

ALFREDO ALCANTARA BARRETO

**EFEITO DO ULTRA-SOM TERAPÊUTICO SOBRE O
CRESCIMENTO ÓSSEO DAS EPÍFISES, DISTAL DO
FÊMUR E PROXIMAL DA TÍBIA EM
*Rattus norvegicus***

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação, Bases Gerais da Cirurgia, Área de Concentração em Agressão, Reparação, Regeneração e Transplante de Tecidos e Órgãos, da Faculdade de Medicina de Botucatu da Universidade Estadual “Julio de Mesquita Filho”, para a obtenção do título de DOUTOR em CIRURGIA

ORIENTADOR: PROF. DR. SERGIO SWAIN MÜLLER

BOTUCATU

- 2009 -

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação
Divisão Técnica de Biblioteca e Documentação - Campus De Botucatu - UNESP
Bibliotecária responsável: *Sulamita Selma Clemente Colnago* – CRB 8/4716

Barreto, Alfredo Alcântara.

Efeito do ultra-som terapêutico sobre o crescimento ósseo das epífises, distal do fêmur e proximal da tíbia em *Rattus norvegicus* / Alfredo Alcântara Barreto. – 2009.

Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2009

Orientador: Sérgio Swain Müller

Capes: 40101002

1. Ossos – Crescimento – Estudos experimentais.

CDD 617.471

Palavras-chave: Ultra-som; Terapia por ultra-som; Ratos; Epífises; Lâmina de crescimento; Histologia

*Dedico este trabalho
A todos os meus pacientes
A quem eu, por dever de ofício e
Absoluta indicação médica,
Extirpei partes de seus corpos.
Especialmente àquela garota de 17 anos,
Que, por detrás da tenda do anestesista,
Chorava, enquanto eu
Amputava a sua perna e
Esmagava o meu coração.
A bem da verdade confesso
Que o tempo diminuiu as minhas angústias
E o mesmo, eu espero, possa
Ter acontecido a todos eles.
Em penitência prometo estar presente,
Ao final dos tempos e, em seu benefício,
Dar o meu depoimento.*

À minha esposa Romi

*O sol surge, flutua, caminha,
Aquece-me, mesmo queima,
Alonga sombras, liberta ventos
E se vai,
Obscurecendo o mundo.
Herdo, então, a noite
E as lembranças do dia.
Dia após dia, ele me afeta.
Menos que estar,
Uma fração do dia,
Com você.*

*Aos meus filhos
Marcos e Cláudio de quem, agora adultos,
Sinto-me ainda mais próximo,
Que, um dia, julguei possível.
Vocês recebem um país de contrastes extremos,
Onde, na Avenida Brasil,
Crianças esmolam à meia-noite e
A consciência social de muitos,
Corporações e indivíduos,
Mergulha na Idade Média.
Que possam
Semear mudanças.*

*Aos meus pais Jarbas e Guiomar,
Que apesar de poucos estudos
Possuem cultura (de sobra) para todos os filhos.*

*Ferreiro, ao malhar superfícies rubras,
Noto que o calor e o tempo deixam marcas.
Não desisto, esmoreço temporariamente,
Pois amigos abrem janelas,
Renovam o ar, ocupam as bigornas,
Aparam as fagulhas e alimentam os fornos.
Gilberto, Paulo, Mauro, Sérgio, Emílio e,
Hamilton e Trajano.
Sou privilegiado.*

AGRADECIMENTOS

A todos que de forma direta ou indireta, sempre com disposição e simpatia, ajudaram na execução deste estudo e, em particular,

Ao **Prof. Titular Carlos Roberto Padovani**, do Departamento de Estatística do Instituto de Biociências de Botucatu (UNESP), que liquidificou números e ordenou meus pensamentos;

Ao **Prof. Dr. Sergio Luis Filisbino**, do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências de Botucatu (UNESP), que dissolveu ossos e mediu o quase invisível;

Aos **Profs. Dr. Hamilton da Rosa Pereira e Trajano Sardenberg** e à Diretora da Biblioteca do Campus de Botucatu (UNESP), **Enilze de Souza Nogueira Volpato** (ícone deste agradecimento), que revisaram este texto, durante sua elaboração. Os erros, porventura ainda presentes, situam-se em porções do texto, escritos *a posteriori*.

Ao **Prof. Dr. Sergio Swain Muller**, que esteve, sempre, disposto a prestar apoio e ajuda, quando dele necessitei.

Ao Sr. **Luis Carlos Bardella**, que, com seu, saudável, receio a dentes afiados foi inestimável, juntamente com os demais funcionários do Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia e Ortopedia da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP);

Ao **Sr. Carlos Luís Miguel**, o Carlão, que diagramou, paginou, ordenou e, ainda, ensinou boa parte do que sei do Word e do Power Point;

Aos **funcionários** do Departamento de Cirurgia e Ortopedia e da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP). Sou, igualmente, grato pela ajuda e pela forma com que a prestaram.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Ultra-Som.....	13
1.2 Ultra-Som e Crescimento Ósseo.....	17
1.3 Modelo Animal em Experimentação.....	20
2 OBJETIVO	23
3 MATERIAL E MÉTODO	25
3.1 Animal de Experimentação.....	25
3.2 Grupos Experimentais.....	25
3.2.2 Momentos do experimento.....	26
3.3 Atributos Estudados.....	26
3.3.1 Evolução.....	26
3.3.2 Medidas.....	27
3.4 Modelo Experimental.....	27
3.5 Técnicas Utilizadas.....	28
3.5.1 Equipamento.....	28
3.5.2 Anestesia.....	28
3.5.3 Aplicação do ultra-som.....	28
3.5.4 Avaliação clínica e tricotomia.....	29
3.5.5 Recuperação anestésica.....	29
3.5.6 Obtenção das peças.....	29
3.5.7 Medidas ósseas.....	30
3.5.8 Morfometria.....	31
3.5.9 Metodologia estatística.....	31
3.6 Figuras.....	33
4 RESULTADO	43
4.1 Peso.....	43
4.2 Comprimento do Fêmur.....	47
4.2.1 Comprimento do fêmur - 30 aplicações de ultra-som.....	47
4.2.2 Comprimento do fêmur - 45 aplicações de ultra-som.....	51
4.3 Comprimento da Tíbia.....	55

4.3.1 Comprimento da tíbia - 30 aplicações de ultra-som.....	55
4.3.2 Comprimento da tíbia - 45 aplicações de ultra-som.....	59
4.4 Comprimento do Membro.....	63
4.4.1 Comprimento do membro – 30 aplicações de ultra-som.....	63
4.4.2 Comprimento do membro - 45 aplicações de ultra-som.....	67
4.5 Largura do Fêmur.....	71
4.5.1 Largura do fêmur - 30 aplicações de ultra-som.....	71
4.5.2 Largura do fêmur - 45 aplicações de ultra-som.....	75
4.5.3 Largura da tíbia - 30 aplicações de ultra-som.....	79
4.5.4 Largura da tíbia - 45 aplicações de ultra-som.....	83
4.6 Comprimento do Membro, Comprimento do Fêmur, Comprimento da Tíbia; Largura do Fêmur e Largura da Tíbia.....	87
4.7 Morfometria.....	94
4.7.1 Morfometria da epífise distal do fêmur direito.....	94
4.7.2 Morfometria da epífise proximal da tíbia direita.....	106
4.7.3 Morfometria – Figuras.....	118
5 DISCUSSÃO	128
5.1 Animal de Experimentação.....	128
5.2 Modelo de Agressão.....	129
5.2.1 Local.....	129
5.2.2 Método.....	130
5.2.3 Avaliação clínica.....	132
5.2.4 Morfometria.....	135
5.2.5 Considerações finais.....	136
6 CONCLUSÕES	139
7 REFERÊNCIAS	141

RESUMO

RESUMO

Objetivos: O propósito deste estudo é determinar os efeitos do ultra-som terapêutico em baixa potência sobre a disco epifisial e o crescimento ósseo distal do fêmur e proximal da tíbia, em ratos jovens.

Material e Método: Ratus Norvegicus com quatro semanas de vida, machos, totalizando 105 animais, foram submetidos à terapêutica de ultra-som (1,0 MHz, potência de 0,4 watt/cm², cabeçote fixo, pulso contínuo, 10 minutos de duração, três ou quatro vezes por semana), na face medial do joelho direito. Um grupo de animais foi submetido a 30 aplicações de ultra-som, até a 13^a semana de vida e, outro a 45 aplicações, até a 18^a semana de vida. Os animais foram acompanhados até os seis meses. Foram estudadas as medidas do comprimento do fêmur e da tíbia e da largura das epífises distal do fêmur e proximal da tíbia e, a morfometria da altura do disco epifisial, como um todo e, de suas zonas histológicas. Os dados foram submetidos à análise de variância – fatorial inteiramente aleatorizado no nível de significância de 5%.

Resultados: Não foram encontradas diferenças significativas no crescimento ósseo longitudinal ou das larguras das epífises quando comparados lados direito e esquerdo nos grupos tratados (G1 e G2) e lado direito dos grupos tratados em relação ao respectivo controle (G3 e G4). Não houve diferença quando comparados os grupos tratados com 30 aplicações e 45 aplicações de ultra-som.

A morfometria mostrou diferenças, somente na tíbia, em que tratado foi maior que controle, tanto para 30 quanto para 45 aplicações de ultra-som. Tratado foi maior do que controle, no disco epifisial, nos três momentos estudados; na zona de proliferação, somente na 13^a semana; e, na zona hipertrófica na 18^a e 26^a semanas.

Conclusão: O ultra-som terapêutico, nas condições deste trabalho, não provocou alterações do comprimento longitudinal do fêmur e da tíbia e da largura das epífises distal do fêmur e proximal da tíbia. As medidas da morfometria mostraram, para a tíbia, diferenças em relação ao controle.

Palavras chaves: ultra-som; terapia por ultra-som; ratos; epífises; lâmina de crescimento; crescimento ósseo; histologia.

ABSTRACT

ABSTRACT

Objective: The purpose of this study was to determine the effects of low-power ultrasound therapy on the epiphyseal plate and the bone growth of the distal femur and the proximal tibia in young rats.

Material and Method: One hundred five of four-week-old *Rattus norvegicus* males received ultrasound treatment of continuous therapeutic dose (1.0 MHz frequency, 0.4 watt/cm², fixed probe, 10 minutes three or four times a week) on the medial face of the right knee. One group of animals underwent 30 ultrasound applications until the age of 13 weeks, and the other received 45 applications until the age of 18 weeks. The animals were followed up until they were six months old (26 weeks). Assessment included the measurement of the length of the femur and the tibia, the width of the femoral distal epiphysis and the proximal tibial epiphysis, and the morphometry of the reserve plus proliferative (Proliferative) and hypertrophic plus calcified hypertrophic (Hypertrophic) zones, as well as width of the epiphyseal plate. Totally-randomized factorial variance analysis of the data was performed with significance level set at 5%.

Result: No significant differences were observed in longitudinal bone growth or epiphyseal width when right and left sides were compared in treated groups (G1 and G2) or between the right side of the treated group and untreated groups (G3 and G4). There was no difference between the group receiving 30 ultrasound applications and that receiving 45 applications.

Morphometry revealed that, in comparison with their controls, the groups treated with both 30 and 45 ultrasound applications showed differences only in the tibia. The epiphyseal plate width was larger at all three study time points. The Proliferative zone was increased at week 13 only, and the Hypertrophic zone at weeks 13 and 26.

Conclusion: In this study, ultrasound therapy caused no change in the longitudinal growth of the femur and tibia, or in the width of the femoral distal epiphysis and tibial proximal epiphysis.

Key-words: ultrasound; ultrasound therapy; rats; epiphyses; growth plate; bone growth; histology.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Alterações congênitas, genéticas ou adquiridas que possam ocasionar discrepância de tamanho entre os membros tem sido objeto de proposições de tratamento com o objetivo de aumentar ou diminuir o comprimento longitudinal de um dos membros para equalizá-los ou minimizar a diferença. Pacientes cujos membros inferiores possuam diferenças significativas, desenvolvem alterações na marcha com conseqüentes deformidades, desde a coluna vertebral até o pé, em razão de modificações do eixo de apoio durante a locomoção, obrigando-o a utilizar necessárias, porém, desconfortáveis e antiestéticas, órteses.

As primeiras cirurgias corretivas propunham o encurtamento do membro maior, quando a diferença de comprimento chegava à, no máximo, cinco centímetros (cm). Além de intervir em membro são, médicos e pacientes, relutavam em aceitar e realizar encurtamentos maiores. Em 1978, Wagner mostrou a possibilidade de substanciais alongamentos ósseos, no membro afetado, em até 18 cm, propondo sistema que ficou conhecido como “Alongador de Wagner”.

Vários trabalhos desde então demonstraram a viabilidade do alongamento ósseo com diferentes tipos de sistemas (Cambras, 1984; Ilizarov a,b, 1989) e, atualmente, o Fixador de Ilizarov é considerado ferramenta adequada para esse e outros propósitos, não isento de complicações (Gebauer, 2005), como infecções, necroses, lesões nervosas e vasculares, retardo de consolidação e pseudo-artroses, deformidades ósseas e, até mesmo amputações (Sharma, 1996).

A procura de meios não invasivos que pudessem estimular o crescimento ósseo, sem provocar efeitos colaterais significativos foi e ainda é objeto de investigação e motivou este estudo sobre o efeito da aplicação do ultra-som sobre o disco epifisial.

Qual seria o potencial do ultra-som terapêutico como estimulador do crescimento ósseo longitudinal em alterações como o fêmur curto congênito, pseudo-artrose congênita de tíbia, encurtamentos traumáticos na criança e alterações em torno do eixo ósseo longitudinal?

1.1 Ultra-Som

Denomina-se ultra-som emissões sonoras com freqüências acima de 20.000 Hertz (Hz) ou 20 Kilo Hertz (KHz), já que o som audível, para o ser humano, pode variar, do mínimo de 20 Hz de freqüência até o máximo de 20 KHz. Ondas de som audível e de ultra-som (inaudível) são fisicamente semelhantes, sendo as ondas ultra-sonoras menores em comprimento e em amplitude e, de freqüência mais alta.

A pressão aplicada aos tecidos pelo ultra-som terapêutico varia entre uma e quatro atmosferas e a distância entre a máxima e mínima compressão é de 10 milímetros. A velocidade das ondas ultra-sonoras é de 1.500 metros por segundo (mais de quatro vezes a velocidade do som no ar) e amplitude de onda entre um e dez nanômetros. As partículas afetadas pelo ultra-som oscilam, permanecendo no local, e a onda é que caminha pelos tecidos (Leighton, 2007).

Durante a emissão de ultra-som na freqüência de um milhão de Hertz (1 MHz) onda sonora de alta freqüência, de amplitude extremamente reduzida e velocidade alta, percorre os tecidos alternando a direção de propagação um milhão de vezes por segundo, provocando vários efeitos (térmicos, vibratórios, cavitação e outros efeitos não físicos) em sua passagem, dos quais o aquecimento é o mais evidente.

O ultra-som pode provocar efeito de cavitação nos tecidos com a formação de bolhas de gás, em que até mil atmosferas de pressão podem ser estabelecidas, em função do pulsar das ondas sonoras (Wells, 1997; Haar, 2007), devendo ser considerado importante fator nos efeitos biológicos, (Barnett et. al. 1997; Bailey et. al, 2003).

A impedância ao ultra-som, ou resistência à passagem em determinado meio, é tanto maior quanto maior for a freqüência, de tal maneira que, na água, uma onda com a freqüência de 1 MHz é absorvida 20.000 vezes mais do que uma onda de 1 KHz de freqüência (Leighton, 2007).

Interfaces são afetadas pelo ultra-som e é possível, pelo fato das ondas serem muito pequenas, dirigi-lo a determinado sítio ou porção tecidual, sem provocar alterações em tecidos circunvizinhos, concentrando as ondas e intensificando os efeitos (Barnett et. al., 1997; Bailey et. al., 2003).

Lehman & Delateur (1994) apontaram que os efeitos sobre os tecidos seriam decorrentes da elevação de temperatura tecidual, com conseqüente aumento do fluxo sanguíneo local, alterações no metabolismo dos tecidos envolvidos pelo possível aumento da permeabilidade de membranas. Sugeriram haver evidências entre o aumento de temperatura e os efeitos sobre tecidos nervosos e resposta inflamatória como edema, aumento de vascularização e necrose tecidual.

