNER, (1995) o processo de mecanotransdução pode ser dividido em etapas: acoplamento mecânico, acoplamento bioquímico, transmissão de sinal e resposta da célula efetora.

O acoplamento mecânico ou mecanoacoplamento é a carga mecânica causa deformação das células ósseas. As forças de cisalhamento da oscilação do fluido intersticial atuam sobre os osteócitos através do aumento do fluxo intersticial, que por vez, gera deformação na membrana celular e produz uma tensão amplificada no citoesqueleto de actina (THOMPSON; RUBIN; RUBIN, 2012).

O acoplamento bioquímico é a deformação das células ósseas é convertido em vias de sinalização intracelular. Os mecanossensores são responsáveis pelo reconhecimento de forças mecânicas. Entre eles, as integrinas, proteínas transmembrana que atuam através de complexos de adesão focal. Estas por vez, transmitem forças mecânicas extracelulares para o meio intracelular e ativam cascatas de sinalização de mecanotransdução como as vias de quinase. Os canais de cálcio, ativados pelo aumento do fluxo de fluido com aumento nos níveis de cálcio intracelular. Deste modo, inicia a ativação de cascatas de sinalização da quinase, ATP e óxido nítrico (NO), além do aumento intracelular de cálcio estimular a liberação de prostaglandina 2 (PGE2) (RUBIN; RUBIN; JACOBS, 2006; STEWART et al., 2020).

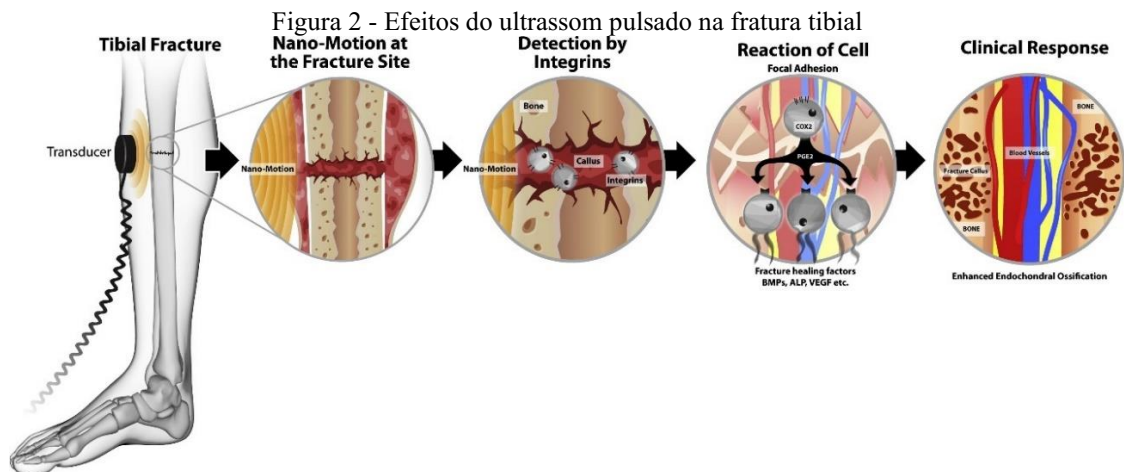
Na transmissão de sinal o sinal bioquímico é transmitido da célula sensora para célula efetora. Indiretamente, células de revestimento ósseo liberam fatores parácrinos como a PGE2 estimulando células osteoprogenitoras a diferenciação em pré-osteoblastos e posterior em osteoblastos, que se fixam na matriz óssea e produzem nova matriz. Além de a PGE2 atuar nos osteoblastos e estimular a fosfatase alcalina e a síntese de colágeno (KLEIN-NULEND et al., 1997; STEWART et al., 2020).

Na resposta da célula efetora ocorre a formação de novo osso. A formação óssea está relacionada com a taxa de variação de carga aplicada e leva um intervalo de três a cinco dias após o estímulo mecânico para que a formação óssea seja identificada. Níveis inadequados de tensão haverá estímulo inadequado resultando em falha da mecanotransdução e redução da massa óssea (DUNCAN; TURNER, 1995; RUBIN; LANYON, 1985).

### 3.4 ULTRASSOM PULSADO DE BAIXA INTENSIDADE E CONSOLIDAÇÃO ÓSSEA

Além do dano na arquitetura, alterações ósseas podem ser reguladas por fatores químicos, hormonais e através de carga mecânica. Como fonte de estimulação mecânica o uso do ultrassom pulsado de baixa intensidade (USP) se torna interessante devido à propagação de ondas e efeitos fisiológicos térmicos e não térmicos (MCCARTHY; CAMCI-UNAL, 2021).

O mecanismo por trás da osteossíntese através do uso de USP é a mecanotransdução. Inicialmente os osteócitos reconhecem os sinais mecânicos no tecido ósseo (Figura 2). Essa carga mecânica faz com que flua o fluido ao redor das células dos osteócitos. Por outro lado, para que esse sinal mecânico seja reconhecido e provoque resposta biológica é preciso que seja detectado pelas proteínas integrinas, mecanossensores. A partir desse estímulo ocorre a formação de adesões focais, conseqüentemente, fosforilação da quinase de adesão focal (FAK) e ativação da via Akt. Corroborando, estas vias levam a ativação da Ciclooxygenase 2 (COX-2) e Prostaglandinas 2 (PGE2) contribuindo com papel significativo na formação óssea, pois aumentam a mineralização e regulam positivamente a expressão de proteínas osteogênicas como a proteína morfogênica óssea (BMP), fosfatase alcalina (ALP) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (HARRISON et al., 2016; TANG et al., 2023).



Fonte: Harrison et al., (2016)

Desta forma, a consolidação óssea é influenciada pelas condições mecânicas locais como o tipo e complexidade da fratura, estabilidade de fixação e carga externa recebida, em que o movimento interfragmentario guiado por uma carga externa ou atividade muscular gera deformação do tecido caloso e tensão entre os fragmentos ósseos, induzindo a diferenciação das células locais, beneficiando a formação de tecido fibroso, cartilaginoso e tecido ósseo (MCCARTHY; CAMCI-UNAL, 2021).

ZHU et al., (2020) em seu estudo, trouxe que a intervenção de USP contribui no controle da osteonecrose, além de melhorar a tolerância a carga e acelerar o processo de regeneração através da diferenciação óssea e angiogênese em um modelo de osteonecrose em coelhos. KUANG et al., (2019) mostrou in vitro que o USP aumenta a expressão dos genes ALP, Runx2 e COL-I em células foliculares dentais. Em contraste, GOSHIMA et al., (2022)

em seu estudo clínico com 90 pacientes submetidos a uma osteotomia tibial alta com cunha demonstrou que o USP não promoveu consolidação óssea e recuperação funcional. Este resultado é justificado pelos próprios autores por fatores limitantes como a aplicação do USP apenas após duas semanas da intervenção cirúrgica e por avaliação apenas em uma radiografia AP.

### 3.5 EXERCÍCIO E CONSOLIDAÇÃO ÓSSEA

Outro fator capaz de estimular mecanicamente o osso e intensificar a absorção e reabsorção com aumento da massa óssea é a prática regular de exercícios físicos. Este por vez, é conhecido por exercer um efeito anabólico no tecido ósseo e na densidade mineral (DMO). Estudos trazem que diferentes exercícios exibem efeitos diferentes no estado ósseo. Observou-se que em esportes advindos de impactos e tensões ósseas, como a corrida, são candidatos a induzir efeitos osteogênicos e adaptações ósseas (GERMAIN et al., 2022; JU et al., 2020; LOGAN et al., 2022). Estes efeitos podem ser justificados pela mecanostransdução.

Durante a realização de exercícios físicos as fibras colágenas no osso sofrem vários tipos de movimentações, submetendo o osso à um estresse mecânico. Em resposta, o colágeno, sendo de natureza piezoelétrica, desenvolve cargas perante estresse (papel importante na regeneração óssea controlada). A aplicação de cargas compressivas fisiológicas aumenta as cargas negativas devido ao potencial piezoelétrico no osso, potencializando a regeneração óssea por controlar metabolismo celular, como crescimento, proliferação e diferenciação (KHARE; BASU; DUBEY, 2020).

Estudos trazem que a atividade física, por meio de melhora nas características musculoesqueléticas, parece ser uma estratégia de intervenção ideal de prevenção de fraturas (KARLSSON; ROSENGREN, 2020). Além disso, BRUDER et al., (2017) trouxe que começar o exercício cedo combinado com um período de imobilização mais curto é mais eficaz do que iniciar o exercício após um período de imobilização mais longo.

Além disso, o exercício manifesta uma complexa rede de respostas metabólicas provenientes de sua prática dentre os quais seus benefícios são geralmente associados a respostas anti-inflamatórias. Durante a execução do exercício físico, miócitos realizam a liberação de citocina IL-6. Esta interleucina e induz um aumento subsequente na produção do receptor antagonista de IL-1 (IL-1ra) e IL-10 por células mononucleares do sangue (BENATTI; PEDERSEN, 2015; CASTROGIOVANNI et al., 2019; GLEESON et al., 2011). A IL-1ra se liga ao mesmo receptor de IL-1, e impede a ligação da IL-1 ao seu receptor (WOODELL-MAY;

SOMMERFELD, 2020). Já a IL-10, a literatura sugere que possua como principal função a regulação negativa das respostas imunes adaptativas e a minimização do dano tecidual induzido pelos efeitos pró-inflamatórios (GLEESON et al., 2011). Além disto, embora o TNF- $\alpha$  estimule a produção de IL-6 em macrófagos (efeito pró-inflamatório), a IL-6 liberada pela contração muscular induz um feedback negativo inibindo a produção de TNF- $\alpha$  (efeito anti-inflamatório) (BENATTI; PEDERSEN, 2015).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 TIPO DE ESTUDO

Trata-se de uma pesquisa experimental, randomizada, controlada em laboratório e realizada em ratos do tipo Wistar.

### 4.2 PROCEDIMENTOS ÉTICOS

Este projeto foi submetido à Comissão Ética para Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, tendo todos os procedimentos em conformidade com as diretrizes brasileiras para o uso de animais com propósitos científicos e didáticos (Lei 11.794, DOU 27/5/13, MCTI, p.7) e aprovado sob o número do protocolo 28/2023 no dia 11 de abril de 2023 (Anexo A).

### 4.3 ANIMAIS

Foram utilizados 28 ratos Wistar macho de dois meses pesando entre 250-300g, provindos da colônia de reprodução do Biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC. Com base nas instruções divulgadas pelos comitês de éticas no uso de animais, as pesquisas animais preconizam a utilização dos 3R's: Substituição (Replacement), Redução (Reduction), Refinamento (Refine) (RUSSELL,1959). Dessa forma, objetivando o uso mínimo de animais necessários para obtenção dos resultados, o número de animais baseou-se em uma revisão de estudos com modelos animais para a possibilidade de uma diferença de até 20-25% nos parâmetros a serem analisados entre os grupos, com uma variância de até 10%, calculadas com a ferramenta EDA (DU SERT et al., 2017; GABBAI-ARMELIN et al., 2019; KIDO et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2012; PATROCÍNIO-SILVA et al., 2014). Cada grupo foi composto por 07 animais, e foram destinados para análise radiográfica, análise de propriedades biomecânicas e testes bioquímicos. Os animais foram agrupados em gaiolas específicas (comprimento 30 cm x largura 20 cm x altura 13 cm) colocados sobre estantes e sob os cuidados dos funcionários do Biotério. A temperatura do ambiente foi controlada entre  $20 \pm 2^\circ \text{C}$ , ciclo claro-escuro 12/12 h com livre acesso, alimentados com dieta padrão para roedores e água do sistema público de fornecimento (torneira) colocado em mamadeiras para roedores e ofertada *ad libitum*.

Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais com “n” de 07 cada grupo, sendo (Figura 3):

Grupo 1 – Fratura Tibial (FT);

Grupo 2 – Fratura Tibial + Ultrassom Pulsado (FT + USP);

Grupo 3 – Fratura Tibial + Exercício aeróbio (FT + Ex);

Grupo 4 – Fratura Tibial + Exercício aeróbio + Ultrassom Pulsado (FT + USP + Ex).

Devido à padronização do modelo de fratura tibial descrito por (WU et al., 2021) não houve a necessidade da inclusão de grupo controle sem fratura tibial.



Fonte: elaborado pelo autor

#### 4.4 MODELO DE FRATURA TIBIAL

O modelo de fratura tibial foi feito conforme descrito por (WU et al., 2021). Os procedimentos cirúrgicos foram realizados em condições estéreis e com os animais anestesiados com cetamina (0,3ml/kg) e xilazina (0,3ml/kg). A pata esquerda traseira foi tricotomizada no dia anterior à cirurgia. Foi realizado uma incisão cutânea mínima sobre a parte ântero-medial da tíbia. Devido ao tecido ósseo nesta região ser mais superficial, sem tecido muscular entre o tecido epitelial e o tecido ósseo, foi necessário somente afastar o tecido cutâneo para ter acesso



à tibia e realizar a osteotomia transversa na diáfise, a qual foi realizada com uso de uma mini serra, sem causar danos ao tecido muscular local. A cavidade medular foi lavada com solução salina 0,9%. Um fio de aço de Kirschner de 1,0 mm foi usado para estabilizar a fratura no canal medular (Figura 4). O fio foi conduzido no canal medular na porção proximal e distal a fratura de forma manual. A incisão foi fechada com fios de suturas Nylon 4.0.

Figura 4 - Modelo de fratura tibial



Fonte: acervo próprio

#### 4.5 DESENHO EXPERIMENTAL

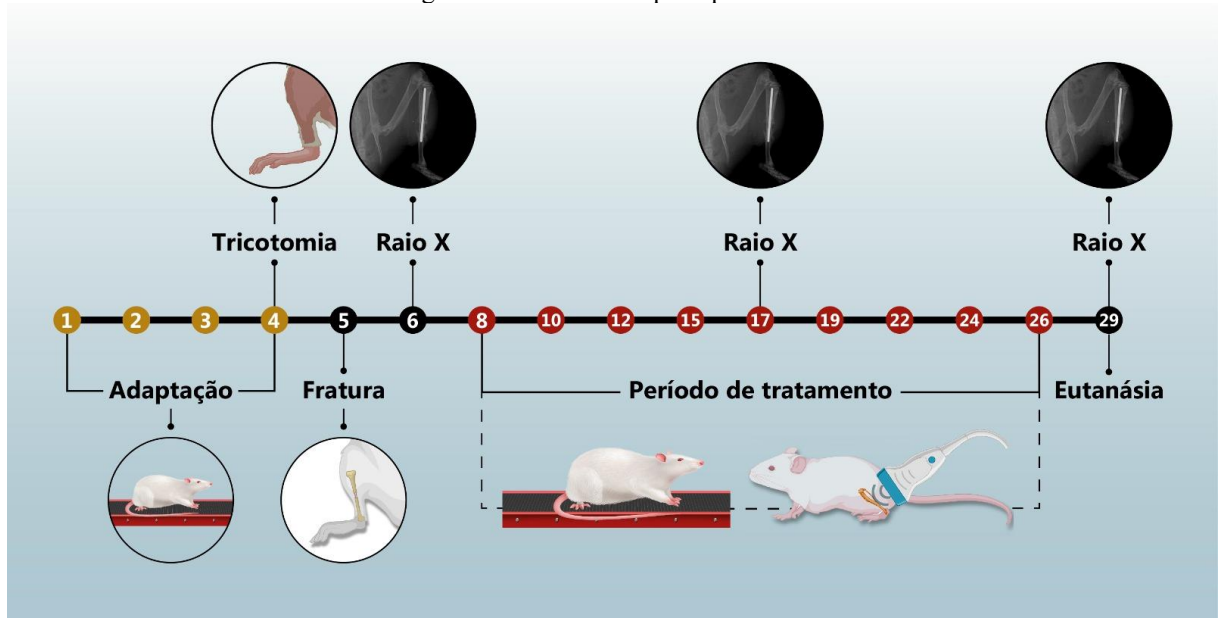
Inicialmente os animais passaram por quatro dias (1°, 2°, 3° e 4° dias) de adaptação na esteira ergométrica. No 4° dia da semana de adaptação os animais foram tricotomizados. Após 24 horas (5° dia) foi realizado o procedimento cirúrgico de fratura tibial. No 6° dia foi realizado a primeira análise de radiografia (n-7 animal/grupo).

Conforme observado em experimentação piloto, o quadro algico dos animais é mais evidente em até 72 horas de fratura tibial. Desta forma, para este estudo as intervenções de tratamento iniciaram 72 horas (8° dia) após a fratura tibial. Com objetivo de mimetizar a prática clínica, os tratamentos de USP e/ou Ex foram realizados três vezes na semana, por três semanas. No 17° e 29° dia foram realizadas as radiografias do período de tratamento e anterior à eutanásia, respectivamente.

Os animais foram submetidos à eutanásia 72 horas após a última sessão do tratamento, no 29° dia. A partir disso, a tibia foi cirurgicamente removida e imediatamente processada e

armazenada em tampão fosfato 0,1 M para análise da propriedade biomecânica (n-7 animal/grupo), sendo essas as mesmas amostras para análises bioquímicas (n-7 animal/grupo) (Figura 5).

Figura 5 - Linha do tempo experimental



Fonte: elaborado pelo autor

## 4.6 INTERVENÇÕES

### 4.6.1 ULTRASSOM PULSADO DE BAIXA INTENSIDADE

Para os grupos experimentais que receberam intervenção de ultrassom pulsado (FT + USP e FT + USP + Ex), foi utilizada uma máquina de ultrassom pulsado de baixa intensidade (Empresa Imbramed, Brasil), com tempo de aplicação de 10 minutos de duração, frequência de 1,5 MHz, intensidade de 0,4 W/cm<sup>2</sup> e área de radiação efetiva (ERA) de 3 cm<sup>2</sup>. Para cada rato, a área tratada com USP foi de aproximadamente 2 cm<sup>2</sup> localizando-se na região da diáfise da tíbia, de forma estacionária contendo gel salina 0,9% no cabeçote. Para cada aplicação de ultrassom, os ratos foram anestesiados com isoflurano a 4% e mantidos anestesiados com solução de isoflurano a 2% (MCCARTHY; CAMCI-UNAL, 2021).

Quadro 1 - Dose de aplicação do ultrassom pulsado

<b>DOSE DE APLICAÇÃO</b>	
Tempo	10 minutos
Frequência	1,5 MHz
Intensidade	0,4 W/cm <sup>2</sup>
Área de radiação efetiva	3 cm <sup>2</sup>

Fonte: elaborado pelo autor

#### 4.6.2 EXERCÍCIO

Os grupos experimentais que receberam intervenção de exercício aeróbio (FT + Ex e FT + USP + Ex) foram submetidos à prescrição de exercício físico em solo em uma esteira ergométrica própria para experimentação animal, por três semanas, conforme protocolo adaptado de CIFUENTES et al., (2010). Inicialmente, anterior à intervenção cirúrgica de fratura tibial, os animais passaram por quatro dias de adaptação (semana 0), por 10 minutos de treinamento, com velocidade de 10 metros/min. Posterior à adaptação e início das intervenções de tratamento, na semana 01, a velocidade da esteira foi de 13 metros/min com tempo de execução de 30 minutos. Na semana 02 utilizada velocidade de 14 metros/min sendo o tempo de execução de 30 minutos. Na semana 03 utilizada velocidade de 15 metros/min sendo o tempo de execução também de 30 minutos. Em todas as semanas foi utilizada inclinação de 1%. As intensidades e volumes de treinamento correspondem a intensidades moderadas, correspondentes a aproximadamente 50% a 60% do VO<sub>2</sub> máx (CIFUENTES et al., 2010; LEANDRO et al., 2007).

Quadro 2 - Protocolo de exercício em esteira

<b>FREQUÊNCIA</b>	<b>VELOCIDADE (metros/minutos)</b>	<b>INCLINAÇÃO (%)</b>	<b>DURAÇÃO</b>
Semana 0	10 metros/minutos	1%	10 minutos
Semana 1	13 metros/minutos	1%	30 minutos
Semana 2	14 metros/minutos	1%	30 minutos
Semana 3	15 metros/minutos	1%	30 minutos

Fonte: Adaptado de Cifuentes et al., (2010).

#### 4.7 RADIOGRAFIA

As radiografias (n-7 animal/grupo) foram realizadas 24h após o procedimento cirúrgico de fratura tibial, durante o período de tratamento e anterior à eutanásia. As radiografias digitais foram feitas usando uma unidade de raios X móvel do Serviço de Odontologia das Clínicas Integradas da Universidade de Extremo Sul Catarinense – UNESC. Os animais foram mantidos sob anestesia com cetamina 0,3 ml/kg e xilazina 0,3 ml/kg. Para vista anteroposterior os animais ficaram em decúbito dorsal. Para definir a união da fratura foram utilizados três observadores cegos. O cegamento foi feito em codificação utilizando números, sem conhecimento do observador sobre o animal e grupo experimental. Para julgar a união das fraturas foi utilizado um escore de pontuação do local da fratura descrito por AKMAN et al., (2002):

Quadro 3 - Escore radiográfico

ESCORE	DESCRIÇÃO
0	Nenhum tecido ósseo formado
1	Formação de calo mole
2	Início da união óssea
3	Desaparecimento da linha de fratura
4	União óssea completa

Fonte: Akman et al., (2002).

#### 4.8 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE CITOCINAS

A fim de determinar-se a concentração de citocinas inflamatórias nos tecidos ósseos de tibia (7 animais/grupo), foi realizado o imunoenensaio de imunoadsorbância enzimática - ELISA sanduiche indireto (DuoSet ELISA) utilizando amostras das estruturas avaliadas em duplicatas avaliadas 72 horas após o último dia de intervenção. As amostras foram primeiramente homogeneizadas em tampão de lise com inibidores de proteases, com o intuito de preservar o conteúdo proteico da amostra de interesse. Com as amostras devidamente preparadas, as placas de ELISA foram sensibilizadas com um anticorpo de captura específico (diluição 1:100), deixando *overnight* a 4 °C. No dia posterior, as placas foram lavadas com tampão de lavagem (Tween 20 e NaCl), bloqueadas (ELISA / ELISPOT Diluent) e incubadas por uma hora a temperatura ambiente. As amostras dos tecidos de interesse foram então pipetadas em duplicata na placa (100 microlitros), sobre seus respectivos anticorpos de captura. Após duas horas de incubação, as placas passaram novamente pela etapa de lavagem, a fim de

remover-se as ligações inespecíficas. Posteriormente, foi adicionado o anticorpo de detecção, o qual se liga aos antígenos da amostra formando assim um “sanduiche” de anticorpo e amostra. Após período de incubação à temperatura ambiente e posterior etapa de lavagem, foi adicionado 100 microlitros de uma solução contendo uma enzima peroxidase (HRP). Sob esta solução, adicionou-se um substrato cromogênico, o tetrametilbenzidina (TMB), a qual em presença da HRP emite uma coloração azul específica. Para parar esta reação, utilizou-se 50  $\mu$  por poço de ácido sulfúrico diluído. A concentração das citocinas inflamatórias (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-4, IL-10) e fatores de crescimento como (TGF- $\beta$ ) foram determinadas via leitura da absorbância (450 nm) em espectrofotômetro (BIO-RAD, 680).