Estudos mais recentes sugeriram que os efeitos do ultra-som sobre os tecidos podem não depender de efeitos térmicos e até mesmo de efeitos da cavitação, já que em potências muito baixas não há nenhum aquecimento tecidual e/ou cavitação, detectáveis. As bases físicas exatas, relativas aos efeitos teciduais, ainda não estão completamente estabelecidas (Haar, 2007; Leighton, 2007).

Além das aplicações industriais do ultra-som (controle de qualidade de soldas metálicas, etc.), militares (radar e sonar) e prospecções (análises estratigráficas), a utilização na prática médica pode ser classificada em diagnóstica, terapêutica e outras aplicações (cirúrgicas, dentárias, oftalmológicas, absorção de drogas, cálculos renais, neoplasias, etc.), com características próprias (Wells, 1977; Haar, 1999, 2007; Bailey et. al., 2003).

Com finalidades diagnósticas (p.e. ultra-som obstétrico, “doppler” vascular, etc), utilizam-se aparelhos com emissão de alta freqüência entre 3 e 10 MHz, potências baixas na ordem de 0,001 a 0,005 W/cm² (Leighton, 2007). Esses equipamentos fornecem imagens, para diagnóstico, sem causar efeitos biológicos celulares detectáveis, embora persistam dúvidas e existam relatos de alterações, ainda que temporárias, após freqüentes aplicações em fetos de ratos (Tarantal et. al.,1995). Essa preocupação tem gerado artigos e recomendações técnicas (Barnett et. al., 2000; Haar, 2007).

Em outras aplicações médicas a potência pode variar de 1 a 3.000 W/cm², freqüência de 1 a 27 MHz, para fragmentação de cálculos renais (litotriptores); em instrumentos dentários para limpeza do esmalte; como instrumental cirúrgico para ressecção de tecidos, como na catarata; na remoção de metilmetacrilato em próteses articulares; como facilitador na reabsorção de medicamentos; em hemostasias pós-trauma e como tratamento

coadjuvante em neoplasias (Rubin et. al., 2001; Bailey et. al., 2003; Warden, 2003; Haar, 1999 e 2007; Leighton, 2007).

A aplicação, como coadjuvante no tratamento em câncer de próstata, utiliza aparelhos que emitem ultra-som de frequência de 1 a 4 MHz que podem fornecer potências elevadas de até 3.000 W/cm^2 (Uchida et. al, 2006; Haar, 2007). Nessa faixa de aplicações é chamado de ultra-som focal de alta intensidade (HIFU na sigla de língua inglesa de Hiper Intensity Focused Ultrasound).

Em contraposição ao HIFU temos o ultra-som pulsátil de baixa intensidade - LIPUS - (Low-Intensity Pulsatil Ultrasound) na qual são empregadas baixas potências na ordem de $0,001$ a $0,75 \text{ W/cm}^2$, mais comumente entre $0,03$ e $0,05 \text{ W/cm}^2$, em aparelhos que utilizam frequências de $1,0$ a $3,0 \text{ MHz}$ com excelentes resultados no estímulo à consolidação óssea (Heckman et. al., 1994; Mayr et. al., 2000; Protopappas et. al., 2005; Stein & Lerner, 2005; Claes & Willie, 2007).

Estudos que utilizaram baixas potências (por volta de $0,05 \text{ W/cm}^2$) mostraram que o ultra-som foi incapaz de proporcionar preenchimento de falhas ósseas em mandíbula de ratos, mas, desde Duarte (1983) e Xavier & Duarte (1983), têm-se observado ação positiva na consolidação de fraturas ósseas recentes, tanto naquelas de menor complexidade (Heckman et. al., 1994) quanto nas de maior complexidade (Leung et. al., 2004); retardos de consolidação (Gebauer, et. al., 2000), pseudo-artroses pós-fraturas (Lerner et. al., 2004) e em osteotomias para alongamento de membros (Gebauer e Correll, 2005).

Duarte (1983), em ratos previamente submetidos a osteotomia completa da fíbula e à perfuração do fêmur bilateralmente, estudou a aplicação de ultra-som pulsátil durante 4 a 18 dias, aplicação diária de 15 minutos, potência de $0,05 \text{ W/cm}^2$ e frequência de $1,65 \text{ MHz}$. Encontrou aumento da formação do calo ósseo no lado tratado em relação ao lado controle. Concluiu que o ultra-som, nestas condições, não provocaria aumento de temperatura nos tecidos.

Xavier & Duarte (1983), em trabalho clínico, aplicaram ultra-som na potência de $0,1 \text{ W/cm}^2$ em 27 pacientes com pseudo-artrose ou retardo de

consolidação, 20 minutos por dia e número variável de trinta a cento e vinte aplicações e obtiveram índice de 70% de consolidação. Desaconselharam o uso clínico utilizando freqüências mais baixas ou mesmo a aplicação de ultra-som em aparelhos fisioterápicos comuns, pelo possível risco de cavitação.

Azuma et. al (2001), demonstraram que o ultra-som em baixa intensidade (LIPUS) na potência de $0,03 \text{ W/cm}^2$ estimulou a formação de calo ósseo em ratos, independente do instante das aplicações se logo após o momento da fratura, uma ou duas semanas após a mesma e, mesmo interrompendo a aplicação antes da completa consolidação. Concluíram que, embora houvesse estímulo ao calo de fratura em qualquer fase biológica, havia correlação positiva entre a intensidade do estímulo e o número de aplicações, tanto mais intensa quanto maior o número de aplicações.

Nos estudos publicados por Heckman et. al. (1994), Kristiansen et. al (1997), Leung et. al. (2004), Lerner et. al. (2004) e Protopappas et. al. (2005) a utilização do ultra-som sobre a consolidação óssea pode ser visualizada e, nos de Mayr et. al. (2000), Rubin et.al. (2001) e Malizos et. al. (2006), revisões foram apresentadas e discutidos os diferentes resultados favoráveis ou não da literatura

Resultados aparentemente contraditórios estão presentes no estudo de Goddard et. al. (1983), que, experimentalmente, não encontraram ação antiinflamatória ao aplicar o ultra-som pulsátil na freqüência de 1,5 MHz, potências de 0,5 e de $2,0 \text{ W/cm}^2$, durante 2,5 ou 5 minutos, por três dias seguidos, na pele de ratos em modelo de processo inflamatório agudo e por Emmami et. al (1999), que aplicaram ultra-som em fraturas recentes da tíbia, submetidas a fixação intramedular e não encontraram estímulo á formação do calo ósseo.

O ultra-som utilizado nas práticas fisioterápicas, com a finalidade de aquecimento de tecidos, tratamento da diminuição da mobilidade articular, fraqueza, dores e espasmos musculares, reabsorção de hematomas ou derrames articulares, emprega potências entre $0,05$ a $2,5 \text{ W/cm}^2$, freqüências entre 1,0 MHz (um milhão de ciclos por segundo) a 3,0 MHz (Robertson, 2002), embora a mais utilizada seja de 1 MHz (Haar, 1999, 2007).

O ultra-som terapêutico está indicado em situações especiais, nas quais não podem ser empregados os emissores de ondas curtas e de micro-ondas, sendo considerado seguro em pacientes com implantes metálicos (Lehman & Delateur, 1994), pois não aquece o metal e, também, em tecidos profundos, em razão de provocar aquecimento seletivo (aquecendo a musculatura mais do que a pele e o tecido celular subcutâneo), ação provavelmente dependente do tamanho das moléculas (Haar, 2007).

As emissões de ondas podem ser de forma contínua ou pulsátil, esta com várias combinações entre a frequência de pulso (a cada 10 KHz e até 100 KHz) e entre o tempo (em milissegundo) de emissão e o intervalo até o próximo pulso (1:10, 1:1 mais usualmente, 2:8 – em que o primeiro número expressa a duração do pulso e o último o tempo total entre dois pulsos).

Apesar de poder o ultra-som terapêutico, ser utilizado mais de uma vez ao dia, com a duração de três a vinte minutos em cada aplicação, o padrão terapêutico mais utilizado é aplicá-lo durante cinco a vinte minutos, uma única vez ao dia, todos os dias ou mesmo em dias alternados (de três a cinco aplicações semanais), com potências entre 0,3 e 1,0 W/cm².

1.2 Ultra-Som e Crescimento Ósseo

Desde a década de 1930 o ultra-som tem sido motivo de estudos a respeito dos efeitos biológicos inicialmente sobre o sistema músculo-esquelético e, depois sobre vários outros tecidos. Publicações iniciais, como as de Nelson et. al. (1950), Buchtala (1949, 1952), mostraram a utilização de diferentes delineamentos em relação ao número de aplicações e potência, tempo de duração e, de maneira geral foram utilizadas, em animais, altas potências (dois ou mais W/cm²). Os resultados mostraram que, nessas condições, os efeitos foram lesivos aos tecidos, recomendando-se cautela em sua utilização.

A partir da década de 1950 houve aumento na quantidade de estudos publicados sobre efeitos biológicos do ultra-som terapêutico, em língua inglesa e outras, sobre os efeitos fisioterápicos, como coadjuvante na cicatrização de tecidos, estímulo ao aumento da vascularização tecidual, estímulo ou inibição ao crescimento ósseo longitudinal e preenchimento de

falhas ósseas em mandíbulas, ossos chatos e longos. Artigos sobre os efeitos na cicatrização de pele, tendões, em fraturas ósseas e também sobre o disco epifisial e o crescimento ósseo foram publicados (De Forest et. al., 1953; Lehman, 1953; Ito, 1964; Lehman et. al. *a, b* 1967; Abramovich, 1970; Dyson & Pond, 1973; Coakley, 1978; Goddard et. al., 1983; Duarte, 1984; Kramer, 1984; e Xavier & Duarte, 1984).

Estes estudos utilizaram várias espécies de animais como coelhos, ovelhas, cães, ratos e outros; potências entre 0.5 e 15 W/cm²; número de aplicações entre uma e 25 vezes e tempo de cada aplicação entre 1 a 30 minutos.

Apesar dos diferentes delineamentos e animais utilizados, que tornam difícil a comparação, os resultados formaram as bases do tratamento fisioterápico (potência, número de aplicações e tempo de cada aplicação), na terapêutica clínica atual, descritos por Lehman & Delateur (1994), restrito aos tecidos do sistema músculo-esquelético, excluídas ou contra-indicadas a utilização no olho, sistema nervoso central, disco epifisial, útero gravídico, tumores, coração, tecidos mal vascularizado e nas situações em que o aumento da temperatura não seja desejado.

De Forest et. al (1953), utilizaram cães e coelhos, divididos em três grupos, aos quais aplicou ultra-som na potência de 10 W/cm² por cinco ou dez minutos, e 5 W/cm² por cinco minutos. Realizaram entre uma a 21 aplicações por animal, sempre no terço superior da tíbia e estudaram as alterações radiológicas decorrentes. Relataram aumento, diminuição e irregularidade da densidade óssea, “escorregamento” e fechamento do disco epifisial, lesões ósseas grosseiras, subluxação do joelho, edema e úlceras de pele, diminuição do crescimento da tíbia e do fêmur. Concluíram que o ultra-som não causa aumento de crescimento ósseo, possui efeito destrutivo imprevisível sobre o disco epifisial e estruturas adjacentes e que o uso, em crianças, estaria contra-indicado.

Ito (1964) realizou experimento em coelhos com a aplicação de ultra-som em potências diversas. Na potência de 2 W/cm² em aplicações diárias de 15 minutos durante 21 dias, relatou a ocorrência de hemorragias ósseas, alterações celulares e irregularidades na zona de proliferação do disco epifisial,

diminuição do número de osteoblastos e da formação de osso primário e secundário e, úlceras de pele. Na potência de 0,2 e 0,5 W/cm², em aplicações diárias de cinco minutos durante dois dias, observou sinais de aumento do crescimento ósseo, irregularidades na zona de cartilagem em repouso e na zona de disposição em paliçada, que interpretou como alterações histológicas do disco epifisial. Na potência de 10 W/cm², por cinco minutos e por dois dias, relatou alterações que interpretou como tendência à obstrução ao crescimento ósseo.

Apesar das divergências quanto à possibilidade do ultra-som provocar lesão tecidual no disco epifisial, aparentemente este efeito poderia estar relacionado à intensidade da potência utilizada.

Com o objetivo de estabelecer modelo que pudesse oferecer maiores informações sobre esta ação, desenvolveu-se estudo experimental (Barreto, 1998), no qual ultra-som terapêutico foi aplicado em diferentes potências ,sobre a face medial do joelho, em ratos com quatro semanas de vida ao início do experimento, momento em que o disco epifisial encontra-se em plena atividade biológica (Kember, 1973). Nesse estudo o número e o tempo de cada aplicação foi o mesmo para todos os animais e, além do lado contralateral como controle, um grupo de animais não submetidos ao ultra-som, foram também utilizados como controle. Os animais foram acompanhados até os seis meses de vida, sacrificando-se amostras dos animais ao término da aplicação do ultra-som, na 13^a semana de vida e aos seis meses de vida (quando o crescimento ósseo é residual).

O estudo concluiu por haver correlação positiva entre as potências mais altas de ultra-som (1,5 e 1,0 W/cm²) e lesões teciduais e, ausência de lesões em potência mais baixa (0,5 W/cm²) que o ultra-som terapêutico pode ou não provocar alterações indesejadas em partes moles e tecido ósseo, incluindo-se o disco epifisial, dependendo da potência utilizada.

Lâminas histológicas de todos os animais envolvidos foram submetidas a exaustiva análise, encontrando-se alterações histopatológicas nos animais dos grupos submetidos a potências mais elevadas (1,0 e 1,5 W/cm²), mas não na potência de 0,5 W/cm².

Apesar de não ter sido encontrada nenhuma correlação estatística entre a aplicação de ultra-som na potência de $0,5 \text{ W/cm}^2$ e diminuição ou estímulo ao crescimento ósseo o estudo indicou que estudos mais aprofundados, sobre o efeito da aplicação prolongada sobre o crescimento ósseo, seriam pertinentes.

1.3 Modelo Animal em Experimentação

Na utilização do rato como animal de experimentação deve-se sempre considerar a capacidade de recuperação desse animal. Barnes et al. (1947), mostraram que, submetendo o rato à privação alimentar durante longos períodos (330 ou até 900 dias), ocorreu diminuição na taxa de crescimento, quando comparados com animais que receberam alimentação *ad-libitum*. Entretanto, ao interromperem a privação alimentar houve recuperação das taxas normais de crescimento e os animais atingiram desenvolvimento corpóreo comparável aos do grupo controle, mesmo quando a normalização alimentar ocorreu em animais adultos. Nesse estudo, os autores, concluíram que o disco epifisial da tíbia, que havia diminuído em altura durante a restrição alimentar, voltou, após o término da restrição, a ter espessura comparável ao disco epifisial do animal jovem.

Não é, portanto, isenta de dificuldades ou limitações a transposição de avaliações biológicas do rato para o homem, ainda mais com a persistência do disco epifisial no indivíduo adulto. Modelo baseado nesse animal torna, entretanto, possível estudar os efeitos de determinado tratamento sobre o crescimento do animal, em prazo relativamente curto, a custo aceitável, em razão da brevidade do ciclo de vida.

A utilização do ultra-som terapêutico pulsátil dificulta a comparação dos dados, pois, além da variável potência, tempo de exposição e número de aplicações, temos que considerar a frequência de emissão dos pulsos, a duração do tempo do pulso e também o intervalo entre os mesmos. Para exemplificar, as opções disponíveis nos aparelhos de ultra-som mais recentes incluem: potência entre $0,1$ a $2,0 \text{ W/cm}^2$; frequência de emissão de $1,0$ a $3,0 \text{ MHz}$; taxa de repetição de pulso a cada 16 , 48 ou 100 Hz ; duração de pulso de 1 , 2 , 4 , 5 , 6 , $10,5$, 12 e 31 mili segundos (ms) e, intervalo entre dois pulsos de 1

a 9 ms. Associe-se tempo de aplicação de três a vinte minutos e ainda número de aplicações de uma a sessenta, o que reforça a dificuldade de comparação entre as muitas possibilidades.

Com base nessas considerações e empregando equipamento de ultra-som terapêutico, de uso comum nos hospitais e clínicas de fisioterapia, considerou-se justificável o desenvolvimento de estudo que utilize experimentalmente a aplicação de ultra-som contínuo por tempo prolongado, sobre o disco epifisial em ratos jovens, utilizando frequência encontrada na maioria dos aparelhos de ultra-som, baixa potência e número de aplicações semanais semelhantes aos da prática clínica.

OBJETIVO

2. OBJETIVO*

O objetivo da presente investigação foi analisar o efeito, sobre o crescimento ósseo, do ultra-som terapêutico contínuo aplicado no disco epifisial distal do fêmur e proximal da tíbia de ratos em crescimento.

* Estudo desenvolvido no Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia e Ortopedia da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP. Aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal – parecer no 250/2002 em 25 de março de 2002.
Os termos anatômicos estão em conformidade com a Sociedade Brasileira de Anatomia. Terminologia Anatômica 1a ed. São Paulo: Manole, 2001.

MATERIAL E MÉTODO

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Animal de Experimentação

Foram utilizados 122 ratos (*Rattus Norvegicus* – classe Wistar), machos, clinicamente sadios, idade inicial de quatro semanas, peso médio de 118 gramas, provenientes do Biotério Central do Campus de Botucatu – UNESP. Destes animais, 17 foram a óbito, não sendo incluídos no trabalho.

Os animais, numerados seqüencialmente com marcação nas orelhas, foram distribuídos por sorteio nos grupos e, mantidos por seqüência de numeração em caixas plásticas contendo cinco animais - na caixa nº 1 animais de número um a cinco, na caixa nº 2 animais de número seis a dez e assim sucessivamente (Figura 1).

Nenhuma restrição à deambulação foi imposta e os animais tiveram água e alimentação “ad libitum”, permanecendo em local com controle de temperatura durante o experimento.

3.2 Grupos Experimentais

Os animais foram divididos, por sorteio, em quatro grupos segundo o número de aplicações de ultra-som a que foram submetidos:

Grupo 1: G1- tratamento - 30 aplicações de ultra-som.

Os animais foram anestesiados e submetidos a 30 aplicações de ultra-som com duração de dez minutos cada, até a 13ª semana de vida, na potência de 0,4 watt/cm² sobre a face medial do joelho direito.

Grupo 2: G2 - tratamento – 45 aplicações de ultra-som.

Os animais foram anestesiados e submetidos a 45 aplicações de ultra-som com duração de dez minutos cada, até a 13ª semana de vida, na potência de 0,4 watt/cm² sobre a face medial do joelho direito.

Grupo 3: G3 - controle de G1 – 30 anestésias.

Os animais foram anestesiados e submetidos a 30 aplicações, até a 13ª semana de vida, permanecendo o cabeçote do ultra-som (não conectado ao aparelho) sobre a face medial do joelho direito por 10 minutos.

Grupo 4: G4 - controle de G2 – 45 anestésias.

Os animais foram anestesiados e submetidos a 45 aplicações, até a 18ª semana de vida, permanecendo o cabeçote do ultra-som (não conectado ao aparelho) sobre a face medial do joelho direito por 10 minutos.

O lado esquerdo foi utilizado, também, como controle (pareado) em todos os grupos.

3.2.2 Momentos do experimento

M0: animais com 04 semanas de vida – início do ultra-som

M1: animais com 13 semanas de vida

M2: animais com 18 semanas de vida

M3: animais com 26 semanas de vida – término do experimento.

Dez animais dos grupos G1 e G3 foram escolhidos, por sorteio, para eutanásia nos momentos M1, M2 e M3.

Dez animais dos grupos G2 e G4 foram escolhidos, por sorteio, para eutanásia nos momentos M2 e M3.

Tabela 1: Divisão dos grupos estudados

GRUPO	Número de aplicações de ultra-som	Número de anestésias	Sacrifícios dos animais (semana de vida)	Número de animais n = 122	Óbitos
G1	30	30	13 ^a 18 ^a 26 ^a	35	04
G2	45	45	18 ^a 26 ^a	25	01
G3	0	30	13 ^a 18 ^a 26 ^a	36	06
G4	0	45	18 ^a 26 ^a	26	06

3.3 Atributos Estudados

3.3.1 Evolução

Os animais foram submetidos a avaliação clínica, diariamente controlando-se a ingestão de água e alimentos, periodicamente (antes da

aplicação do ultra-som) através da marcha e da atividade física e, semanalmente (após a anestesia) a mobilidade articular passiva de ambos os joelhos e peso.

3.3.2 Medidas

3.3.2.1 Dimensões ósseas

Nos momentos M1, M2 e M3 do experimento foram obtidas as medidas, em mm, dos comprimentos do fêmur e da tíbia e das larguras das epífises distal do fêmur e proximal da tíbia.

3.3.2.2 Disco epifisial

Das peças, fixadas em formol, foram confeccionadas lâminas histológicas e realizada a morfometria do disco epifisial distal do fêmur e proximal da tíbia.

3.4 Modelo Experimental

O experimento consistiu na aplicação, de ultra-som contínuo na potência de $0,4 \text{ W/cm}^2$, na face medial do joelho direito, três ou quatro vezes por semana, num total de 30 (Grupo G1) ou 45 (Grupo G2) aplicações. Os animais anestesiados e fixados na goteira de Claude Bernard foram submetidos ao ultra-som por dez minutos, uma vez ao dia (figura 4), três ou quatro vezes por semana.

Dois outros grupos de animais foram constituídos e submetidos a procedimento semelhante ao empregado nos grupos G1 e G2, fixados na goteira de Claude Bernard por dez minutos, uma vez ao dia (figura 4), três ou quatro vezes por semana com o aparelho de ultra-som desligado. No primeiro grupo (G3), os animais foram submetidos a 30 anestésias (grupo controle de G1) e no outro grupo (G4), a 45 anestésias (grupo controle de G2).

Nos grupos G1 e G3, ao término das 30 aplicações, na 13^a semana de vida e em cada um dos momentos 18^a e 26^a semanas de vida, foram sorteados dez animais para eutanásia e obtenção dos parâmetros estudados.

Nos grupos G2 e G4, ao término das 45 aplicações, na 18^a semana de vida e no momento 26^a semana de vida, foram sorteados dez animais para eutanásia e obtenção dos parâmetros estudados.

3.5 Técnicas Utilizadas

3.5.1 Equipamento

Foram utilizados dois aparelhos de ultra-som - SonoPulse Especial (Grupo I - classe A) – IBRAMED (Figuras 2 e 3), frequência de 1 e 3 MHz, modo de emissão contínua ou pulsátil (não uniformidade de feixe – 30%), transdutores de quartzo, de superfície irradiante (área efetiva de radiação - 20%) de 3,5 cm² e de 1,0 cm² (Figura 4), potência de ultra-som de 0,3 a 7,0 watt; de uso rotineiro na prática clínica. Os aparelhos foram programados eletronicamente para emissão contínua, com 1 Mhz de frequência, potência de 0,4 watt/cm², pelo tempo de 10 minutos em cada aplicação, utilizando-se a superfície irradiante de 1cm² (Figura 5).

3.5.2 Anestesia

Os animais foram anestesiados, com pentobarbital sódico a 2%, na dose de 1ml/kg de peso, em injeção peritoneal. Frações adicionais da dose eram injetadas, se necessário, para a obtenção do nível anestésico adequado.

3.5.3 Aplicação do ultra-som

Os animais foram fixados na goteira de Claude Bernard em decúbito dorsal com a face medial do joelho direito em flexão aproximada de trinta graus, levados, aleatoriamente, a um dos dois aparelhos de ultra-som (Figura 6) e submetidos a tratamento, por dez minutos com aplicação, ou não, de ultra-som terapêutico contínuo, pelo método da bexiga d'água, de Buchtala (1952), na face medial do joelho direito na potência de 0,4 watt/cm² (Figura 7) e cabeçote de 1cm² de área.

As bexigas d'água (Figura 8) foram confeccionadas em látex (dedos de luvas de procedimento) em número de vinte. Em virtude do aquecimento da água, foram utilizadas rotativamente, ou seja, para cada aplicação do ultra-som

uma “nova” bexiga era utilizada, até que se completassem todas as vinte, que então eram reutilizadas da mesma maneira.

Como a emissão do ultra-som pode provocar a formação de bolhas de ar nas bexigas d’água, no início de cada aplicação, as bexigas eram inspecionadas e, se presentes, acarretavam o descarte da bexiga, substituída por uma nova.

O cabeçote foi fixado em uma haste de metal com pinças, colocando-se pequena pressão sobre a bexiga d’água, disposta na face antero-medial do joelho direito, permanecendo nessa posição durante toda a sessão de aplicação do ultra-som (Figura 8).

Nos animais dos dois grupos controles (G3 e G4) foi empregado o mesmo procedimento, exceto que o cabeçote não estava conectado ao aparelho de ultra-som, mantendo-se o animal anestesiado e imóvel durante dez minutos.

3.5.4 Avaliação clínica e tricotomia

Antes de cada aplicação do ultra-som, observou-se a marcha, a atividade física dos animais e, após a anestesia mediu-se semanalmente o peso, em balança comercial com precisão de 0,5g, examinou-se a pele do joelho direito e a movimentação passiva de ambos os joelhos. Periodicamente, após a anestesia, realizou-se a tricotomia do joelho direito e de parte da região abdominal.

3.5.5 Recuperação anestésica

Após a aplicação do ultra-som os animais ficaram reservados em ambiente aquecido até o despertar (Figura 9), sendo então colocados nas respectivas caixas já ativos, evitando-se a morte por sufocamento dos animais, semi-adormecidos.

Todo o experimento e procedimentos com os animais foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

3.5.6 Obtenção das peças

Nos três momentos do experimento em que se colheram dados, nas 13^a, 18^a e 26^a. semanas de vida e, após a eutanásia com dose letal do anestésico, os lados, direito e esquerdo, dos membros inferiores foram amputados na raiz do membro e “esqueletizados” (ressecção de toda a pele, tecido celular subcutâneo, ligamentos, fíbula e musculatura, preservando-se a cápsula articular do joelho) entre as articulações coxo-femoral e tíbio-társica (Figura 10).

3.5.7 Medidas ósseas

As medidas foram obtidas com paquímetro (figura 11), em centésimos de milímetros, dos comprimentos do fêmur e da tíbia; do conjunto fêmur-tíbia (comprimento do membro) e, da largura dos terços distal do fêmur e proximal da tíbia; nos lados direito (tratado) e esquerdo (controle pareado).

3.5.7.1 Comprimento do fêmur

A medida do comprimento do fêmur foi obtida tomando-se como ponto superior a incisura entre o trocânter maior e a cabeça femoral (colo anatômico), localizado justo ao trocânter maior e, como ponto inferior o côndilo lateral do fêmur, estando o joelho em completa flexão (Figura 12). O paquímetro foi posicionado no plano sagital do fêmur.

3.5.7.2 Comprimento da tíbia

A medida do comprimento da tíbia foi obtida tomando-se como ponto superior o planalto lateral da tíbia e como ponto inferior a superfície medial distal da tíbia, localizado justo ao maléolo medial, com o paquímetro posicionado no plano sagital da tíbia (Figura 13).

3.5.7.3 Comprimento do membro

A medida do comprimento do membro foi obtida tendo como ponto superior a incisura entre o trocânter maior e o colo do fêmur, localizado justo ao trocânter maior e ponto inferior a superfície medial distal da tíbia, localizado

justo ao maléolo medial, novamente com o paquímetro posicionado no plano sagital do membro. (Figura 14).

3.5.7.4 Largura da epífise distal do fêmur

A largura da epífise distal do fêmur foi obtida pela medida do maior diâmetro da epífise distal, no plano coronal (Figura 15 e 16).

3.5.7.5 Largura da epífise proximal da tíbia

A largura da epífise da tíbia foi obtida pela medida do maior diâmetro da epífise proximal, no plano coronal (Figura 17).

Em todas as medidas acima descritas os pontos ósseos são acidentes ósseos evidentes, posicionando-se as hastes do paquímetro de maneira inequívoca, qualquer que fosse a peça e o lado, eliminando erros decorrentes da variação do posicionamento do aparelho.

3.5.7.6 Examinador

O mesmo examinador realizou todas as medidas e, para a leitura no paquímetro utilizou lupa, para maior precisão.

3.5.8 Morfometria

Após as medidas, as peças foram identificadas (número e lado do animal) e fixadas em solução de formol a 10%.

Cinco animais, de cada grupo e momento, foram escolhidos por sorteio e, o membro direito foi descalcificado em solução de ácido clorídrico e as peças incluídas em parafina. Após a inclusão foram realizados cortes histológicos de microscopia ótica, no plano sagital, em seções de cinco micrômetros de espessura e as lâminas foram coradas pela técnica de hematoxilina e eosina.

Os cortes da epífise distal do fêmur foram realizados no côndilo medial e os cortes da tíbia em sua porção central. As lâminas adequadas foram levadas ao microscópio, procedendo-se a leitura morfométrica em programa computacional, obtendo-se as medidas da altura (largura) de zonas do disco

epifisial: Zona de Proliferação (Zonas de repouso, proliferação e maturação), Zona Hipertrófica (Zonas hipertrófica e hipertrófica calcificada) e Disco Epifisial (altura total do disco epifisial). Cada medida foi obtida pela média da leitura de três pontos distintos em cada animal.

3.5.9 Metodologia estatística

Utilizando o mesmo lote de animais em cada momento, foi realizada a técnica da análise de variância para o modelo com dois fatores em medidas repetidas, complementada com o intervalo de confiança simultâneos de Hotelling (Johnson & Wichern, 2002).

Foi, também, utilizada a técnica da análise de variância para o experimento completamente casualizado, complementada com o teste de Bonferroni para as comparações múltiplas de interesse (Zar 1999).

O nível de significância utilizado foi de 5%.

3.6 Figuras



Figura 1: Caixa padrão



Figura 2: Bancada



Figura 3: Aparelho de ultra-som



Figura 4: Cabeçote de ultra-som. Áreas de 3 e 1 cm²



Figura 5: Cabeçote de ultra-som mostrando a área de 1cm²



Figura 6: Animal na goteira de Claude Bernard



Figura 7: Aplicação com bexiga d'água



Figura 8: Método da bexiga d'água de Buchtala



Figura 9: Recuperação anestésica dos animais



Figura 10: Peça “esqueletizada” do membro



Figura 11: Paquímetro



Figura 12: Medida do comprimento do fêmur



Figura 13: Medida do comprimento da tíbia



Figura 14: Medida do comprimento do membro



Figura 15: Medida da largura do terço distal do fêmur



Figura 16: Medida da largura da epífise distal do fêmur



Figura 17: Medida da largura da epífise proximal da tíbia

RESULTADO

4 RESULTADO

4.1 Peso

A tabela 2 apresenta:

- os valores da média e do desvio padrão do peso dos animais, nos quatro grupos estudados - 30 aplicações de ultra-som (G1 - tratado e G3 - controle); - 45 aplicações de ultra-som (G2 - tratado e G4 - controle), nos momentos em que foram obtidas as medidas: 4^a semana de vida e início do experimento, 13^a semana de vida, 18^a semana de vida e 26^a semana de vida.

- o resumo do resultado da análise estatística ($p < 0,05$).

Na figura 18 estão dispostos os valores semanais dos pesos de todos os animais, independente do grupo a que pertencem, entre a 4^a. e a 26^a semana de vida.

Na figura 19 estão dispostos graficamente os valores da média nos quatro momentos em que foi obtido o parâmetro, mostrando a evolução do peso desde o início do experimento.

A tabela 3 apresenta a análise estatística com as hipóteses testadas e os comentários.