#### 4.9 CONTEÚDO DE PROTEINAS

O teor de proteína a partir de tecido ósseo homogeneizado foi ensaiado utilizando albumina de soro bovino como um padrão, de acordo com LOWRY et al., (1951). Após o reagente fosfomolibdico<sup>-</sup> fosfotúngstico (folin fenol) ser adicionado para ligar-se à proteína o reagente foi lentamente reduzido passando de amarelo para azul e a absorbância foi lida a 750nm.

#### 4.10 OXIDANTES

##### 4.10.1 DCFH-DA

Os níveis de 2,7-diclorofluoresceína oxidada (DCF) (n-7 animais/grupo) foram monitorados em amostras incubadas com 10 mM diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA) a 37 °C por 30 minutos. A formação de derivados fluorescentes oxidados foi monitorada em comprimentos de onda de excitação e emissão de 488 e 525nm, respectivamente, usando um espectrofotômetro de fluorescência. Uma curva padrão DCF foi medida usando 10 mM DCF como um controle interno no experimento, e os resultados foram expressos como intensidade de fluorescência (WANG; JOSEPH, 1999).

##### 4.10.2 Indicador da formação de óxido nítrico (NO $\cdot$ )

A produção de NO $\cdot$  (n-7 animais/grupo) foi avaliada espectrofotometricamente através do metabolito estável nitrito. Para mensurar o conteúdo de nitrito, as amostras foram incubadas com reagente Griess (1 % sulfanilamida em 0,1 mol/L HCl e 0,1 % de dicloridrato de n-(1-naftil)-etilenodiamina) em temperatura ambiente por 10 minutos e a absorbância foi medida a 540 nm usando leitor de microplacas. O conteúdo de nitritos foi calculado com base em uma curva padrão de 0 a 100 nM realizada com o metabolito nitrito de sódio. Os resultados foram calculados em  $\mu$ mol nitrito/mg proteína (CHAE et al., 2004).

#### 4.11 MARCADORES DE DANOS OXIDATIVOS

##### 4.11.1 Grupos sulfidrila

O teor de tiol total (n-7 animais/grupo) foi determinado usando o método com DTNB (reagente de Ellman). Resumidamente, 30 mL de amostra foram misturados com 1 mL de solução salina tamponada com fosfato/1 mM de EDTA (pH 7,5). A reação foi iniciada pela adição de 30  $\mu$ L de solução estoque de DTNB 10 mM em solução salina tamponada com fosfato. Amostras de controle, que não incluem DTNB ou proteína, foram executadas simultaneamente. Após incubação por 30 minutos em temperatura ambiente, foi realizada leitura da absorbância em 412 nm e calculada a quantidade de TNB (equivalente à quantidade de grupos sulfidrila) (AKSENOV; MARKESBERY, 2001).

##### 4.11.2 Carbonilação de proteínas

O dano oxidativo de proteínas (n-7 animais/grupo) foi determinado mediante a quantificação de proteínas carboniladas através da reação de grupos carbonilas com a 2,4-dinitrofenilhidrazina. As proteínas foram precipitadas pela adição de ácido tricloroacético a 20% e reação com 2,4-dinitrofenilhidrazina. As amostras foram então redissolvidas em cloridrato de guanidina 6M e os conteúdos de carbonila foram determinados medindo a absorbância em 370 nm e usando um coeficiente de absorção molar de 22.000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (LEVINE et al., 1990).

#### 4.12 DEFESAS ANTIOXIDANTES

#### 4.12.1 Superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD (n-7 animais/grupo) foi determinada pela inibição da oxidação da adrenalina. As amostras de tibia foram homogeneizadas em tampão de glicina. Volumes de 5, 10 e 15 µl de amostra foram separados após homogeneização e 5 ml de catalase (0,0024 mg/ml em água destilada), 175-185 ml de tampão glicina (0,75 g em 200 ml de água destilada a 32 °C, pH 10,2), e 5 µl de adrenalina (60 mM em água destilada mais 15 ml/ml de HCl fumegante) foram adicionados, incubados por 180 segundos em intervalos de 10 segundos e medidos em um leitor SpectraMax i3xELISA a 480 nm. Os valores foram expressos como unidade SOD/mg de proteína (U/mg de proteína) (BANNISTER; CALABRESE, 1987).

#### 4.12.2 Glutathione (GSH)

Os níveis de GSH (n-7 animais/grupo) foram determinados como descrito por Hissin & Hilf, com algumas adaptações. GSH foi mensurada nas amostras de tecido após precipitação de proteína com ácido tricloroacético a 10%. Em parte da amostra foi adicionado 800 mM de tampão fosfato (pH 7,4) contendo 500 mM de o-ftaldialdeído. O desenvolvimento de cor resultante a partir da reação entre o-ftaldialdeído e tióis atingiu o máximo em 5 minutos e manteve-se estável durante mais de 30 min. A absorbância foi lida a 412 nm depois de 10 min. Uma curva padrão de glutathione reduzida foi usada para calcular os níveis de GSH nas amostras. Os resultados são expressos como U fluorescência/mg de proteína (HISSIN; HILF, 1976).

### 4.13 ANÁLISE BIOMECÂNICA

Para avaliar as propriedades biomecânicas do tecido, após a eutanásia (7 animais/grupo) a tibia foi cuidadosamente removida e armazenada em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4) à temperatura ambiente (20-22°C). A partir disso, esse tecido ósseo foi testado a uma taxa de deformação constante até a falha na flexão de três pontos sob controle de deslocamento a 5 mm/min (MEDALHA et al., 2016; PARISI et al., 2020; PATROCÍNIO-SILVA et al., 2014) em máquina universal de ensaios (EMIC - DL 10 000; INSTRON Brasil Equipamentos Científicos Ltda, São José do Rio Preto, Brasil). Durante o ensaio mecânico as tíbias foram posicionadas em um dispositivo metálico de 3,8 cm, que proporciona uma distância de 1,8 cm entre os dois suportes, conforme descrito por (LIRANI-GALVÃO; JORGETTI; LOPES DA SILVA, 2006). A célula de carga foi posicionada perpendicularmente no local exato do defeito

ósseo, no sentido latero-medial. Foi utilizado uma célula de carga com capacidade máxima de 1 kN. A partir da curva carga-deformação, foi observado a carga máxima (em quilograma-força) e deformação até força máxima (mm/mm).

Figura 6 - Imagem da máquina de ensaio mecânico de flexão de três pontos.



Fonte: elaborado pelo autor.

#### 4.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados da análise radiográfica foram analisados pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk, em seguida, por análise de variância ANOVA de medidas repetidas seguido de teste *post hoc* de Tukey. Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Os valores foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ . Os resultados bioquímicos e biomecânicos foram analisados pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk, seguido da análise de variância ANOVA de uma via. Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Os valores foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ . Foi utilizado o GraphPad Prisma versão 8.0.1 como pacote estatístico.

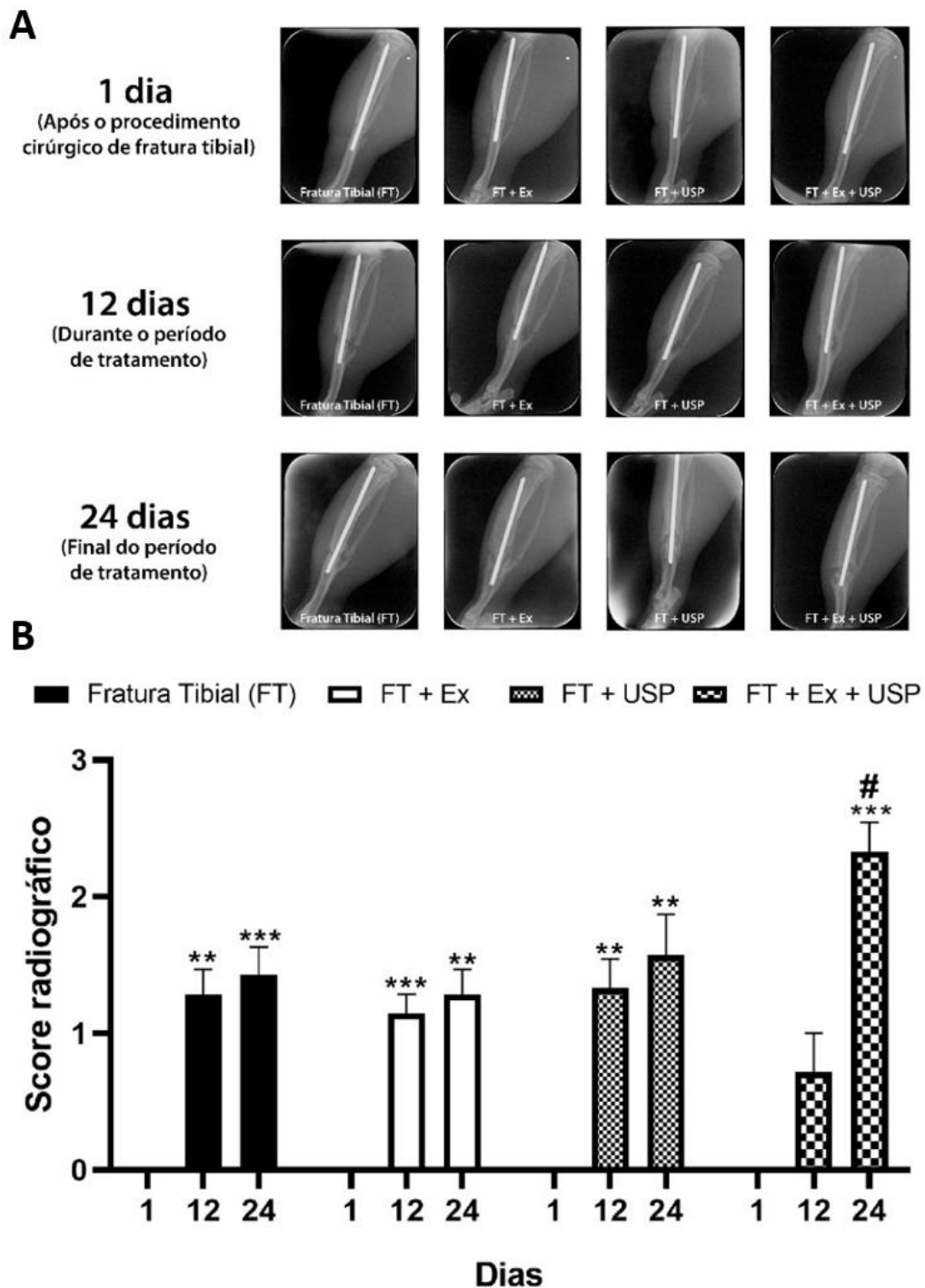


## 5 RESULTADOS

### 5.1 ANÁLISES RADIOGRÁFICAS

A Figura 7 demonstra a melhora dos padrões radiográficos entre os dias e entre os diferentes grupos. Na parte B da Figura 7 pode ser visto que com 12 dias de tratamento houve aumento dos escores radiográficos nos grupos FT, FT + Ex e FT + USP quando comparados a 1 dia ( $p < 0,01$ ), sendo o grupo FT + Ex um aumento de ( $p < 0,001$ ). Com 24 dias houve um aumento significativo em todos os grupos experimentais, sendo grupo FT ( $p < 0,001$ ), FT + Ex ( $p < 0,01$ ), FT + USP ( $p < 0,01$ ) e FT + Ex + USP ( $p < 0,001$ ) quando comparados a 1 dia. Além disso, o grupo FT + Ex + USP apresentou aumento significativo quando comparado ao tempo de 12 dias no mesmo grupo experimental ( $p < 0,001$ ).