Tabela 2: Média e desvio padrão (g) do peso. Grupo 30 aplicações - G1 (tratado), G3 (controle) e Grupo 45 aplicações - G2 (tratado), G4 (controle). Lados direito e esquerdo, nos momentos 4^a, 13^a, 18^a e 26^a semanas de vida e, análise estatística

US	GRUPO	MOMENTO			
		4 ^a semana	13 ^a semana	18 ^a semana	26 ^a semana
30	G1	119 ± 13	367 ± 43 aAα	403 ± 45 aAα	502 ± 45 aAβ
	G3	113 ± 12	385 ± 33 aAα	435 ± 35 aAα	505 ± 75 aAβ
45	G2	119 ± 10	371 ± 37 aAα	396 ± 48 aAα	511 ± 41 aAβ
	G4	119 ± 13	359 ± 31 aAα	381 ± 30 aAα	479 ± 47 aAβ

Letras minúsculas: comparação do ultra-som – grupos tratados (G1 e G2) e grupos controles (G3 e G4), fixados o número de aplicações (30 ou 45) e o momento (13^a, 18^a e 26^a semanas)

Letras maiúsculas: comparação do número de aplicações, fixados o ultra-som e o momento

Letras gregas: comparação de momentos, fixados o número de aplicações e o ultra-som

OBS. Não há tratamento estatístico para o momento M0 – animais com quatro semanas de vida – início do experimento.

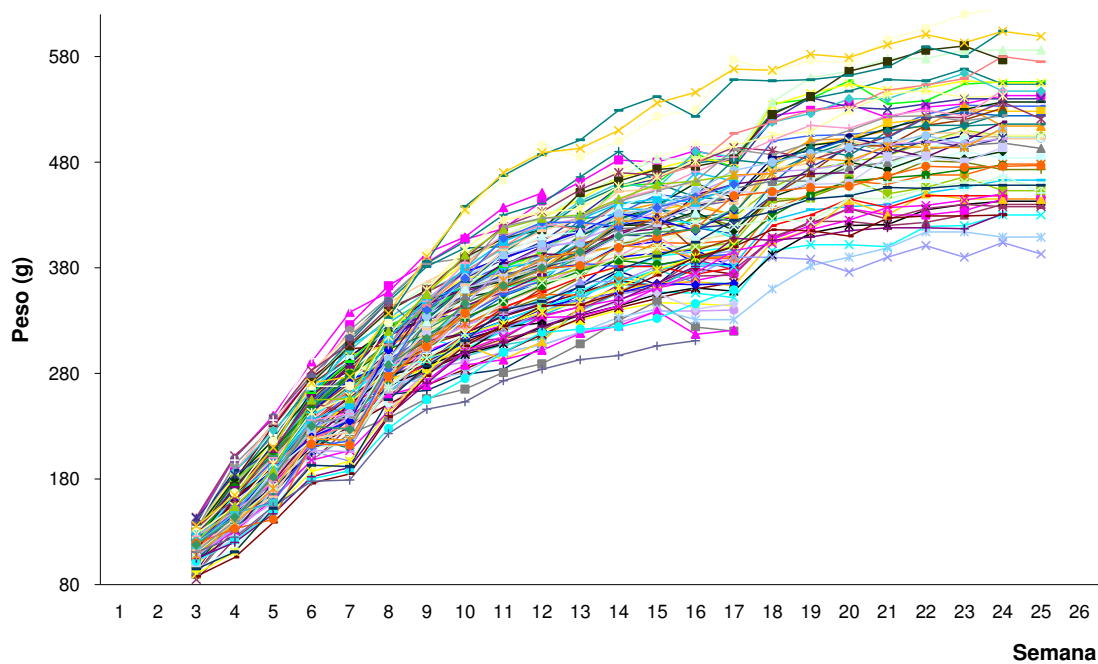


Figura 18: Peso semanal de cada animal dos quatro grupos entre a 4^a e a 26^a semana de vida

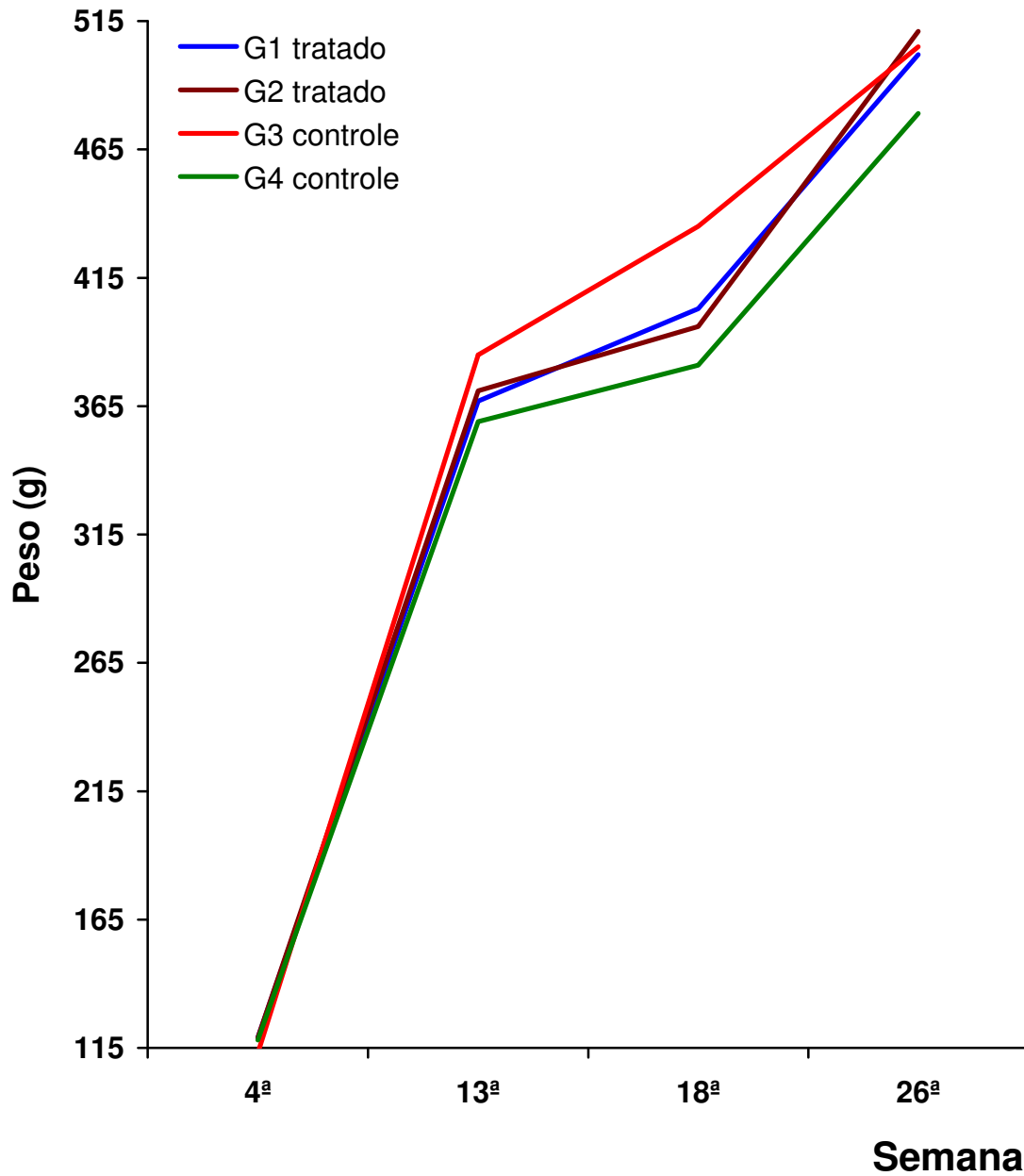


Figura 19: **Peso** - valores médios em cada grupo e momentos.

30 aplicações

G1 – Grupo tratado G3 – Grupo controle

45 aplicações

G2 – Grupo tratado G4 – Grupo controle

Tabela 3: Hipóteses testadas e comentários do peso. Grupo 30 aplicações - G1 (tratado), G3 (controle), Grupo 45 aplicações - G2 (tratado), G4 (controle). Lados direito e esquerdo, nos momentos estudados (13^a, 18^a, 26^a semanas)

HIPÓTESES TESTADAS		COMENTÁRIO		
Efeito do ultra-som (tratado - G1 e G2 e controle - G3 e G4), fixados momento (13 ^a , 18 ^a e 26 ^a) e número de aplicações (30 ou 45).	13 ^a semana	30 aplicações	G1 \cong G2	
		45 aplicações	G2 \cong G4	
	18 ^a semana	30 aplicações	G1 \cong G2	
		45 aplicações	G2 \cong G4	
	26 ^a semana	30 aplicações	G1 \cong G2	
		45 aplicações	G2 \cong G4	
	Efeito do número de aplicações, fixados momento e ultra-som.	13 ^a semana	G1 e G2	30 \cong 45 aplicações
			G3 e G4	30 \cong 45 aplicações
18 ^a semana		G1 e G2	30 \cong 45 aplicações	
		G3 e G4	30 \cong 45 aplicações	
26 ^a semana		G1 e G2	30 \cong 45 aplicações	
		G3 e G4	30 \cong 45 aplicações	
Efeito de momento, fixados número de aplicações e ultra-som.		30 ^a aplicações	G1	13 ^a \cong 18 ^a < 26 ^a
			G3	13 ^a \cong 18 ^a < 26 ^a
	45 ^a aplicações	G2	13 ^a \cong 18 ^a < 26 ^a	
		G4	13 ^a \cong 18 ^a < 26 ^a	

4.2 Comprimento do Fêmur

4.2.1 Comprimento do fêmur - 30 aplicações de ultra-som. Grupo tratado (G1) e Grupo controle (G3). Lados direito e esquerdo.

A tabela 4 apresenta:

- os valores da média e do desvio padrão do comprimento do fêmur dos animais, nos grupos G1 (tratado) e G3 (controle), nos momentos do experimento em que foram obtidas as medidas: 13^a semana de vida; 18^a semana de vida e 26^a semana de vida.
- o resumo do resultado da análise estatística ($p < 0,05$).

Na figura 20 estão dispostos graficamente os valores da média nos momentos em que foi obtido o parâmetro.

A tabela 5 apresenta a análise estatística com as hipóteses testadas e os comentários.

Tabela 4: Média e desvio padrão (mm) do comprimento do fêmur. Grupo 30 aplicações - G1 (tratado), G3 (controle). Lados direito e esquerdo, nos momentos estudados (13^a, 18^a, 26^a semanas) e análise estatística

GRUPO	LADO	MOMENTO		
		13 ^a semana	18 ^a semana	26 ^a semana
G1	direito	34,6 ± 2,40 aAα	35,6 ± 0,99 aAα	38,5 ± 0,88 aAβ
	esquerdo	34,3 ± 1,37 aAα	36,0 ± 0,71 aAβ	38,5 ± 1,13 aAλ
G3	direito	34,4 ± 1,64 aAα	35,5 ± 0,82 aAα	38,4 ± 1,57 aAβ
	esquerdo	34,6 ± 2,00 aAα	35,6 ± 0,78 aAα	38,7 ± 1,49 aAβ

Letras minúsculas: comparação do ultra-som (tratado – G1 e controle – G3), fixados o lado (direito e esquerdo) e o momento (13^a, 18^a e 26^a semanas)

Letras maiúsculas: comparação de lado, fixados o ultra-som e o momento

Letras gregas: comparação de momentos, fixados o ultra-som e o lado.

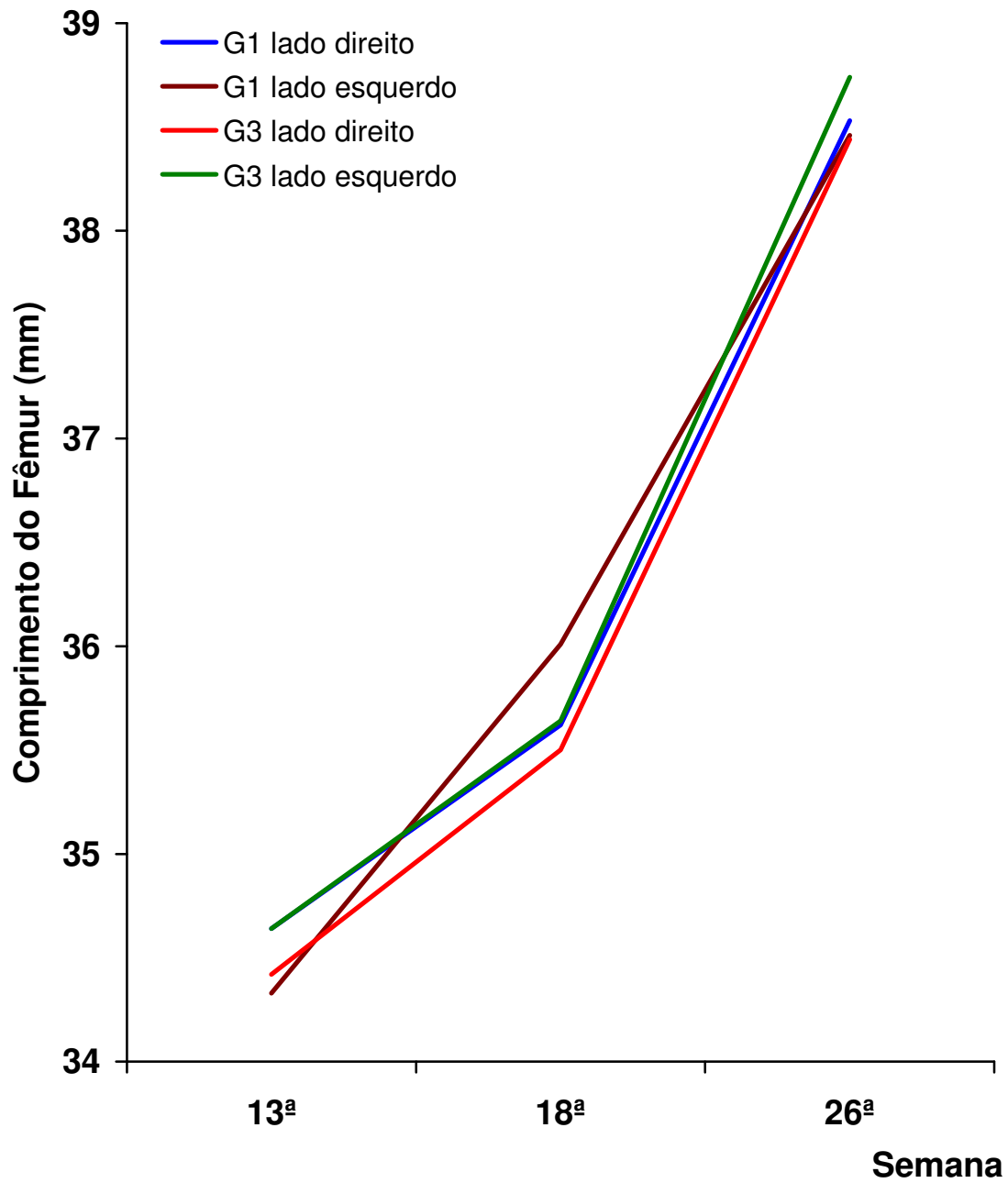


Figura 20: Comprimento do fêmur - 30 aplicações de ultra-som. Valores médios em cada grupo e momentos. G1 – Grupo tratado, G3 – Grupo controle

Tabela 5: Hipóteses testadas e comentários do comprimento do fêmur.
Grupo 30 aplicações - G1 (tratado), G3 (controle). Lados direito e esquerdo, nos momentos estudados (13^a, 18^a, 26^a semanas)

HIPÓTESES TESTADAS		COMENTÁRIOS	
Efeito do ultra-som (tratado - G1 e controle - G3), fixados momento (13 ^a , 18 ^a , 26 ^a semanas) e lado (direito e esquerdo).	13 ^a semana	direito	G1 \cong G3
		esquerdo	G1 \cong G3
	18 ^a semana	direito	G1 \cong G3
		esquerdo	G1 \cong G3
	26 ^a semana	direito	G1 \cong G3
		esquerdo	G1 \cong G3
Efeito de lado, fixados momento e ultra-som	13 ^a semana	G1	direito \cong esquerdo
		G3	direito \cong esquerdo
	18 ^a semana	G1	direito \cong esquerdo
		G3	direito \cong esquerdo
	26 ^a semana	G1	direito \cong esquerdo
		G3	direito \cong esquerdo
Efeito de momento, fixados grupo e lado.	tratado	G1	13 ^a \cong 18 ^a < 26 ^a
		G3	13 ^a < 18 ^a < 26 ^a
	controle	G1	13 ^a \cong 18 ^a < 26 ^a
		G3	13 ^a \cong 18 ^a < 26 ^a

4.2.2 Comprimento do fêmur – 45 aplicações de ultra-som. Grupo tratado (G2) e Grupo controle (G4). Lados direito e esquerdo

A tabela 6 apresenta:

- os valores da média e do desvio padrão do comprimento do fêmur dos animais, nos grupos G2 (tratado) e G4 (controle), nos momentos em que foram obtidas as medidas: M2 – 18^a semana de vida e M3 - 26^a semana de vida.