Figura 7 - Análise radiográfica



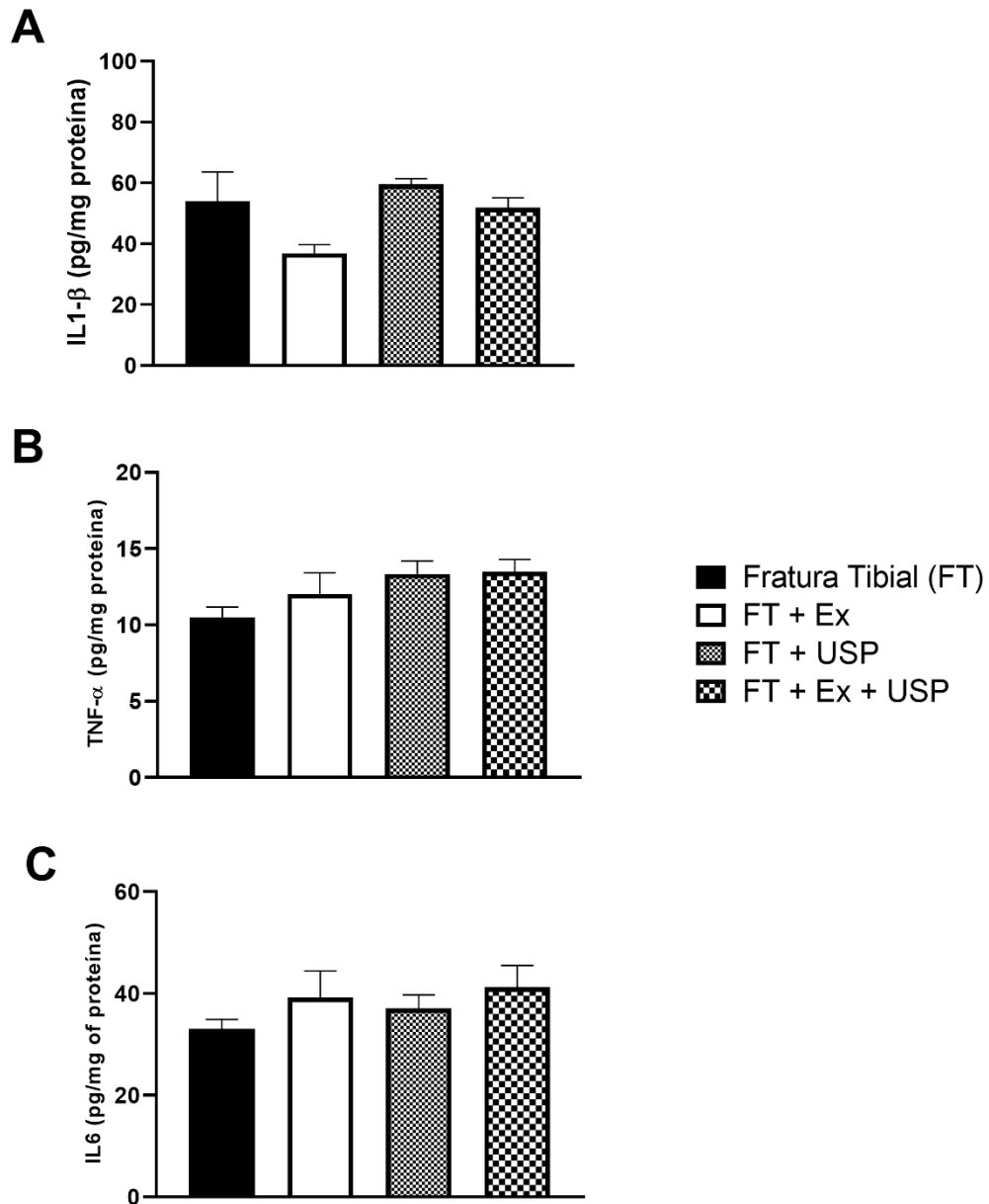
Fonte: elaborado pelo autor

Legenda: Em A - Imagens radiográficas representativas. Em B – Quantitativo do escore radiográfico. Abreviações: FT, fratura tibial; Ex, exercício; USP, ultrassom pulsado. Os dados são apresentados em Média ± EPM, no qual: \*\* $p < 0,01$  v.s tempo 1; \*\*\* $p < 0,001$  v.s tempo 1. # $p < 0,05$  v.s tempo 12. (ANOVA de medidas repetidas seguido de teste *post hoc* de Tukey).

## 5.2 CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS

Não foi possível observar nenhuma alteração significativa entre os grupos experimentais quanto aos níveis de citocinas pró-inflamatórias IL1- $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 (Figura 8).

Figura 8 - Citocinas pró-inflamatórias



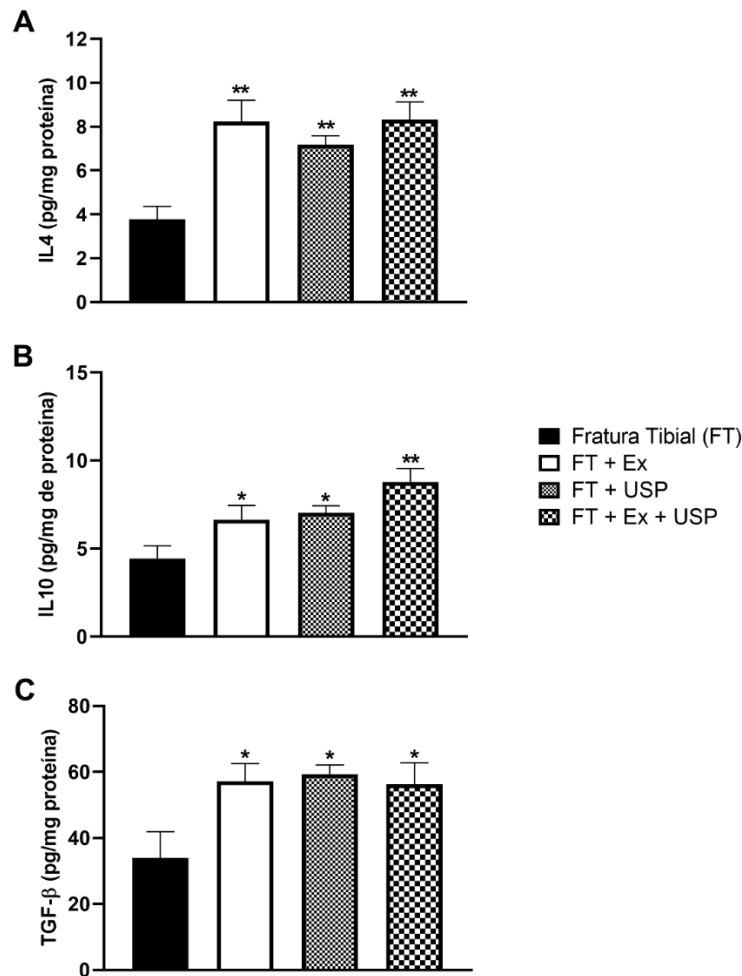
Fonte: elaborado pelo autor

Legenda: Citocinas pró-inflamatórias avaliadas 72h após última intervenção e tratamento. Em A – IL-1 $\beta$ . Em B TNF- $\alpha$ . Em C IL-6. Abreviações: IL, interleucina; TNF, fator de necrose tumoral; FT, fratura tibial; Ex, exercício; USP, ultrassom pulsado. Os dados são apresentados em Média  $\pm$  EPM; (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc Tukey).

### 5.3 CITOCINAS ANTI-INFLAMATÓRIAS E FATOR DE CRESCIMENTO

Na Figura 9A é possível observar um aumento significativo dos níveis de IL4 nos grupos FT + Ex, FT + USP e FT + Ex + USP quando comparados ao grupo FT ( $p < 0,01$ ). Em 9B, na análise dos níveis de IL10, é possível observar um aumento significativo nos grupos FT + Ex, FT + USP e FT + Ex + USP, os grupos de intervenção isolada apresentaram ( $p < 0,05$ ) e a combinação das intervenções ( $p < 0,01$ ) quando comparados ao grupo FT. Já na Figura 7C é possível observar aumento significativo dos níveis de TGF- $\beta$  nos grupos FT + Ex, FT + USP e FT + Ex + USP quando comparado ao grupo FT ( $p < 0,05$ ).

Figura 9 - Citocina anti-inflamatórias e fator de crescimento



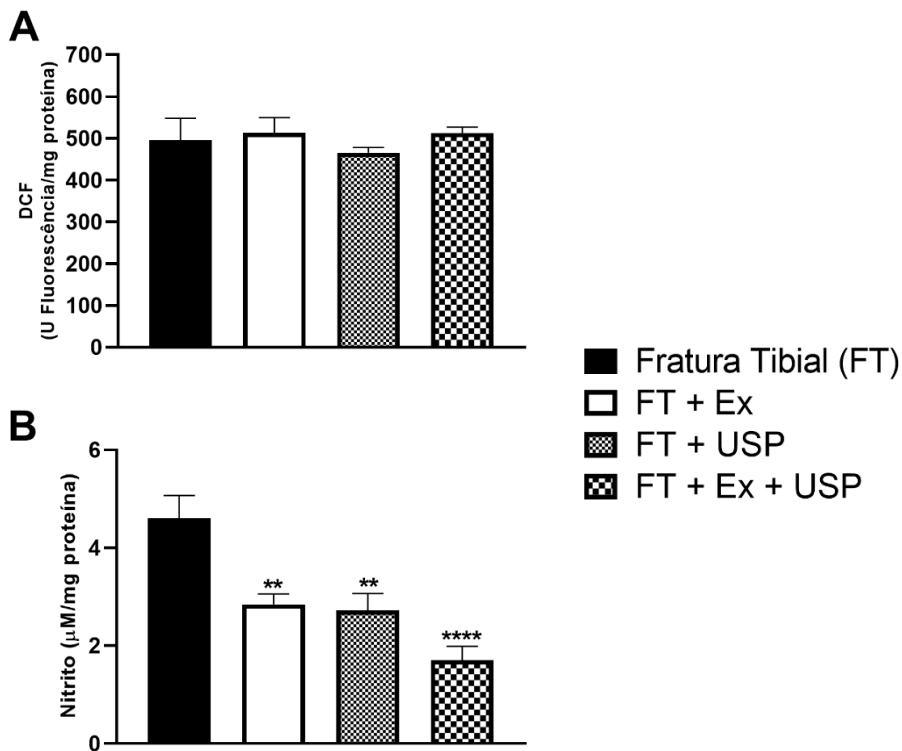
Fonte: elaborado pelo autor

Legenda: Citocinas anti-inflamatórias e fator de crescimento avaliados 72h após última intervenção e tratamento. Em A – IL4. Em B – IL10. Em C – TGF- $\beta$ . Abreviações: IL, interleucina; TGF, fator de transformação de crescimento; FT, fratura tibial; Ex, exercício; USP, ultrassom pulsado. Os dados são apresentados em Média  $\pm$  EPM, no qual: \* $p < 0,05$  v.s grupo FT; \*\* $p < 0,01$  v.s grupo FT; (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc Tukey).

## 5.4 NÍVEIS DE OXIDANTES

Na Figura 10A, na análise de DCF, não foi possível observar diferença entre os grupos experimentais. Em 10B é possível observar diminuição nos níveis de nitrito nos grupos FT + Ex e FT + USP com valor de ( $p < 0,01$ ) e no grupo FT + Ex + USP com valor de ( $p < 0,0001$ ) quando comparados ao grupo FT.

Figura 10 - Oxidantes



Fonte: elaborado pelo autor

Legenda: Oxidantes avaliados 72h após última intervenção e tratamento. Em A – DCF. Em B – Nitrito. Abreviações: Abreviações: DCF, diclorofluoresceína; FT, fratura tibial; Ex, exercício; USP, ultrassom pulsado. Os dados são apresentados em Média ± EPM, no qual: \*\* $p < 0,01$  v.s grupo FT; \*\*\*\* $p < 0,0001$  v.s grupo FT; (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc Tukey).

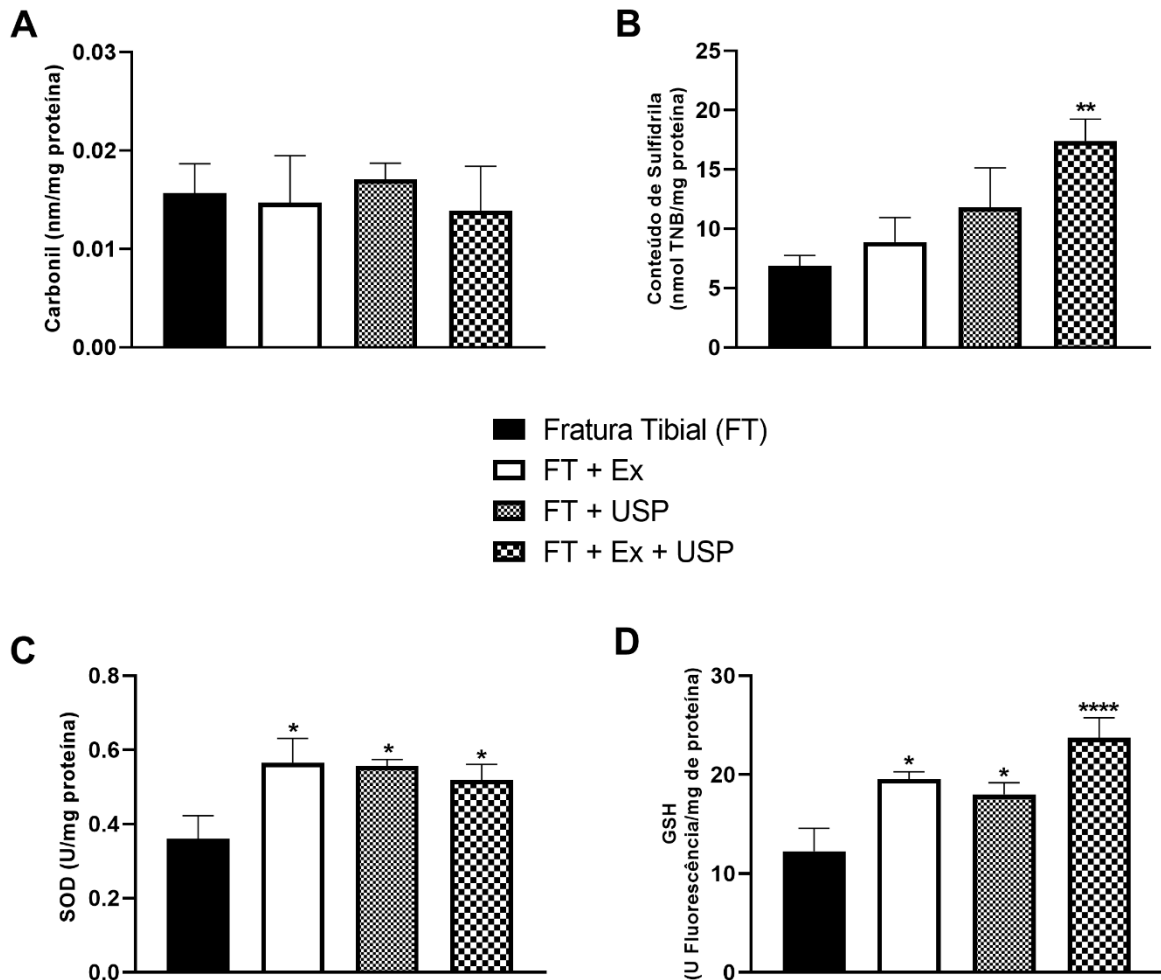
## 5.5 NÍVEIS DE DANO OXIDATIVO E ANTIOXIDANTES

Na Figura 11A, na avaliação de carbonil, não foi possível observar diferença entre os grupos experimentais. Em 11B, na avaliação de conteúdo de sulfidrilas, é possível observar aumento significativo no grupo FT + Ex + USP quando comparado ao grupo FT ( $p < 0,01$ ).

Na Figura 11C é possível observar aumento nos níveis de SOD nos grupos tratados de forma isolada FT + Ex e FT + USP como também de forma combinada FT + Ex + USP, quando

comparados ao grupo FT ( $p < 0,05$ ). Em 11D, na atividade de GSH, é possível observar um aumento significativo nos grupos FT + Ex, FT + USP e FT + Ex + USP, os grupos de intervenção isolada apresentaram ( $p < 0,05$ ) e a combinação das intervenções ( $p < 0,0001$ ) quando comparados ao grupo FT.

Figura 11 - Dano oxidativo e antioxidantes



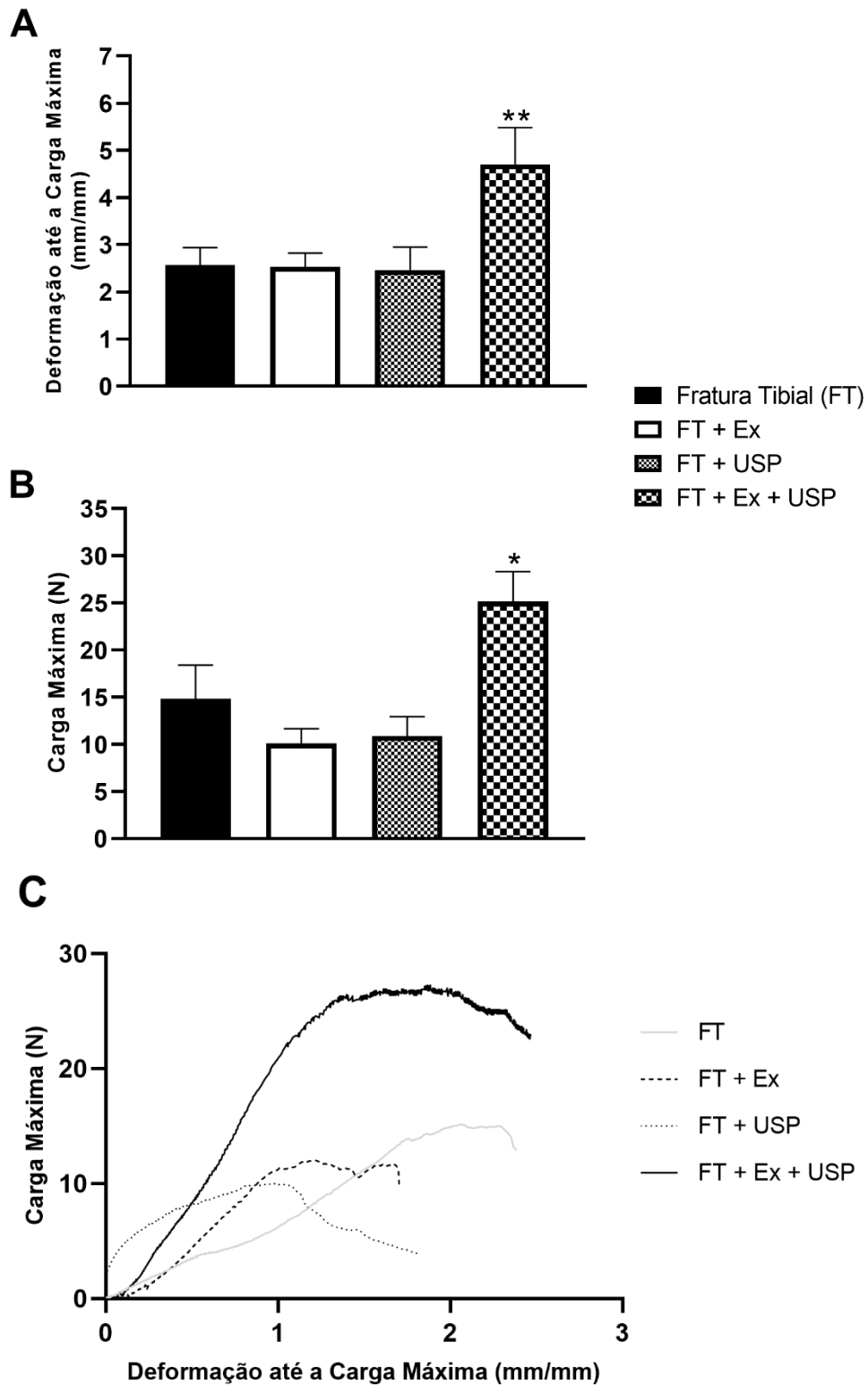
Fonte: elaborado pelo autor

Legenda: Dano oxidativo e antioxidantes avaliados 72h após última intervenção e tratamento. Em A – Carbonil. Em B – Conteúdo de Sulfidril. Em C – SOD. Em D – GSH. Abreviações: Abreviações: GSH, glutathiona reduzida; SOD, superóxido dismutase.; FT, fratura tibial; Ex, exercício; USP, ultrassom pulsado. Os dados são apresentados em Média  $\pm$  EPM, no qual: \* $p < 0,05$  v.s grupo FT; \*\* $p < 0,01$  v.s grupo FT; \*\*\*\* $p < 0,0001$  v.s grupo FT; (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc Tukey).

## 5.6 ENSAIO MECÂNICO

Pode ser visto na Figura 12A um aumento significativo da deformação até carga máxima ( $p < 0,01$ ) e carga máxima ( $p < 0,05$ , Figura 12B) suportada no grupo FT + Ex + USP quando comparado ao grupo FT.

Figura 12 - Ensaio mecânico



Fonte: elaborado pelo autor

Legenda: Em A – Deformação até carga máxima. Em B – Carga máxima. Em C – Imagem representativa da curva de carga-deformação. Abreviações: FT, fratura tibial; Ex, exercício; USP, ultrassom pulsado. Os dados são apresentados em Média  $\pm$  EPM, no qual: \* $p < 0,05$  v.s grupo FT; \*\* $p < 0,01$  v.s grupo FT. (ANOVA de uma via seguido de teste *post hoc* Tukey).

## 6 DISCUSSÃO

O propósito deste estudo foi avaliar os efeitos das intervenções de exercício aeróbio de moderada intensidade e ultrassom pulsado de baixa intensidade, isolados e combinados, no processo de reparo ósseo em modelo de fratura tibial em ratos Wistar. Para compreender os efeitos destas intervenções no processo de consolidação óssea foram realizadas análises de escore radiográfico; de citocinas pró e anti-inflamatórias; da produção de agentes oxidantes, dano oxidativo e atividade de enzimas antioxidantes; e análises biomecânicas do tecido ósseo. Os resultados corroboram à hipótese de pesquisa, no qual demonstram que a combinação das intervenções gerou melhor escore radiográfico, potencializou a modulação do processo inflamatório e o controle do estresse oxidativo, além de melhorar propriedades biomecânicas do tecido ósseo, especialmente quando comparado aos grupos tratados isoladamente com exercício aeróbio ou ultrassom pulsado.

Intervenções de estresse mecânico como exercício e ultrassom pulsado são considerados recursos amplamente utilizados no tratamento de defeitos ósseos devido à capacidade da mecanotransdução de mediar diversas vias de sinalização necessárias para o reparo ósseo (DUNCAN; TURNER, 1995; STEWART et al., 2020). Porém, na literatura atual são raras as evidências da combinação do uso do exercício aeróbio de intensidade moderada e ultrassom pulsado de baixa intensidade, sendo este estudo, pioneiro na avaliação da combinação de ambas as intervenções em um modelo experimental de fratura tibial.