- o resumo do resultado da análise estatística ($p < 0,05$).

Na figura 21 estão dispostos graficamente os valores da média nos momentos em que foi obtido o parâmetro.

A tabela 7 apresenta a análise estatística com as hipóteses testadas e os comentários.

Tabela 6: Média e desvio padrão (mm) do comprimento do fêmur. Grupo 45 aplicações - G2 (tratado), G4 (controle). Lados direito e esquerdo, nos momentos estudados (18^a, 26^a semanas) e análise estatística

GRUPO	LADO	MOMENTO	
		18 ^a semana	26 ^a semana
G2	direito	35,5 ± 1,08 aAα	38,5 ± 0,93 aAβ
	esquerdo	36,1 ± 1,05 aAα	38,6 ± 1,01 aAβ
G4	direito	35,0 ± 0,78 aAα	37,8 ± 1,42 aAβ
	esquerdo	35,5 ± 1,08 aAα	38,1 ± 1,02 aAβ

Letras minúsculas: comparação do ultra-som (tratado – G2 e controle – G4), fixados o lado (direito e esquerdo) e o momento (18^a e 26^a semanas)

Letras maiúsculas: comparação de lado, fixados o ultra-som e o momento

Letras gregas: comparação de momentos, fixados o ultra-som e o lado.

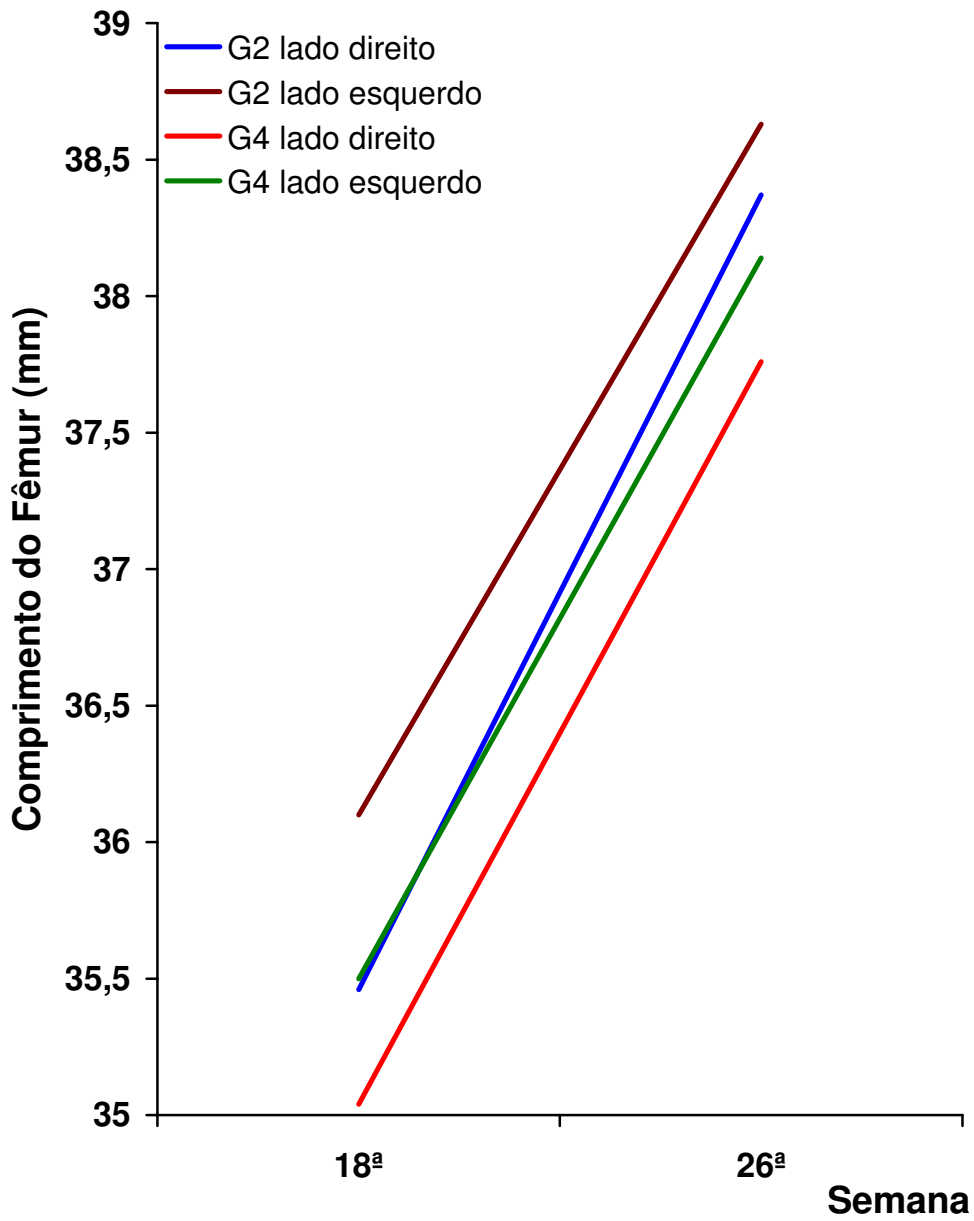


Figura 21: Comprimento do fêmur – 45 aplicações de ultra-som. Valores médios em cada grupo e momento. G2 – Grupo tratado; G4 – Grupo controle

Tabela 7: Hipóteses testadas e comentários do comprimento do fêmur.
Grupo 45 aplicações - G2 (tratado), G4 (controle). Lados direito e esquerdo, nos momentos estudados (18^a, 26^a semanas)

HIPÓTESES TESTADAS		COMENTÁRIOS	
Efeito do ultra-som (tratado - G2 e controle - G4), fixados momento (18 ^a 26 ^a semanas) e lado (direito e esquerdo).	18 ^a semana	direito	$G2 \cong G4$
		esquerdo	$G2 \cong G4$
	26 ^a semana	direito	$G2 \cong G4$
		esquerdo	$G2 \cong G4$
Efeito de lado, fixados momento e ultra-som	18 ^a semana	G2	direito \cong esquerdo
		G4	direito \cong esquerdo
	26 ^a semana	G2	direito \cong esquerdo
		G4	direito \cong esquerdo
Efeito de momento, fixados ultra-som e lado.	G2	direito	$18^a < 26^a$
		esquerdo	$18^a < 26^a$
	G4	direito	$18^a < 26^a$
		esquerdo	$18^a < 26^a$

4.3 Comprimento da Tíbia

4.3.1 Comprimento da tíbia - 30 aplicações de ultra-som. Grupo tratado (G1) e Grupo controle (G3). Lados direito e esquerdo.

A tabela 8 apresenta:

- os valores da média e do desvio padrão do comprimento da tíbia dos animais, nos grupos G1 (tratado) e G3 (controle), nos momentos do experimento em que foram obtidas as medidas: M1 - 13^a semana de vida; M2 – 18^a semana de vida e M3 - 26^a semana de vida.
- o resumo do resultado da análise estatística ($p < 0,05$).

Na figura 22 estão dispostos graficamente os valores da média nos momentos em que foi obtido o parâmetro.

A tabela 9 apresenta a análise estatística com as hipóteses testadas e os comentários.

Tabela 8: Média e desvio padrão (mm) do comprimento da tíbia. Grupo 30 aplicações, G1 (tratado), G3 (controle), Lados direito e esquerdo, nos momentos estudados (13^a, 18^a, 26^a semanas) e análise estatística

GRUPO	LADO	MOMENTO		
		13 ^a semana	18 ^a semana	26 ^a semana
G1	direito	39,2 ± 1,43 aAα	40,8 ± 0,93 aAβ	43,35 ± 0,87 aAλ
	esquerdo	39,2 ± 1,36 aAα	40,7 ± 0,98 aAβ	43,46 ± 0,92 aAλ
G3	direito	40,2 ± 0,50 aAα	40,6 ± 1,00 aAα	43,76 ± 1,53 aAβ
	esquerdo	40,3 ± 0,72 bAα	41,0 ± 0,60 aAα	43,76 ± 1,60 aAβ

Letras minúsculas: comparação do ultra-som (tratado - G1 e controle - G3), fixados o lado (direito e esquerdo) e o momento (13^a, 18^a e 26^a semanas)

Letras maiúsculas: comparação de lado, fixados o ultra-som e o momento

Letras gregas: comparação de momentos, fixados o ultra-som e o lado.

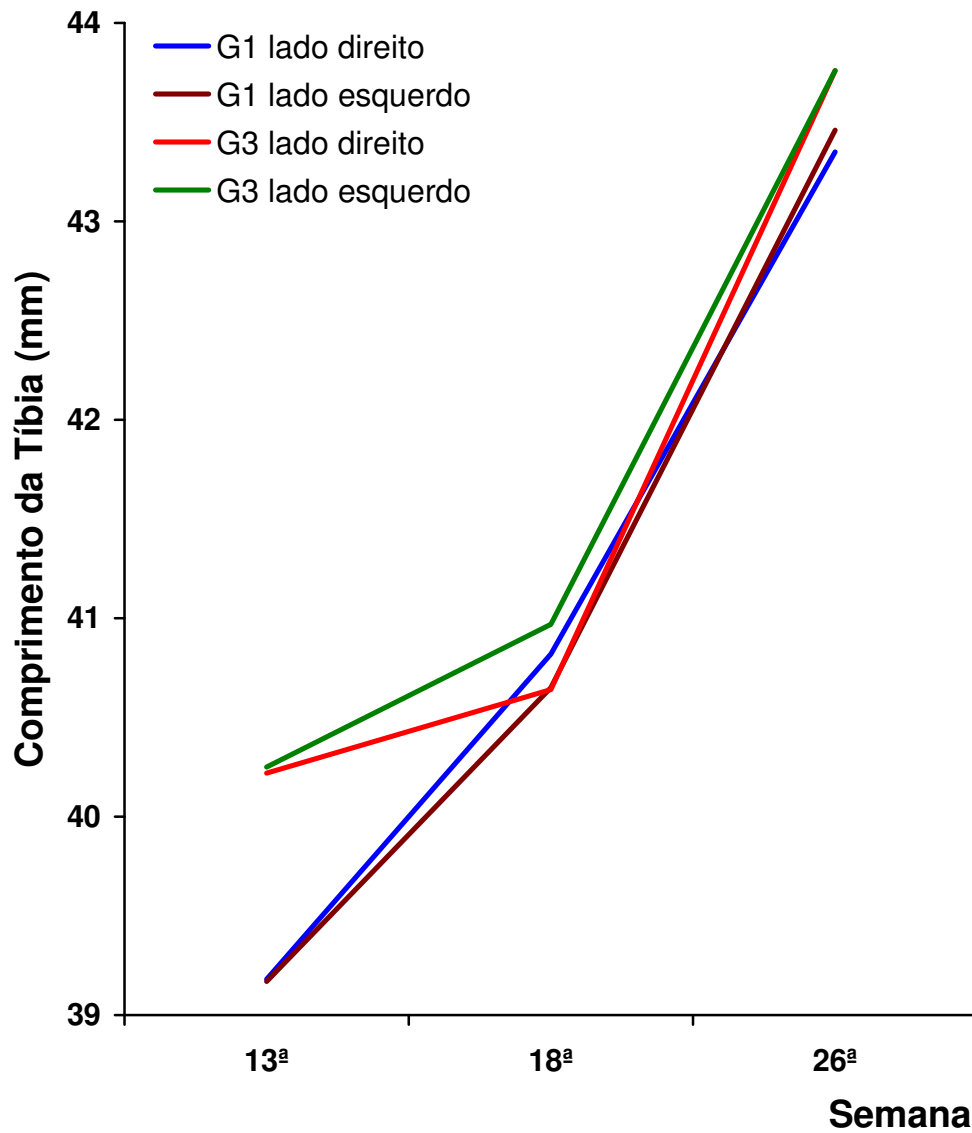


Figura 22 - Comprimento da tíbia – 30 aplicações de ultra-som. Valores médios em cada grupo e momento. G1 – Grupo tratado; G3 – Grupo controle

Tabela 9: Hipóteses testadas e comentários do comprimento da tíbia.
Grupo 30 aplicações - G1 (tratado), G3 (controle). Lados direito e esquerdo, nos momentos estudados (13^a, 18^a, 26^a semanas)

HIPÓTESES TESTADAS		COMENTÁRIOS	
Efeito do ultra-som (tratado - G1 e controle - G3), fixados momento (13 ^a , 18 ^a , 26 ^a semanas) e lado (direito e esquerdo)	13 ^a semana	direito	$G1 \cong G3$
		esquerdo	$G1 < G3$
	18 ^a semana	direito	$G1 \cong G3$
		esquerdo	$G1 \cong G3$
	26 ^a semana	direito	$G1 \cong G3$
		esquerdo	$G1 \cong G3$
Efeito de lado, fixados momento e ultra-som	13 ^a semana	G1	direito \cong esquerdo
		G3	direito \cong esquerdo
	18 ^a semana	G1	direito \cong esquerdo
		G3	direito \cong esquerdo
	26 ^a semana	G1	direito \cong esquerdo
		G3	direito \cong esquerdo
Efeito de momento, fixados ultra-som e lado	G1	direito	$13^a < 18^a < 26^a$
		esquerdo	$13^a < 18^a < 26^a$
	G3	direito	$13^a \cong 18^a < 26^a$
		esquerdo	$13^a \cong 18^a < 26^a$

4.3.2 Comprimento da tíbia - 45 aplicações de ultra-som. Grupo tratado (G2) e Grupo controle (G4). Lados direito e esquerdo

A tabela 10 apresenta:

- os valores da média e do desvio padrão do comprimento do fêmur dos animais, nos grupos G2 (tratado) e G4 (controle), nos momentos do experimento em que foram obtidas as medidas: M2 – 18^a semana de vida e M3 - 26^a semana de vida.

- o resumo do resultado da análise estatística ($p < 0,05$).

Na figura 23 estão dispostos graficamente os valores da média em cada momento em que foi obtido o parâmetro.

A tabela 11 apresenta a análise estatística com as hipóteses testadas e os comentários.

Tabela 10: Média e desvio padrão (mm) do comprimento da tíbia. Grupo 45 aplicações - G2 (tratado), G4 (controle). Lados direito e esquerdo, nos momentos estudados (18^a, 26^a semanas) e análise estatística

GRUPO	LADO	MOMENTO	
		18 ^a semana	26 ^a semana
G2	direito	40,9 ± 1,32 aAα	43,3 ± 1,09 aAβ
	esquerdo	41,0 ± 1,27 aAα	43,4 ± 1,11 aAβ
G4	direito	40,2 ± 0,86 aAα	42,5 ± 0,67 aAβ
	esquerdo	40,5 ± 1,02 aAα	42,8 ± 0,77 aAβ

Letras minúsculas: comparação do ultra-som (G2 - tratado e G4 - controle), fixados o momento (18^a e 26^a semanas) e o lado (direito e esquerdo)

Letras maiúsculas: comparação de lado, fixados o ultra-som e o momento

Letras gregas: comparação de momentos, fixados o ultra-som e o lado.