Clinicamente, uma das modalidades de exames de imagem mais utilizadas para diagnóstico de fraturas ósseas e acompanhamento do processo de consolidação, devido ao seu baixo custo, é a radiografia (FISHER et al., 2019). As imagens radiográficas do presente estudo apontam formação de calo mole, através do escore radiográfico, no meio do período de tratamento (12 dias) nos grupos isolados e FT. Este resultado está ao encontro da literatura no qual a proliferação celular aguda tem seu pico entre 7 e 10 dias e cessação da proliferação ao 14º dia, concomitante ocorre a maturação de condrócitos (entre dias 9 - 14) e, posteriormente, a mineralização de calo mole (DIMITRIOU; TSIRIDIS; GIANNOUDIS, 2005).

Em cerca de 24 dias após a fratura pode ser observado no grupo de intervenções combinadas o aumento do escore radiográfico caracterizando o início de união óssea. Este resultado indica que o exercício aeróbio combinado ao ultrassom pulsado é capaz de promover a atividade de osteogênese, que segundo a literatura, é mais ativa até o dia 21, entretanto continua em atividade até remodelação óssea (DIMITRIOU; TSIRIDIS; GIANNOUDIS, 2005).



Apesar de não ser possível identificar nas análises radiográficas o desaparecimento da linha de fratura e união óssea completa no período de análise, a aceleração do processo de reparo ósseo confirma a hipótese da pesquisa, pois os grupos tratados apresentaram escores radiográficos elevados em conjunto às análises de marcadores bioquímicos, o que corrobora com a literatura que afirma que alterações morfológicas macroscópicas são dependentes, primeiro, de alterações e ativações moleculares e bioquímicas (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013).

As análises de citocinas do presente estudo demonstram o aspecto protetor e de tentativa de reparação tecidual dos tratamentos, aqui evidenciado pelo controle de citocinas pró-inflamatórias e aumento de citocinas anti-inflamatórias e fator de crescimento. Nas análises dos níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL1- $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6), não foram demonstradas diferenças entre os grupos experimentais. Acredita-se que este cenário seja justificado pelo período de análise ultrapassar o pico inflamatório agudo, visto que a presença destas citocinas, segundo estudos prévios, se concentra em fases iniciais (DIMITRIOU; TSIRIDIS; GIANNOUDIS, 2005). Além disso este resultado confirma os achados das análises radiográficas que indicam a atividade dos condrócitos através da formação de calo mole aos 12 dias nos grupos experimentais.

Entretanto, é válido ressaltar a importância destas citocinas nas fases iniciais do processo de consolidação óssea para formação do calo mole. Conforme estudo de HOZAIN; COTTRELL, (2020) a depleção de M1, secretores de citocina pró-inflamatórias, é capaz de reduzir a formação de calo mole aos 14 dias de fratura de fêmur de camundongos analisados por MicroCT e histologia.

A polarização do macrografo M1 para M2 é evidenciada no tratamento de exercício aeróbio e/ou ultrassom pulsado em fratura tibial ao passo que foram capazes de promover a aceleração do processo de reparo ósseo através da elevação dos níveis de IL-10 e IL-4 e fator de crescimento TGF- $\beta$ , desta forma, inibiram a infiltração excessiva de neutrófilos e recrutamento de uma segunda infiltração celular de monócitos/macrófagos para o local fraturado (LOI et al., 2016). Efeito este supostamente visualizado no grupo FT, sem apresentar a produção destes fatores que caracterizam a mudança fenotípica para M2.

Estas citocinas são responsáveis por promover diferenciação condrogênica, proliferação e diferenciação hipertrófica de condrócitos, caracterizando a formação de calo mole local, evidenciado também nas análises radiográficas (DIMITRIOU; TSIRIDIS; GIANNOUDIS, 2005; MARUYAMA et al., 2020). Além da aparente troca fenotípica de M1 para M2, o aumento significativamente maior dos níveis de IL-10 no grupo combinado pode

ser resultado da atividade da IL-6 liberada pelos miócitos durante a contração muscular e via calcineurina, justificando o aumento significativamente maior desta citocina na combinação das intervenções (FEBBRAIO; PEDERSEN, 2002).

Conforme descrito por SCHEFFER; LATINI (2020), durante o exercício moderado, miócitos em contração muscular expressam IL-6 que conduzem a respostas anti-inflamatórias mediante secreção de IL-10 e IL1-RA, além de induzir um *feedback* negativo de inibição da produção de TNF- $\alpha$ . Porém a IL-6 que induz este papel anti-inflamatório possui seu pico de ativação concomitantemente com o final da sessão de exercício, voltando a níveis basais poucas horas após o fim da atividade (BENATTI; PEDERSEN, 2015; SCHEFFER; LATINI, 2020).

Em conjunto, o estresse mecânico gerado pelo ultrassom pulsado possivelmente atuou no aumento das concentrações de cálcio ( $Ca^{+2}$ ) estimulando a via calcineurina, que quando ativada, liga-se e desfosforila o fator nuclear de células T ativadas (NFAT), que por vez se transloca para o núcleo e conduz a transcrição do gene associado à citocina IL6, permitindo a citocina exibir seu papel anti-inflamatório (FEBBRAIO; PEDERSEN, 2002). Desta forma, entende-se que as avaliações deste estudo avaliaram a IL-6 com perfil pró-inflamatório, porém supõe-se que cada sessão de exercício aeróbico e ultrassom pulsado estimulou IL-6 secretadas por miócitos e/ou via calcineurina conjuntamente com seus efeitos subsequentes.

É evidente que o comportamento das células residentes no tecido ósseo, bem como na matriz extracelular é influenciado na presença de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) (CERQUENI et al., 2021). Diante disso o presente estudo também avaliou se o exercício aeróbico e o ultrassom pulsado são capazes de controlar a produção desses oxidantes, visto que a adaptação óssea a esses estresses mecânicos gerados promove remodelação óssea dependentes de proliferação e diferenciação. No entanto, a diferenciação celular, principalmente de osteoblastos na remodelação óssea é dependente da respiração mitocondrial para produção de ATP e assegurar fornecimento de energia adequado, e esse processo é acompanhado pela formação controlada de ERO/ERN (ZHU et al., 2022).

O aumento dos níveis de nitrito é observado no grupo FT, sendo os macrófagos M1 responsáveis pela sua produção, o que ainda sustenta a não mudança fenotípica para M2 neste grupo experimental. Por outro lado, os tratamentos isolados atenuaram a expressão de iNOS mediante redução dos níveis de nitrito, especialmente no grupo combinado. Cenário que permite certificar o controle da atividade catabólica gerada pela presença de ERN, como a apoptose de osteócitos e osteoblastos e inibição da mineralização óssea e osteogênese (CERQUENI et al., 2021).

Quando avaliado o dano oxidativo através da análise do conteúdo de sulfidrilas, o qual avalia a quantidade de grupos tióis presentes por meio da visualização da concentração de grupos sulfidrilas (SH) não oxidadas, ou seja, que ainda permanecem ligadas aos aminoácidos, observa-se que somente por meio da combinação de exercício aeróbio e ultrassom pulsado é capaz de preservar estas ligações. Este resultado vai ao encontro com a redução significativamente maior de nitrito neste grupo experimental, visto que para atingir a estabilidade eletrônica, e conseqüentemente, comprometendo proteínas locais, o grupo SH é atacado pelas ERO/ERN, principalmente NO. Portanto, a combinação das intervenções exibe papel protetor nos grupos sulfidrilas.

Outro fato que explica a preservação dos SH é o mecanismo de defesa no aumento de ativação de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD) e glutathiona (GSH) nos grupos intervindos isolado e combinado. Sabe-se que o estresse mecânico gerado pelas intervenções neste estudo gera aumento da produção de ATP acompanhado ao aumento de ERO/ERN conforme descrito anteriormente. A presença de ERO/ERN apresentou atividade reduzida nos grupos experimentais estressados mecanicamente ao fato de que tanto o ultrassom pulsado quanto o exercício aeróbio possuem evidências de ativação de Nrf2 (fator 2 relacionado ao fator nuclear derivado do eritróide) (PELLEGRINI et al., 2016).

PELLEGRINI et al (2016) avaliou camundongos osteoporóticos com inibição de Nrf2 que intervindos de exercício de corrida em esteira diário recuperaram a depleção de Nrf2 e melhoraram a densidade mineral óssea femoral e sua microestrutura trabecular. Em conjunto, YING et al (2020) em um modelo experimental de reabsorção óssea alveolar trouxe a capacidade de o ultrassom pulsado facilitar a ativação do Nrf2, atenuar o estresse oxidativo induzido pelo peróxido de hidrogênio e recuperar a viabilidade celular. A ativação do Nrf2 pela presença de ERO/ERN ou pelas intervenções de estresse mecânico faz a liberação deste fator de seu inibidor Keap1, no qual permite sua translocação para o núcleo celular, onde se liga ao elemento de resposta antioxidante, desta forma, transcreve múltiplas enzimas antioxidantes (CHEN et al., 2021; DA SILVA et al., 2023; FILHO et al., 2021).

Além do processo de reparo acelerado é desejável que o novo osso formado alcance propriedades mecânicas adequadas para suportar a carga gerada nos seus componentes de matriz, visto que o osso é um órgão de suporte mecânico. No presente estudo, além de a combinação de exercício aeróbio e ultrassom pulsado promoverem melhores escores radiográficos e controle dos processos inflamatório e de estresse oxidativo, proporcionaram um novo osso formado com componentes da matriz capaz de tolerar maior carga mecânica máxima concomitante com maior capacidade elástica, quando comparados ao grupo FT. Esta

perspectiva pode ser visualizada na imagem representativa da curva de carga-deformação e justificada pelos eventos celulares acima descritos que as intervenções combinadas podem ter ofertado. Além disso, este resultado corrobora com o estudo de TANG et al (2023), no qual a combinação de 12 semanas de exercício de alta intensidade e intervenção de ultrassom pulsado de 80mW/cm<sup>2</sup> em ratos Sprague Dawley causou melhores propriedades mecânicas em fêmur saudável.

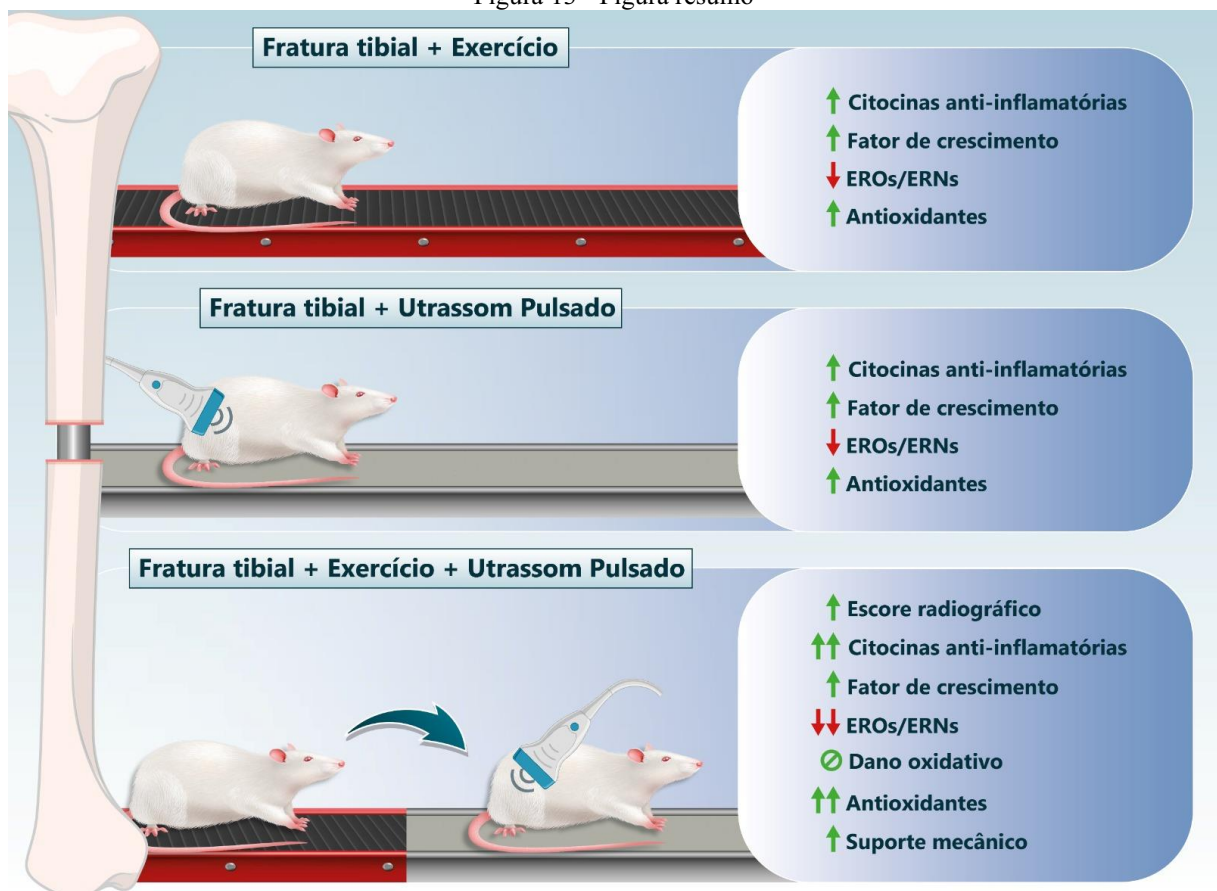
A literatura ainda carece de mais informações para elucidar a lacuna sobre a intensidade adequada do exercício para promover formação e manutenção do metabolismo ósseo. Entretanto a escolha do exercício aeróbio na intensidade moderada no presente estudo está de acordo com achados na literatura onde a melhora significativa na microestrutura do osso trabecular é dependente de carga mecânica controlada, sendo o exercício de intensidade moderada a forma mais congruente para promoção de saúde óssea dentre os três níveis de intensidade de exercício (FANG et al., 2019).

É possível presumir que o aumento do fluido intersticial ativou os mecanossensores integrinas e canais de íons de cálcio em conjunto, conseqüentemente, ambas vias ativam extensas redes quinases, o qual resultam em regulação positiva da osteopontina, importante componente da matriz extracelular óssea, aumento da RUNX2 e Osterix (OSX) dois fatores de transcrição reguladores chave da diferenciação osteoblástica e da osteogênese e provavelmente favorece o aumento da produção de citocinas anti-inflamatórias, visualizadas neste estudo (LIU et al., 2023; STEWART et al., 2020). Além disso, o aumento do fluxo do fluido gerado pelas intervenções apresentadas no estudo foi capaz de exibir o fenômeno de mecanotransdução nos osteócitos, caracterizado pela conversão do estímulo mecânico externo em um sinal bioquímico (DUNCAN; TURNER, 1995).

Diante disso, a combinação do exercício aeróbio e ultrassom pulsado foram capazes de acelerar o processo de reparo ósseo a partir das análises dos escores radiográficos, aumento significativamente maior de citocinas anti-inflamatórias e do estresse oxidativo, bem como, melhor tolerância mecânica através da curva carga-deformação que o uso isolado. A avaliação da expressão de fatores osteogênicos demonstra limitações no presente estudo. Entretanto, foi possível presumir a presença destes fatores a partir da literatura atual bem como através das análises que, possivelmente, demonstram indiretamente a ativação destes. Infelizmente, não foi possível a avaliação semanal das análises radiográficas para acompanhamento do desaparecimento da linha de fratura e formação óssea, desta forma, fica como sugestão para um próximo estudo.

Apesar do modelo animal de fratura expressar a condição humana de ossos fraturados e estabilizados, estudos clínicos são indicados para averiguar os efeitos do ultrassom pulsado e exercício moderado em fraturas ósseas estabilizadas. Posto isso, há necessidade de contínuas investigações dos efeitos da combinação do exercício aeróbio e ultrassom pulsado, bem como, o conhecimento sobre estratégias terapêuticas de estresse mecânico que auxiliem no tratamento de fraturas ósseas.

Figura 13 - Figura resumo



Legenda: Síntese dos principais achados sobre as terapias com USP e/ou Ex no tratamento de fratura tibial. Fonte: elaborado pelo próprio autor.

## **7 CONCLUSÃO**

Considerando os resultados neste estudo, as terapias propostas mostraram contribuir na aceleração do reparo ósseo. Entretanto, a partir dos parâmetros analisados, as intervenções combinadas de exercício aeróbio e ultrassom pulsado apontam melhores escores radiográficos, aumento de significativamente maiores de citocinas anti-inflamatórias, redução significativamente maior de ERO/ERN e controle do dano oxidativo, além de apresentar melhor tolerância de suporte de carga mecânica através da curva de carga-deformação.

## REFERÊNCIAS

- AKMAN, Ş. et al. Effect of diclofenac sodium on union of tibial fractures in rats. **Advances in therapy**, v. 19, n. 3, p. 119–125, 2002.
- AKSENOV, M. Y.; MARKESBERY, W. R. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, v. 302, n. 2–3, p. 141–145, 20 abr. 2001.
- BANNISTER, J. V.; CALABRESE, L. Assays for superoxide dismutase. **Methods of biochemical analysis**, v. 32, p. 279–312, 1987.
- BENATTI, F. B.; PEDERSEN, B. K. Exercise as an anti-inflammatory therapy for rheumatic diseases-myokine regulation. **Nature reviews. Rheumatology**, v. 11, n. 2, p. 86–97, 17 fev. 2015.
- BRUDER, A. M. et al. Prescribed exercise programs may not be effective in reducing impairments and improving activity during upper limb fracture rehabilitation: a systematic review. **Journal of Physiotherapy**, v. 63, n. 4, p. 205–220, 1 out. 2017.
- CASTROGIOVANNI, P. et al. Moderate Physical Activity as a Prevention Method for Knee Osteoarthritis and the Role of Synoviocytes as Biological Key. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 3, 1 fev. 2019.
- CERQUENI, G. et al. Insights into oxidative stress in bone tissue and novel challenges for biomaterials. **Materials Science and Engineering: C**, v. 130, p. 112433, 1 nov. 2021.
- CHAE, S. Y. et al. Protection of insulin secreting cells from nitric oxide induced cellular damage by crosslinked hemoglobin. **Biomaterials**, v. 25, n. 5, p. 843–850, 2004.
- CHEN, X. et al. Nrf2 epigenetic derepression induced by running exercise protects against osteoporosis. **Bone Research**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2021.
- CIFUENTES, D. J. et al. Decrease in oxidative stress and histological changes induced by physical exercise calibrated in rats with osteoarthritis induced by monosodium iodoacetate. **Osteoarthritis and cartilage**, v. 18, n. 8, p. 1088–1095, ago. 2010.
- CLAES, L.; RECKNAGEL, S.; IGNATIUS, A. Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. **Nature Reviews Rheumatology** 2012 8:3, v. 8, n. 3, p. 133–143, 31 jan. 2012.
- DA SILVA, L. A. et al. The effectiveness of treadmill and swimming exercise in an animal model of osteoarthritis. **Frontiers in physiology**, v. 14, 2023.
- DIMITRIOU, R.; TSIRIDIS, E.; GIANNOUDIS, P. V. Current concepts of molecular aspects of bone healing. **Injury**, v. 36, n. 12, p. 1392–1404, 1 dez. 2005.

- DU SERT, N. P. et al. The Experimental Design Assistant. **Nature Methods** 2017 **14:11**, v. 14, n. 11, p. 1024–1025, 28 set. 2017.
- DUNCAN, R. L.; TURNER, C. H. Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain. **Calcified tissue international**, v. 57, n. 5, p. 344–358, nov. 1995.
- EINHORN, T. A.; GERSTENFELD, L. C. Fracture healing: mechanisms and interventions. **Nature Reviews Rheumatology** 2014 **11:1**, v. 11, n. 1, p. 45–54, 30 set. 2014.
- FANG, J. et al. Multiscale experimental study on the effects of different weight-bearing levels during moderate treadmill exercise on bone quality in growing female rats. **BioMedical Engineering OnLine**, v. 18, n. 1, 22 mar. 2019.
- FEBBRAIO, M. A.; PEDERSEN, B. K. Muscle-derived interleukin-6: mechanisms for activation and possible biological roles. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 16, n. 11, p. 1335–1347, set. 2002.
- FILHO, M. C. B. et al. Intra-articular treatment with hyaluronic acid associated with gold nanoparticles in a mechanical osteoarthritis model in Wistar rats. **Journal of Orthopaedic Research®**, v. 39, n. 12, p. 2546–2555, 1 dez. 2021.
- FISHER, J. S. et al. Radiologic evaluation of fracture healing. **Skeletal Radiology**, v. 48, n. 3, p. 349–361, 1 mar. 2019.
- GABBAI-ARMELIN, P. R. et al. Effects of bio-inspired bioglass/collagen/magnesium composites on bone repair. **Journal of biomaterials applications**, v. 34, n. 2, p. 261–272, 1 ago. 2019.
- GARCIA, P. et al. Rodent animal models of delayed bone healing and non-union formation: a comprehensive review. **European cells & materials**, v. 26, p. 1–14, 2013.
- GERMAIN, A. et al. Impact of Treadmill Interval Running on the Appearance of Zinc Finger Protein FHL2 in Bone Marrow Cells in a Rat Model: A Pilot Study. **Life**, v. 12, n. 4, 1 abr. 2022.
- GLEESON, M. et al. The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. **Nature reviews. Immunology**, v. 11, n. 9, p. 607–610, set. 2011.
- GOSHIMA, K. et al. Low-intensity pulsed ultrasound does not promote bone healing and functional recovery after open wedge high tibial osteotomy. **Bone & joint open**, v. 3, n. 11, p. 885–893, 1 nov. 2022.
- HARRISON, A. et al. Mode & mechanism of low intensity pulsed ultrasound (LIPUS) in fracture repair. **Ultrasonics**, v. 70, p. 45–52, 1 ago. 2016.