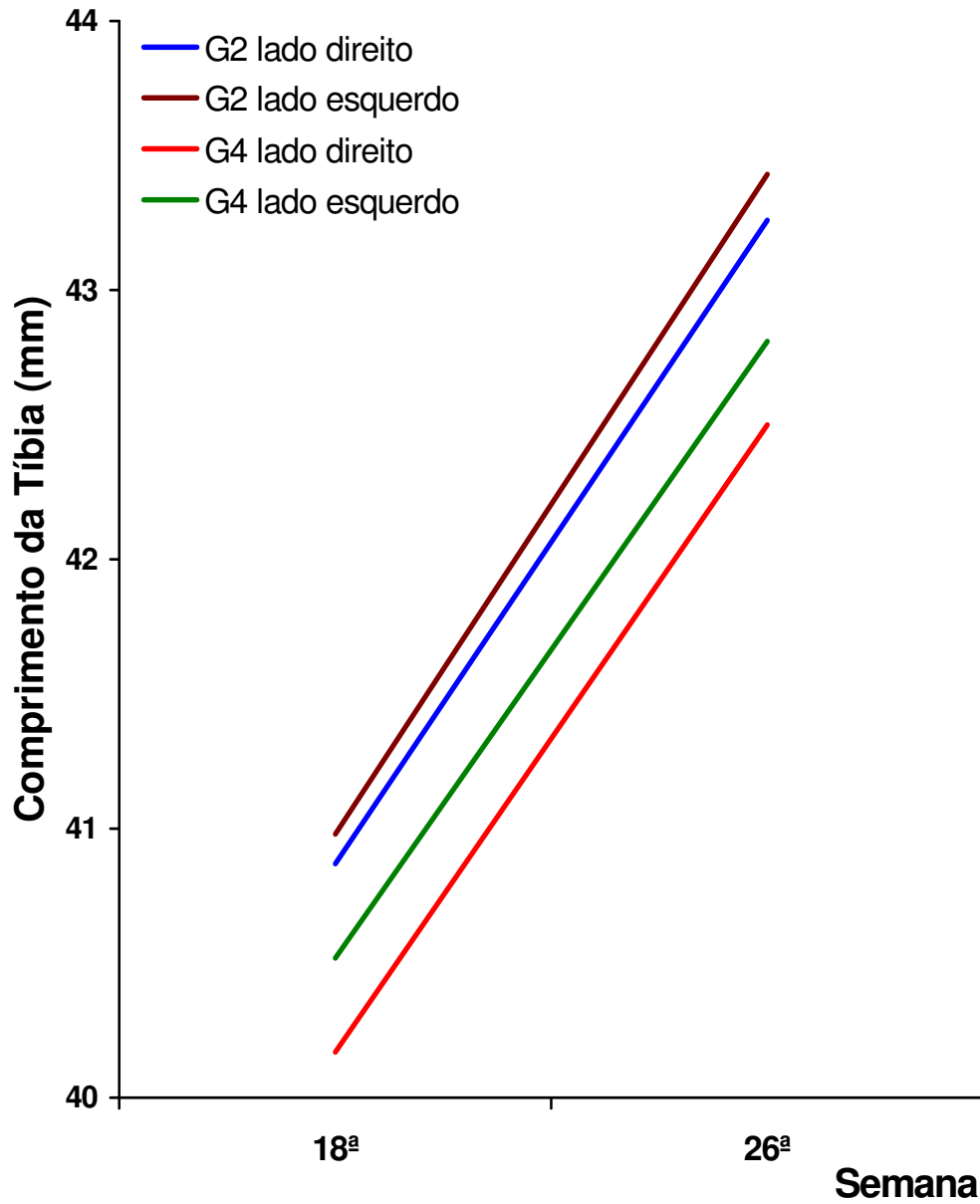


Figura 23: Comprimento da tíbia. 45 aplicações de ultra-som. Valores médios em cada grupo e momento. G2 – Grupo tratado; G4 – Grupo controle

Tabela 11: Hipóteses testadas e comentários do comprimento da tibia.
Grupo 45 aplicações - G2 (tratado), G4 (controle). Lados direito e esquerdo, nos momentos estudados (13^a, 18^a, 26^a semanas)

HIPÓTESES TESTADAS		COMENTÁRIO	
Efeito do ultra-som (tratado – G2 e controle – G4), fixados momento (18 ^a e 26 ^a semanas) e lado (direito e esquerdo).	13 ^a sem	direito	G2 \cong G4
		esquerdo	G2 \cong G4
	18 ^a sem	direito	G2 \cong G4
		esquerdo	G2 \cong G4
	26 ^a sem	direito	G2 \cong G4
		esquerdo	G2 \cong G4
Efeito de lado, fixados momento e ultra-som	13 ^a sem	G2	direito \cong esquerdo
		G4	direito \cong esquerdo
	18 ^a sem	G2	direito \cong esquerdo
		G4	direito \cong esquerdo
	26 ^a sem	G2	direito \cong esquerdo
		G4	direito \cong esquerdo
Efeito de momento, fixados ultra-som e lado.	G2	direito	18 ^a < 26 ^a
		esquerdo	18 ^a < 26 ^a
	G4	direito	18 ^a < 26 ^a
		esquerdo	18 ^a < 26 ^a

4.4 Comprimento do Membro

4.4.1 Comprimento do membro - 30 aplicações de ultra-som. Grupo tratado (G1) e Grupo controle (G3). Lados direito e esquerdo

A tabela 12 apresenta:

- Os valores da média e do desvio padrão do comprimento do fêmur dos animais, nos grupos G1 (tratado) e G3 (controle), nos momentos do experimento em que foram obtidas as medidas: M1 - 13^a semana de vida; M2 – 18^a semana de vida e M3 - 26^a semana de vida.
- O resumo do resultado da análise estatística ($p < 0,05$).

Na figura 24 estão dispostos graficamente os valores da média em cada momento em que foi obtido o parâmetro.

A tabela 13 apresenta a análise estatística com as hipóteses testadas e os comentários.

Tabela 12: Média e desvio padrão (mm) do comprimento do membro.
Grupo 30 aplicações - G1 (tratado), G3 (controle). Lados direito e esquerdo, nos momentos estudados (13^a, 18^a, 26^a semanas) e análise estatística

GRUPO	LADO	MOMENTO		
		13 ^a semana	18 ^a semana	26 ^a semana
G1	direito	73,9 ± 2,61 aAα	76,54 ± 1,71 aAβ	81,57 ± 1,82 aAλ
	esquerdo	74,3 ± 2,71 aAα	76,75 ± 1,57 aAβ	83,30 ± 1,95 aAλ
G3	direito	75,6 ± 1,28 aAα	76,59 ± 1,55 aAá	82,55 ± 3,00 aAβ
	esquerdo	76,2 ± 1,64 bAα	76,82 ± 1,35 aAá	83,15 ± 3,06 aAβ

Letras minúsculas: comparação do ultra-som (tratado - G1 e controle - G3), fixados o lado (direito e esquerdo) e o momento (13^a, 18^a e 26^a semanas)

Letras maiúsculas: comparação de lado, fixados o ultra-som e o momento

Letras gregas: comparação de momentos, fixados o ultra-som e o lado.

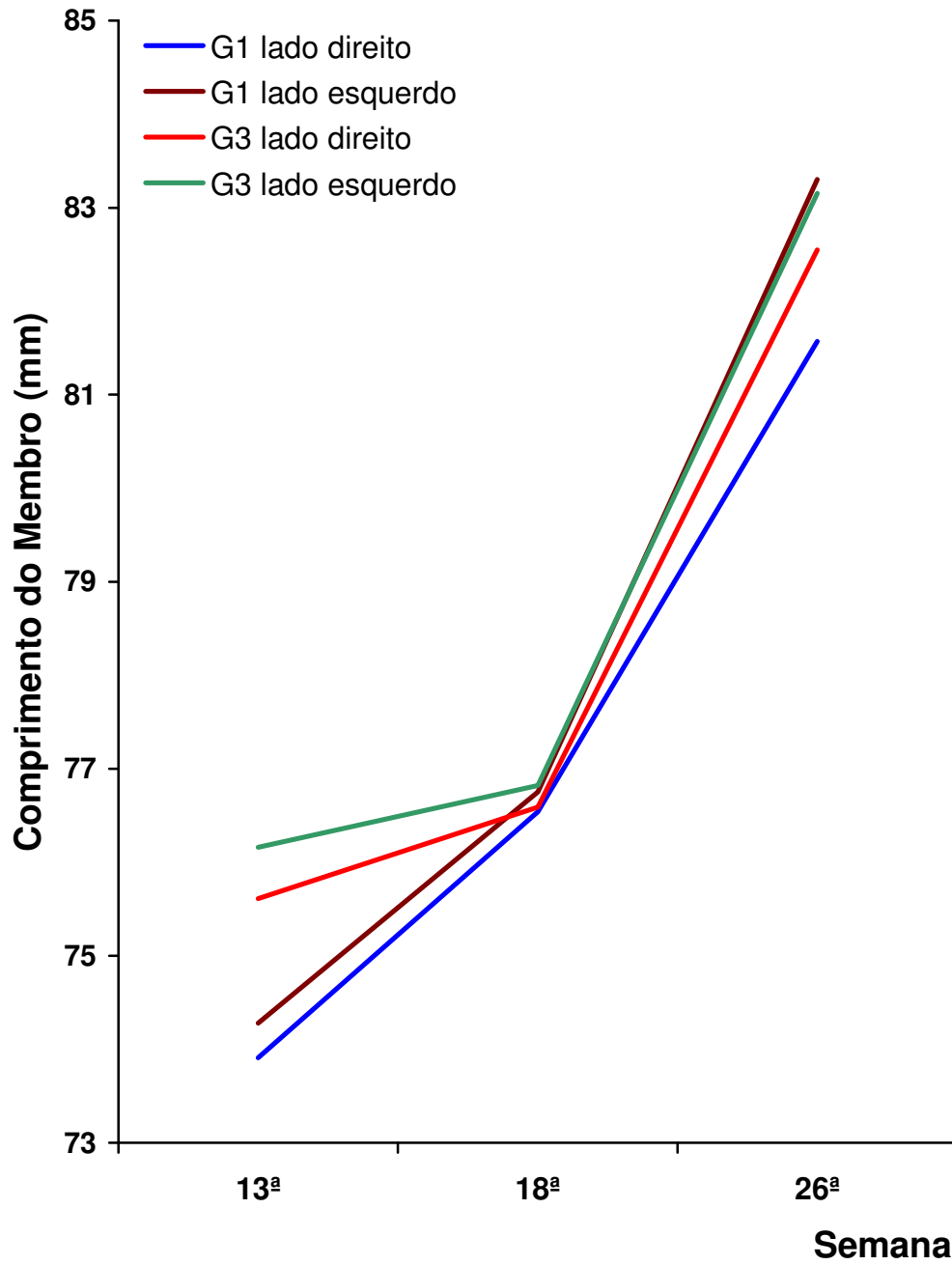


Figura 24: Comprimento do membro – 30 aplicações de ultra-som. Valores médios em cada grupo e momento. G1 – Grupo tratado, G3 – Grupo controle

Tabela 13: Hipóteses testadas e comentários do comprimento do membro. Grupo 30 aplicações - G1 (tratado), G3 (controle). Lados direito e esquerdo, nos momentos estudados (13^a, 18^a, 26^a semanas)

HIPÓTESES TESTADAS		COMENTÁRIOS	
Efeito do ultra-som (tratado – G1 e controle – G3), fixados momento (13 ^a , 18 ^a , 26 ^a semanas) e lado (direito e esquerdo).	13 ^a semana	direito	tratado \cong controle
		esquerdo	tratado < controle
	18 ^a semana	direito	tratado \cong controle
		esquerdo	tratado \cong controle
	26 ^a semana	direito	tratado \cong controle
		esquerdo	tratado \cong controle
Efeito de lado, fixados momento e ultra-som	13 ^a semana	tratado	direito \cong esquerdo
		controle	direito \cong esquerdo
	18 ^a semana	tratado	direito \cong esquerdo
		controle	direito \cong esquerdo
	26 ^a semana	tratado	direito \cong esquerdo
		controle	direito \cong esquerdo
Efeito de momento, fixados ultra-som e lado.	tratado	direito	13 ^a < 18 ^a < 26 ^a
		esquerdo	13 ^a < 18 ^a < 26 ^a
	controle	direito	13 ^a \cong 18 ^a < 26 ^a
		esquerdo	13 ^a \cong 18 ^a < 26 ^a

4.4.2 Comprimento do membro - 45 aplicações de ultra-som. Grupo tratado (G2) e Grupo controle (G4). Lados direito e esquerdo

A tabela 14 apresenta:

- os valores da média e do desvio padrão do comprimento do fêmur dos animais, nos grupos G2 (tratado) e G4 (controle), nos momentos do experimento em que foram obtidas as medidas: M2 – 18^a semana de vida e M3 - 26^a semana de vida.
- o resumo do resultado da análise estatística ($p < 0,05$).

Na figura 25 estão dispostos graficamente os valores da média nos momentos em que foi obtido o parâmetro.

A tabela 15 apresenta a análise estatística com as hipóteses testadas e os comentários.

Tabela 14: Média e desvio padrão (mm) do comprimento do membro. Grupo 45 aplicações - G2 (tratado), G4 (controle). Lados direito e esquerdo, nos momentos estudados (18^a, 26^a semanas) e análise estatística

GRUPO	LADO	MOMENTO	
		18 ^a semana	26 ^a semana
G2	direito	76,7 ± 2,41 aAα	82,0 ± 1,74 aAβ
	esquerdo	77,3 ± 2,14 aAα	82,6 ± 1,89 aAβ
G4	direito	75,5 ± 1,51 aAα	81,0 ± 2,49 aAβ
	esquerdo	76,2 ± 1,81 aAα	82,0 ± 1,43 aAβ

Letras minúsculas: comparação do ultra-som (G2 - tratado e G4 - controle), fixados o momento (18^a e 26^a semanas) e o lado (direito e esquerdo)

Letras maiúsculas: comparação de lado, fixados o ultra-som e o momento

Letras gregas: comparação de momentos, fixados o ultra-som e o lado.

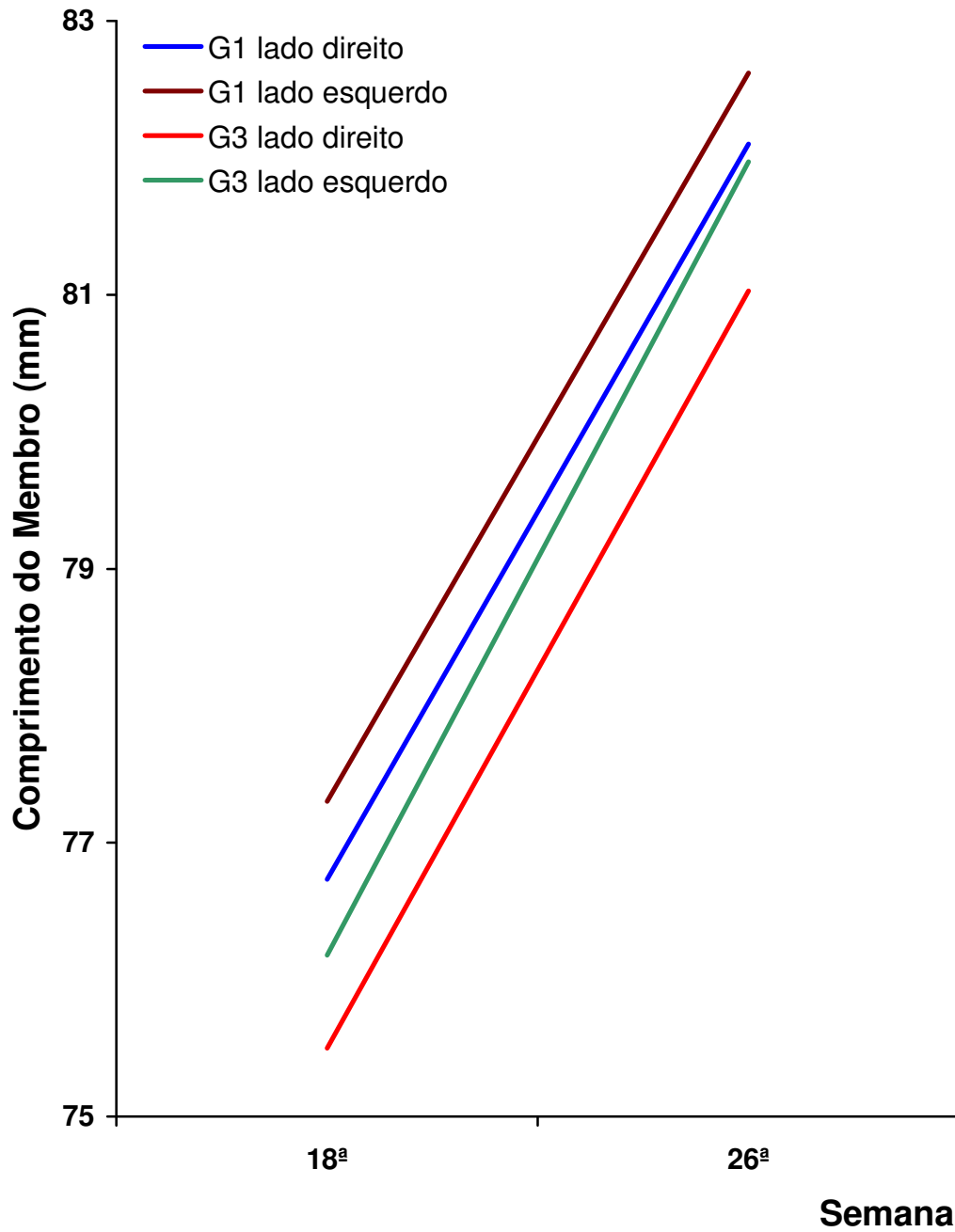


Figura 25: Comprimento do membro – 45 aplicações de ultra-som. Valores médios em cada grupo e momento. G2 – Grupo tratado; G4 – Grupo controle