- HERNLUND, E. et al. Osteoporosis in the European Union: medical management, epidemiology and economic burden. A report prepared in collaboration with the International Osteoporosis Foundation (IOF) and the European Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA). **Archives of osteoporosis**, v. 8, n. 1, 1 dez. 2013.
- HISSIN, P. J.; HILF, R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. **Analytical biochemistry**, v. 74, n. 1, p. 214–226, 1976.
- HOZAIN, S.; COTTRELL, J. CD11b+ targeted depletion of macrophages negatively affects bone fracture healing. **Bone**, v. 138, 1 set. 2020a.
- HOZAIN, S.; COTTRELL, J. CD11b+ targeted depletion of macrophages negatively affects bone fracture healing. **Bone**, v. 138, p. 115479, 1 set. 2020b.
- HUANG, R. et al. RANKL-induced M1 macrophages are involved in bone formation. **Bone research**, v. 5, 17 out. 2017.
- JI, B.; GAO, H. Mechanical properties of nanostructure of biological materials. **Journal of the Mechanics and Physics of Solids**, v. 52, n. 9, p. 1963–1990, 1 set. 2004.
- JU, Y.-I. et al. Differential effects of jump versus running exercise on trabecular bone architecture and strength in rats. **Physical Activity and Nutrition**, v. 24, n. 1, p. 1, 3 mar. 2020.
- KARLSSON, M. K.; ROSENGREN, B. E. Exercise and Peak Bone Mass. **Current Osteoporosis Reports**, v. 18, n. 3, p. 285, 1 jun. 2020.
- KHARE, D.; BASU, B.; DUBEY, A. K. Electrical stimulation and piezoelectric biomaterials for bone tissue engineering applications. **Biomaterials**, v. 258, p. 120280, 1 nov. 2020.
- KIDO, H. W. et al. Evaluation of the bone healing process in an experimental tibial bone defect model in ovariectomized rats. **Aging clinical and experimental research**, v. 26, n. 5, p. 473–481, 1 out. 2014.
- KLEIN-NULEND, J. et al. Pulsating fluid flow stimulates prostaglandin release and inducible prostaglandin G/H synthase mRNA expression in primary mouse bone cells. **Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research**, v. 12, n. 1, p. 45–51, 1997.
- KUANG, Y. et al. Low-intensity pulsed ultrasound promotes tissue regeneration in rat dental follicle cells in a porous ceramic scaffold. **Brazilian oral research**, v. 33, 2019.
- KUMAR, V.; ABBAS, A.; ASTER, J. **Robbins Patologia Básica**. 9ª Edição ed. Rio de Janeiro: [s.n.].
- LEANDRO, C. G. et al. A program of moderate physical training for Wistar rats based on maximal oxygen consumption. **Journal of strength and conditioning research**, v. 21, n. 3, p. 751–756, ago. 2007.

- LEE, E. J.; JAIN, M.; ALIMPERTI, S. Bone Microvasculature: Stimulus for Tissue Function and Regeneration. **Tissue Engineering. Part B, Reviews**, v. 27, n. 4, p. 313, 1 ago. 2021.
- LEIGHTON, R. et al. Low intensity pulsed ultrasound (LIPUS) use for the management of instrumented, infected, and fragility non-unions: a systematic review and meta-analysis of healing proportions. **BMC Musculoskeletal Disorders**, v. 22, n. 1, p. 1–9, 1 dez. 2021.
- LEVINE, R. L. et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods in enzymology**, v. 186, n. C, p. 464–478, 1 jan. 1990.
- LIRANI-GALVÃO, A. P.; JORGETTI, V.; LOPES DA SILVA, O. Comparative study of how low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasound affect bone repair in rats. **Photomedicine and laser surgery**, v. 24, n. 6, p. 735–740, dez. 2006.
- LIU, Z. et al. The Mechanotransduction Signaling Pathways in the Regulation of Osteogenesis. **International Journal of Molecular Sciences 2023, Vol. 24, Page 14326**, v. 24, n. 18, p. 14326, 20 set. 2023.
- LOGAN, A. A. et al. The Impact of Circular Exercise Diameter on Bone and Joint Health of Juvenile Animals. **Animals**, v. 12, n. 11, 1 jun. 2022.
- LOI, F. et al. Inflammation, Fracture and Bone Repair. **Bone**, v. 86, p. 119, 1 maio 2016.
- LOWRY, O. H. et al. PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT\*. [s.d.].
- MA, C. et al. Biomechanics and mechanobiology of the bone matrix. **Bone Research**, v. 10, n. 1, 1 dez. 2022.
- MCCARTHY, C.; CAMCI-UNAL, G. Low Intensity Pulsed Ultrasound for Bone Tissue Engineering. **Micromachines**, v. 12, n. 12, 1 dez. 2021.
- MEDALHA, C. C. et al. Low level laser therapy accelerates bone healing in spinal cord injured rats. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 159, p. 179–185, 1 jun. 2016.
- MORITA, Y. et al. Evaluation of stem cell-to-tenocyte differentiation by atomic force microscopy to measure cellular elastic moduli. **Cell biochemistry and biophysics**, v. 66, n. 1, p. 73–80, 1 maio 2013.
- MUSTAFY, T. et al. High Impact Exercise Improves Bone Microstructure and Strength in Growing Rats. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2019.
- NEWMAN, H.; SHIH, Y. V.; VARGHESE, S. Resolution of inflammation in bone regeneration: from understandings to therapeutic applications. **Biomaterials**, v. 277, p. 121114, 1 out. 2021.

- OLIVEIRA, P. DE et al. COMPARATIVE STUDY OF THE EFFECTS OF LOW-LEVEL LASER AND LOW-INTENSITY ULTRASOUND ASSOCIATED WITH BIOSILICATE® ON THE PROCESS OF BONE REPAIR IN THE RAT TIBIA. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 47, n. 1, p. 102, jan. 2012.
- PALANISAMY, P. et al. Low-Intensity Pulsed Ultrasound Stimulation for Bone Fractures Healing. **Journal of Ultrasound in Medicine**, v. 41, n. 3, p. 547–563, 1 mar. 2022.
- PARISI, J. R. et al. Evaluation of the In Vivo Biological Effects of Marine Collagen and Hydroxyapatite Composite in a Tibial Bone Defect Model in Rats. **Marine biotechnology (New York, N.Y.)**, v. 22, n. 3, p. 357–366, 1 jun. 2020.
- PATROCÍNIO-SILVA, T. L. et al. The effects of low-level laser irradiation on bone tissue in diabetic rats. **Lasers in Medical Science**, v. 29, n. 4, p. 1357–1364, 29 ago. 2014.
- PELLEGRINI, G. G. et al. Avenanthramides Prevent Osteoblast and Osteocyte Apoptosis and Induce Osteoclast Apoptosis in Vitro in an Nrf2-Independent Manner. **Nutrients**, v. 8, n. 7, 11 jul. 2016.
- RUBIN, C. T.; LANYON, L. E. Regulation of bone mass by mechanical strain magnitude. **Calcified tissue international**, v. 37, n. 4, p. 411–417, jul. 1985.
- RUBIN, J.; RUBIN, C.; JACOBS, C. R. Molecular pathways mediating mechanical signaling in bone. **Gene**, v. 367, n. 1–2, p. 1–16, 15 fev. 2006.
- RUSSELL, W. M. S. B. L. **The Principles of Humane Experimental Technique**. [s.l.: s.n.].
- SCHEFFER, D. DA L.; LATINI, A. Exercise-induced immune system response: Anti-inflammatory status on peripheral and central organs. **Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease**, v. 1866, n. 10, 1 out. 2020.
- SCHMIDT-BLEEK, K. et al. Boon and Bane of Inflammation in Bone Tissue Regeneration and Its Link with Angiogenesis. **Tissue engineering. Part B, Reviews**, v. 21, n. 4, p. 354–364, 1 ago. 2015.
- SHUAI, C. et al. Physical stimulations and their osteogenesis-inducing mechanisms. **International journal of bioprinting**, v. 4, n. 2, 2018.
- STEWART, S. et al. Mechanotransduction in osteogenesis. **Bone & Joint Research**, v. 9, n. 1, p. 1, 2020.
- TANG, L. et al. Low-intensity pulsed ultrasound enhances the positive effects of high-intensity treadmill exercise on bone in rats. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 41, n. 5, p. 592–605, 1 set. 2023.
- THOMPSON, W. R.; RUBIN, C. T.; RUBIN, J. Mechanical regulation of signaling pathways in bone. **Gene**, v. 503, n. 2, p. 179–193, 25 jul. 2012.

- TURNER, C. H. et al. The elastic properties of trabecular and cortical bone tissues are similar: Results from two microscopic measurement techniques. **Journal of Biomechanics**, v. 32, n. 4, p. 437–441, 1999.
- WANG, H.; JOSEPH, J. A. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 27, n. 5–6, p. 612–616, 1 set. 1999.
- WEINER, S.; WAGNER, H. D. THE MATERIAL BONE: Structure-Mechanical Function Relations. <https://doi.org/10.1146/annurev.matsci.28.1.271>, v. 28, n. 1, p. 271–298, 28 nov. 2003.
- WILDEMANN, B. et al. Non-union bone fractures. **Nature Reviews Disease Primers** 2021 **7:1**, v. 7, n. 1, p. 1–21, 5 ago. 2021.
- WOODELL-MAY, J. E.; SOMMERFELD, S. D. Role of Inflammation and the Immune System in the Progression of Osteoarthritis. **Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society**, v. 38, n. 2, p. 253–257, 1 fev. 2020.
- WU, X. Q. et al. Development of a tibial experimental non-union model in rats. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, v. 16, n. 1, p. 1–9, 1 dez. 2021.
- XIE, Y. et al. FGFR3 deficient mice have accelerated fracture repair. **International Journal of Biological Sciences**, v. 13, n. 8, p. 1029, 2017.
- XU, L. Y.; HOU, Z. DE; WANG, H. Investigation of pressure loading rates on streaming potentials in bone. **Science China Technological Sciences**, v. 54, n. 6, p. 1376–1381, 16 abr. 2011.
- YING, S. et al. Low-intensity Pulsed Ultrasound regulates alveolar bone homeostasis in experimental Periodontitis by diminishing Oxidative Stress. **Theranostics**, v. 10, n. 21, p. 9789, 2020.
- ZHANG, S. et al. Effect of exercise on bone mineral density among patients with osteoporosis and osteopenia: A systematic review and network meta-analysis. **Journal of Clinical Nursing**, v. 31, n. 15–16, p. 2100–2111, 1 ago. 2022.
- ZHU, C. et al. Autophagy in Bone Remodeling: A Regulator of Oxidative Stress. **Frontiers in Endocrinology**, v. 13, 30 jun. 2022.
- ZHU, H. et al. The combination of PLLA/PLGA/PCL composite scaffolds integrated with BMP-2-loaded microspheres and low-intensity pulsed ultrasound alleviates steroid-induced osteonecrosis of the femoral head. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 20, n. 6, p. 1–1, 24 set. 2020.

ZURA, R. et al. Epidemiology of Fracture Nonunion in 18 Human Bones. **JAMA surgery**, v. 151, n. 11, 1 nov. 2016.

**ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA  
NO USO DE ANIMAIS**



**Universidade do Extremo Sul Catarinense  
Comissão de Ética no Uso de Animais**



**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto abaixo especificado, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, em reunião de **11/04/2023**.

Titulo do projeto	EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO DO EXERCÍCIO DE MODERADA INTENSIDADE E ULTRASSOM PULSADO DE BAIXA INTENSIDADE NA CONSOLIDAÇÃO DE FRATURA TIBIAL EM RATOS.
Project title	EFFECTS OF THE ASSOCIATION OF MODERATE INTENSITY EXERCISE AND LOW INTENSITY PULSED ULTRASOUND ON HEALING OF TIBIAL FRACTURES IN RATS.
Número do protocolo Protocol number	28/2023
Pesquisador principal Principal Investigator	<b>Paulo Cesar Lock Silveira</b>
Pesquisadores Researchers	Ligia Milanez Venturini, Carolini Mendes, Gustavo de Bem Silveira, João Vítor Silvano Bittencourt, Laura de Roch Casagrande, Germano Duarte Porto, Maria Eduarda Anastácio Borges Corrêa, Rubya Pereira Zaccaron, Mateus Cardoso Colares, Igor Ramos Lima, Camila da Costa, Lucas de Oliveira Pacagnan, Marcelo Emílio Beirão.
Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	21/04/2023 a 19/04/2023
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico/Wistar
Idade/Peso	60 dias /200g350g
Número de animais	Masculino 80
Procedência	Biotério UNESC

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 03/2017/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the Project that was Approved in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us by e-mail [ceua@unesc.net](mailto:ceua@unesc.net).

Criciúma-SC, 11 de abril de 2023.

*Josiane Budni*  
**Josiane Budni**

**Coordenadora da CEUA**