Tabela 15: Hipóteses testadas e comentários do comprimento do membro. Grupo 45 aplicações - G2 (tratado), G4 (controle). Lados direito e esquerdo, nos momentos estudados (18^a, 26^a semanas)

HIPÓTESES TESTADAS		COMENTÁRIOS	
Efeito do ultra-som (tratado – G2 e controle – G4), fixados momento (18 ^a e 26 ^a semanas) e lado (direito e esquerdo).	18 ^a semana	direito	tratado \cong controle
		esquerdo	tratado \cong controle
	26 ^a semana	direito	tratado \cong controle
		esquerdo	tratado \cong controle
Efeito de lado, fixados momento e ultra-som	18 ^a semana	tratado	direito \cong esquerdo
		controle	direito \cong esquerdo
	26 ^a semana	tratado	direito \cong esquerdo
		controle	direito \cong esquerdo
Efeito de momento, fixados ultra-som e lado.	tratado	direito	18 ^a < 26 ^a
		esquerdo	18 ^a < 26 ^a
	controle	direito	18 ^a < 26 ^a
		esquerdo	18 ^a < 26 ^a

4.5 Largura do Fêmur

4.5.1 Largura do fêmur - 30 aplicações de ultra-som. Grupo tratado (G1) e Grupo controle (G3). Lados direito e esquerdo.

A tabela 16 apresenta:

- os valores da média e do desvio padrão do comprimento do fêmur dos animais, nos grupos G1 (tratado) e G3 (controle), nos momentos do experimento em que foram obtidas as medidas: M1 - 13^a semana de vida; M2 – 18^a semana de vida e M3 - 26^a semana de vida.
- o resumo do resultado da análise estatística ($p < 0,05$).

Na figura 26 estão dispostos graficamente os valores da média nos momentos em que foi obtido o parâmetro.

A tabela 17 apresenta a análise estatística com as hipóteses testadas e os comentários.

Tabela 16: Média e desvio padrão (mm) da largura do fêmur. Grupo 30 aplicações - G1 (tratado), G3 (controle). Lados direito e esquerdo, nos momentos estudados (13^a, 18^a, 26^a semanas) e análise estatística

GRUPO	LADO	MOMENTO		
		13 ^a semana	18 ^a semana	26 ^a semana
G1	direito	7,1 ± 0,29 aAα	7,5 ± 0,26 aAβ	8,0 ± 0,28 aAλ
	esquerdo	7,1 ± 0,21 aAα	7,4 ± 0,24 aAα	8,1 ± 0,32 aAβ
G3	direito	7,3 ± 0,34 aAα	7,6 ± 0,19 aAα	8,0 ± 0,42 aAβ
	esquerdo	7,3 ± 0,34 aAα	7,6 ± 0,19 aAβ	8,1 ± 0,31 aAλ

Letras minúsculas: comparação do ultra-som (tratado - G1 e controle - G3), fixados o lado (direito e esquerdo) e o momento (13^a, 18^a e 26^a semanas)

Letras maiúsculas: comparação de lado, fixados o ultra-som e o momento

Letras gregas: comparação de momentos, fixados o ultra-som e o lado.

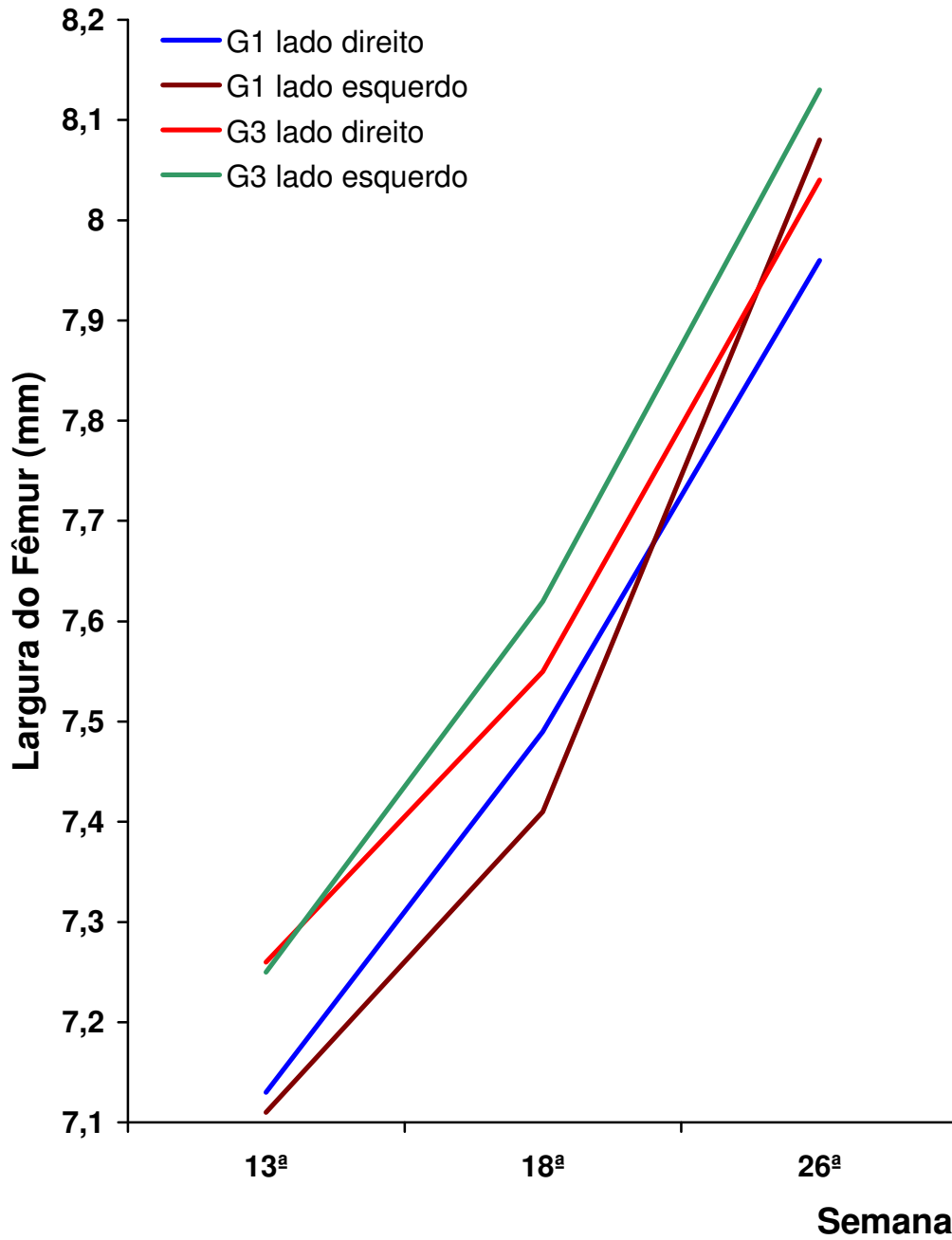


Figura 26: Largura do fêmur. 30 aplicações de ultra-som. Valor médio em cada grupo e momento (G1 – Grupo tratado; G3 – Grupo controle)

Tabela 17: Hipóteses testadas e comentários da largura do fêmur. Grupo 30 aplicações - G1 (tratado), G3 (controle). Lados direito e esquerdo, nos momentos estudados (13^a, 18^a, 26^a semanas)

HIPÓTESES TESTADAS		COMENTÁRIOS	
Efeito do ultra-som (tratado – G1 e controle – G3), fixados momento (13 ^a , 18 ^a e 26 ^a semanas) e lado (direito e esquerdo).	13 ^a semana	direito	tratado \cong controle
		esquerdo	tratado \cong controle
	18 ^a semana	direito	tratado \cong controle
		esquerdo	tratado \cong controle
	26 ^a semana	direito	tratado \cong controle
		esquerdo	tratado \cong controle
Efeito de lado, fixados momento e ultra-som	13 ^a semana	tratado	direito \cong esquerdo
		controle	direito \cong esquerdo
	18 ^a semana	tratado	direito \cong esquerdo
		controle	direito \cong esquerdo
	26 ^a semana	tratado	direito \cong esquerdo
		controle	direito \cong esquerdo
Efeito de momento, fixados ultra-som e lado.	tratado	direito	$13^a < 18^a < 26^a$
		esquerdo	$13^a = 18^a < 26^a$
	controle	direito	$13^a = 18^a < 26^a$
		esquerdo	$13^a < 18^a < 26^a$

4.5.2 Largura do fêmur - 45 aplicações de ultra-som. Grupo tratado (G2) e Grupo controle (G4). Lados direito e esquerdo.

A tabela 18 apresenta:

- Os valores da média e do desvio padrão do comprimento do fêmur dos animais, nos grupos G2 – tratado e G4 – controle, nos momentos do experimento em que foram obtidas as medidas: M2 – 18^a semana de vida e M3 - 26^a semana de vida.

- O resumo do resultado da análise estatística ($p < 0,05$).

Na figura 27 estão dispostos graficamente os valores da média nos momentos em que foi obtido o parâmetro.

A tabela 19 apresenta a análise estatística com as hipóteses testadas e os comentários.

Tabela 18: Média e desvio padrão (mm) da largura do fêmur. Grupo 45 aplicações - G2 (tratado), G4 (controle). Lados direito e esquerdo, nos momentos estudados (18^a, 26^a semanas) e análise estatística

GRUPO	LADO	MOMENTO	
		18 ^a semana	26 ^a semana
G2	direito	7,5 ± 0,18 aAα	7,9 ± 0,34 aAβ
	esquerdo	7,5 ± 0,27 aAα	8,0 ± 0,28 aAβ
G4	direito	7,4 ± 0,18 aAα	8,1 ± 0,24 aAβ
	esquerdo	7,4 ± 0,33 aAα	8,0 ± 0,26 aAβ

Letras minúsculas: comparação do ultra-som (G2 - tratado e G4 - controle), fixados o momento (18^a e 26^a semanas) e o lado (direito e esquerdo)

Letras maiúsculas: comparação de lado, fixados o ultra-som e o momento

Letras gregas: comparação de momentos, fixados o ultra-som e o lado.

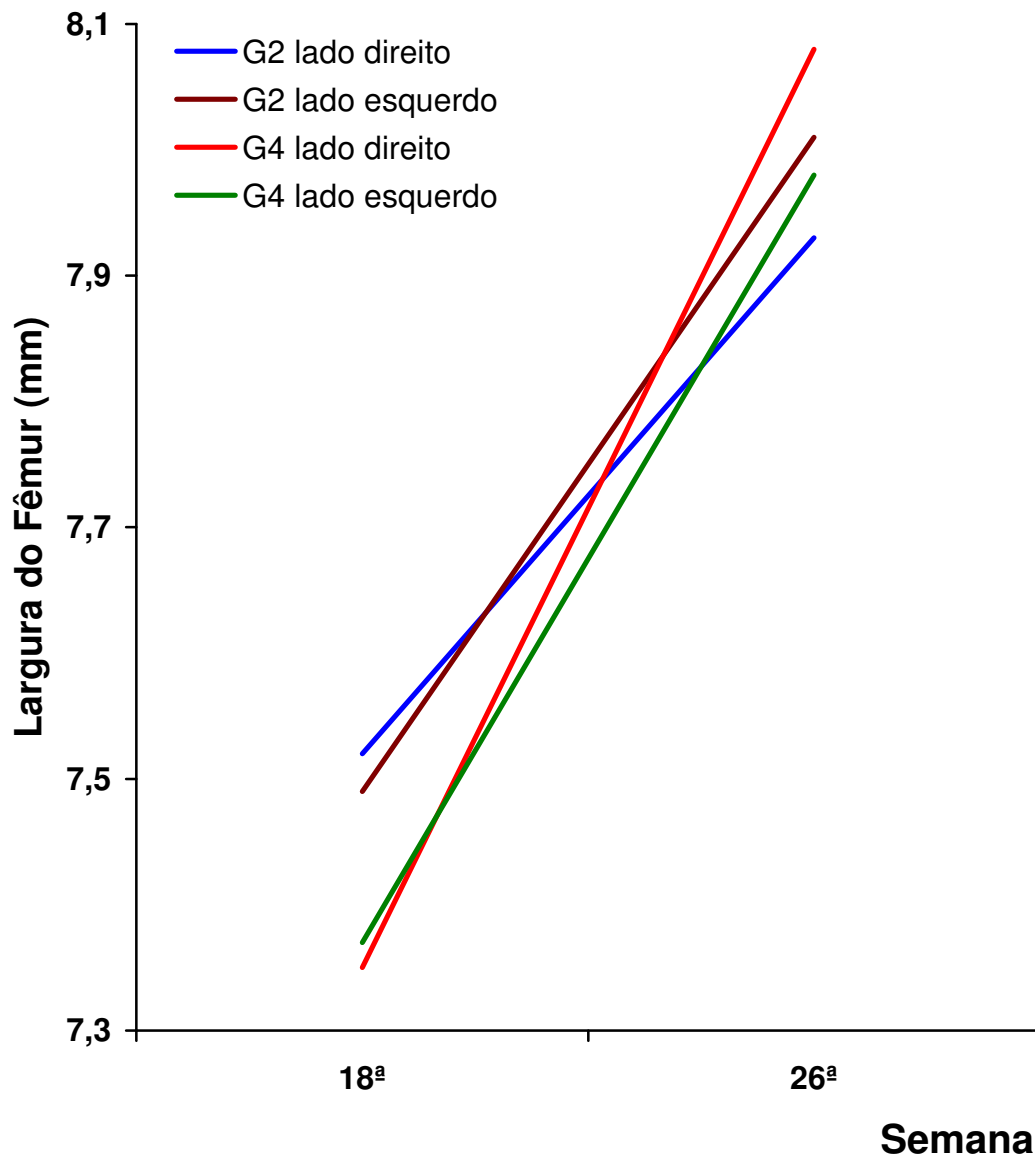


Figura 27: Largura do fêmur. 45 aplicações de ultra-som. Valor médio em cada grupo e momento (G2 – Grupo tratado; G4 – Grupo controle)

Tabela 19: Hipóteses testadas e comentários da largura do fêmur. Grupo 45 aplicações - G2 (tratado), G4 (controle). Lados direito e esquerdo, nos momentos estudados (18^a, 26^a semanas)

HIPÓTESES TESTADAS		COMENTÁRIOS	
Efeito do ultra-som (tratado – G2 e controle – G4), fixados momento (18 ^a e 26 ^a semanas) e lado (direito e esquerdo).	18 ^a semana	direito	tratado \cong controle
		esquerdo	tratado \cong controle
	26 ^a semana	direito	tratado \cong controle
		esquerdo	tratado \cong controle
Efeito de lado, fixados momento e ultra-som.	18 ^a semana	tratado	direito \cong esquerdo
		controle	direito \cong esquerdo
	26 ^a semana	tratado	direito \cong esquerdo
		controle	direito \cong esquerdo
Efeito de momento, fixados ultra-som e lado.	tratado	direito	18 ^a < 26 ^a
		esquerdo	18 ^a < 26 ^a
	controle	direito	18 ^a < 26 ^a
		esquerdo	18 ^a < 26 ^a

4.5.3 Largura da tíbia - 30 aplicações de ultra-som. Grupo tratado (G1) e Grupo controle (G3). Lados direito e esquerdo.

A tabela 20 apresenta:

- os valores da média e do desvio padrão do comprimento do fêmur dos animais, nos grupos G1 – tratado e G3 – controle, nos momentos do experimento em que foram obtidas as medidas: M1 - 13^a semana de vida; M2 – 18^a semana de vida e M3 - 26^a semana de vida.

- o resumo do resultado da análise estatística ($p < 0,05$).

Na figura 28 estão dispostos graficamente os valores da média nos momentos em que foi obtido o parâmetro.

A tabela 21 apresenta a análise estatística com as hipóteses testadas e os comentários.

Tabela 20: Média e desvio padrão (mm) da largura da tíbia. Grupo 30 aplicações - G1 (tratado), G3 (controle). Lados direito e esquerdo, nos momentos estudados (13^a, 18^a, 26^a semanas) e análise estatística

GRUPO	LADO	MOMENTO		
		13 ^a semana	18 ^a semana	26 ^a semana
G1	direito	7,5± 0,20 aAα	7,8 ± 0,31 aAα	8,1 ± 0,39 aAα
	esquerdo	7,5 ± 0,20 aAα	7,9 ± 0,43 aAα	8,3 ± 0,45 aAα
G3	direito	7,6 ± 0,29 aAα	7,8 ± 0,38 aAα	8,1 ± 0,49 aAα
	esquerdo	7,5 ± 0,29 aAα	7,7 ± 0,37 aAα	8,1 ± 0,34 aAβ

Letras minúsculas: comparação do ultra-som (tratado - G1 e controle - G3), fixados o lado (direito e esquerdo) e o momento (13^a, 18^a e 26^a semanas)

Letras maiúsculas: comparação de lado, fixados o ultra-som e o momento

Letras gregas: comparação de momentos, fixados o ultra-som e o lado.

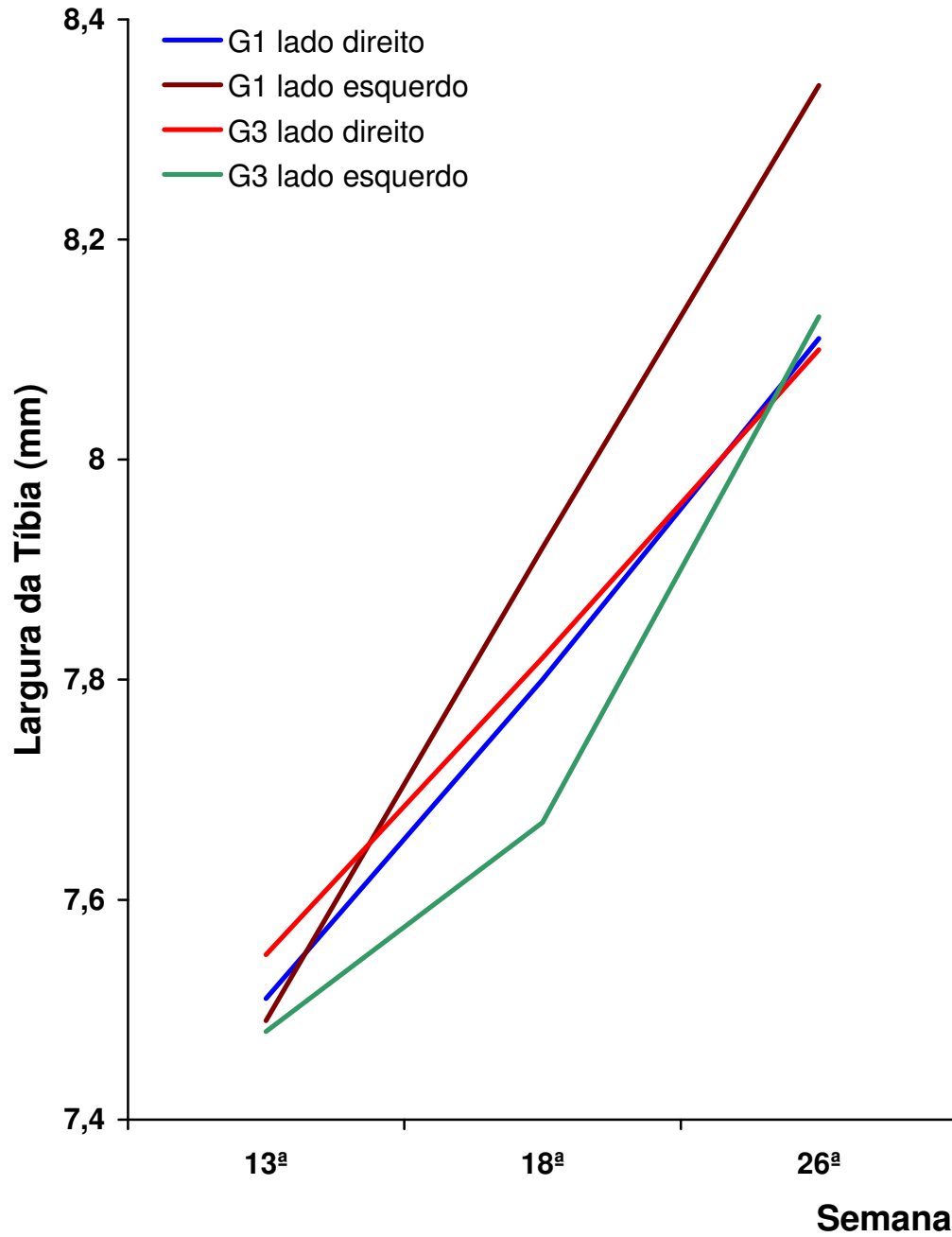


Figura 28: Largura da tíbia - 30 aplicações de ultra-som. Valor médio em cada grupo e momento (G1 – Grupo tratado; G3 – Grupo controle).

Tabela 21: Hipóteses testadas e comentários da largura da tibia. Grupo 30 aplicações - G1 (tratado), G3 (controle). Lados direito e esquerdo, nos momentos estudados (13^a, 18^a, 26^a semanas)

HIPÓTESES TESTADAS		COMENTÁRIOS	
Efeito do ultra-som (tratado – G1 e controle – G3), fixados momento (13 ^a , 18 ^a e 26 ^a semanas) e lado (direito e esquerdo).	13 ^a semana	direito	tratado \cong controle
		esquerdo	tratado \cong controle
	18 ^a semana	direito	tratado \cong controle
		esquerdo	tratado \cong controle
	26 ^a semana	direito	tratado \cong controle
		esquerdo	tratado \cong controle
Efeito de lado, fixados, momento e ultra-som.	13 ^a semana	tratado	direito \cong esquerdo
		controle	direito \cong esquerdo
	18 ^a semana	tratado	direito \cong esquerdo
		controle	direito \cong esquerdo
	26 ^a semana	tratado	direito \cong esquerdo
		controle	direito \cong esquerdo
Efeito de momento, fixados ultra-som e lado.	tratado	direito	13 ^a \cong 18 ^a \cong 26 ^a
		esquerdo	13 ^a \cong 18 ^a \cong 26 ^a
	controle	direito	13 ^a \cong 18 ^a < 26 ^a
		esquerdo	13 ^a < 18 ^a < 26 ^a

4.5.4 Largura da tibia – 45 aplicações de ultra-som. Grupo tratado (G2) e Grupo controle (G4). Lados direito e esquerdo.

A tabela 22 apresenta:

- os valores da média e do desvio padrão do comprimento do fêmur, nos grupos G2 – tratado e G4 – controle, nos momentos do experimento em que foram obtidas as medidas: M2 – 18^a semana de vida e M3 - 26^a semana de vida.

- o resumo do resultado da análise estatística ($p < 0,05$).

Na figura 29 estão dispostos graficamente os valores da média nos momentos em que foi obtido o parâmetro.

A tabela 23 apresenta a análise estatística com as hipóteses testadas e os comentários.

Tabela 22: Média e desvio padrão (mm) da largura da tíbia. Grupo 45 aplicações, G2 (tratado) e G4 (controle), Lados direito e esquerdo, nos momentos estudados (18^a, 26^a semanas) e análise estatística

GRUPO	LADO	MOMENTO	
		18 ^a semana	26 ^a semana
G2	direito	7,6 ± 0,39 aAα	8,2 ± 0,44 aAβ
	esquerdo	7,8 ± 0,23 aAα	8,1 ± 0,43 aAα
G4	direito	7,8 ± 0,34 aAα	8,5 ± 0,62 aAβ
	esquerdo	7,7 ± 0,24 aAα	8,3 ± 0,35 aAβ

Letras minúsculas: comparação do ultra-som (G2 - tratado e G4 - controle), fixados o momento (18^a e 26^a semanas) e o lado (direito e esquerdo)

Letras maiúsculas: comparação de lado, fixados o ultra-som e o momento

Letras gregas: comparação de momentos, fixados o ultra-som e o lado.

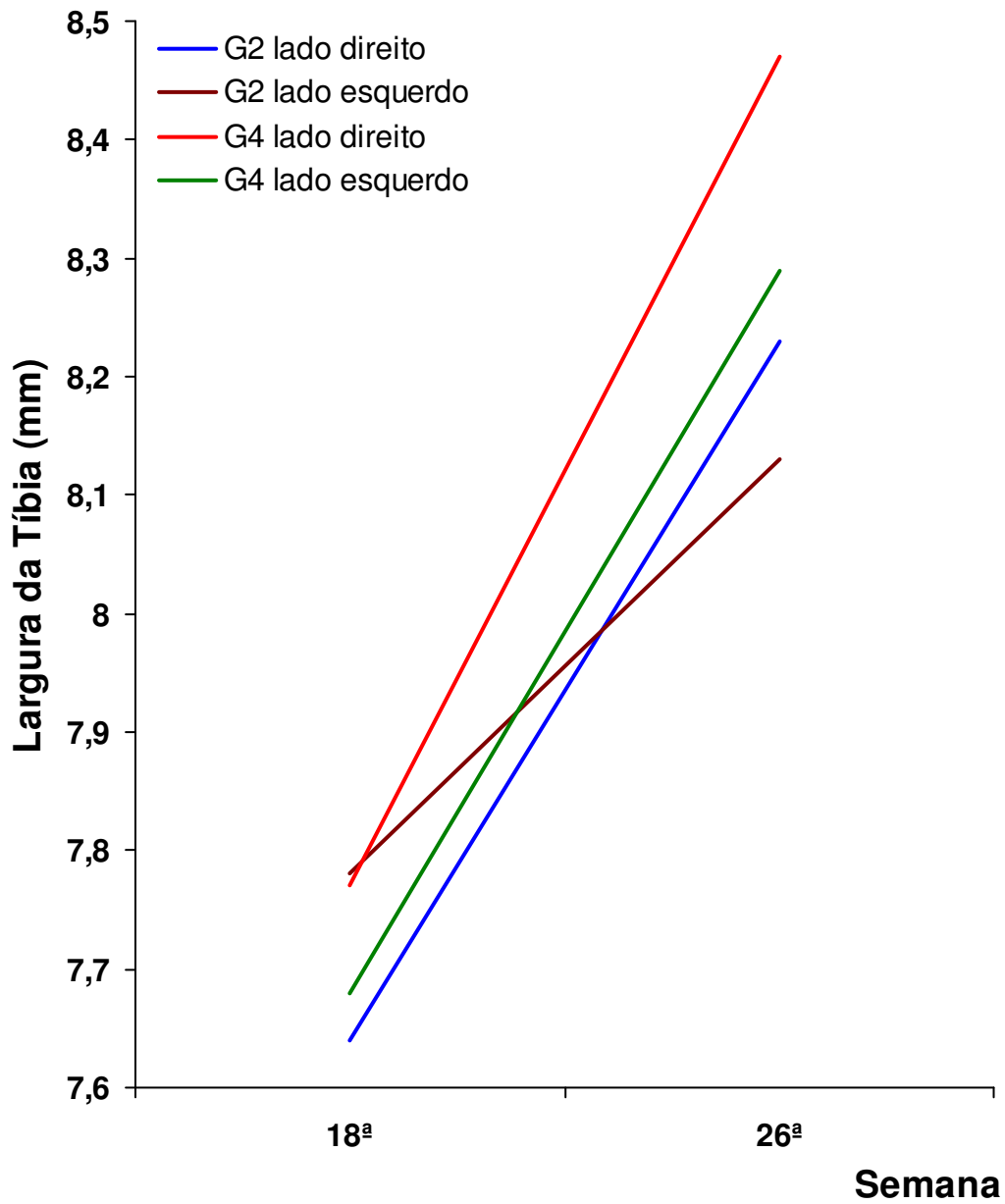


Figura 29: Largura da tíbia - 45 aplicações de ultra-som. Valor médio em cada grupo e momento (G2 – Grupo tratado; G4 – Grupo controle)

Tabela 23: Hipóteses testadas e comentários da largura da tibia. Grupo 45 aplicações - G2 (tratado), G4 (controle). Lados direito e esquerdo, nos momentos estudados (18^a, 26^a semanas)

HIPÓTESES TESTADAS		COMENTÁRIOS	
Efeito do ultra-som (tratado – G2 e controle – G4), fixados, momento (18 ^a e 26 ^a semanas) e lado (direito e esquerdo).	18 ^a semana	direito	tratado \cong controle
		esquerdo	tratado \cong controle
	26 ^a semana	direito	tratado \cong controle
		esquerdo	tratado \cong controle
Efeito de lado, fixados momento e ultra-som.	18 ^a semana	tratado	direito \cong esquerdo
		controle	direito \cong esquerdo
	26 ^a semana	tratado	direito \cong esquerdo
		controle	direito \cong esquerdo
Efeito de momento, fixados ultra-som e lado.	tratado	direito	18 ^a < 26 ^a
		esquerdo	18 ^a \cong 26 ^a
	controle	direito	18 ^a < 26 ^a
		esquerdo	18 ^a < 26 ^a

4.6 Comprimento do Membro, Comprimento do Fêmur, Comprimento da Tíbia; Largura do Fêmur e Largura da Tíbia. Grupos tratados – 30 (G1) e 45 (G2) aplicações de ultra-som e Grupos controle 30 (G3) e 45 (G4). Lados direito e esquerdo

A tabela 24 apresenta as hipóteses testadas e os comentários válidos para todas as medidas acima citadas.

A figura trinta ilustra os resultados obtidos comparando o comprimento do fêmur nos momentos M2 (18^a semana de vida) e M3 (26^a semana de vida) tanto para 30 quanto para 45 aplicações de ultra-som.

A figura 31 ilustra os resultados obtidos comparando o comprimento da tíbia nos momentos M2 e M3 tanto para 30 quanto para 45 aplicações de ultra-som.

A figura 32 ilustra os resultados obtidos comparando o comprimento do membro nos momentos M2 e M3 tanto para 30 quanto para 45 aplicações de ultra-som.

A figura 33 ilustra os resultados obtidos comparando a largura do fêmur nos momentos M2 e M3 tanto para 30 quanto para 45 aplicações de ultra-som.

A figura 34 ilustra os resultados obtidos comparando a largura da tíbia nos momentos M2 e M3 tanto para 30 quanto para 45 aplicações de ultra-som.

Tabela 24: Hipóteses testadas e comentários do comprimento do membro, comprimento do fêmur, comprimento da tíbia; largura do fêmur e largura da tíbia. Grupo 30 aplicações, G1 (tratado), G3 (controle). Grupo 45 aplicações - G2 (tratado), G4 (controle). Lados direito e esquerdo, nos momentos estudados (18^a, 26^a semanas)

HIPÓTESES TESTADAS	COMENTÁRIOS		
Efeito do número de aplicações (30 e 45), fixados o momento (18 ^a e 26 ^a semanas), o lado (direito e esquerdo) e o ultra-som (tratado e controle).	18 ^a semana	direito	G1 e G2 30≅45
			G3 e G4 30≅45
		esquerdo	G1 e G2 30≅45
			G3 e G4 30≅45
	26 ^a semana	direito	G1 e G2 30≅45
			G3 e G4 30≅45
		esquerdo	G1 e G2 30≅45
			G3 e G4 30≅45

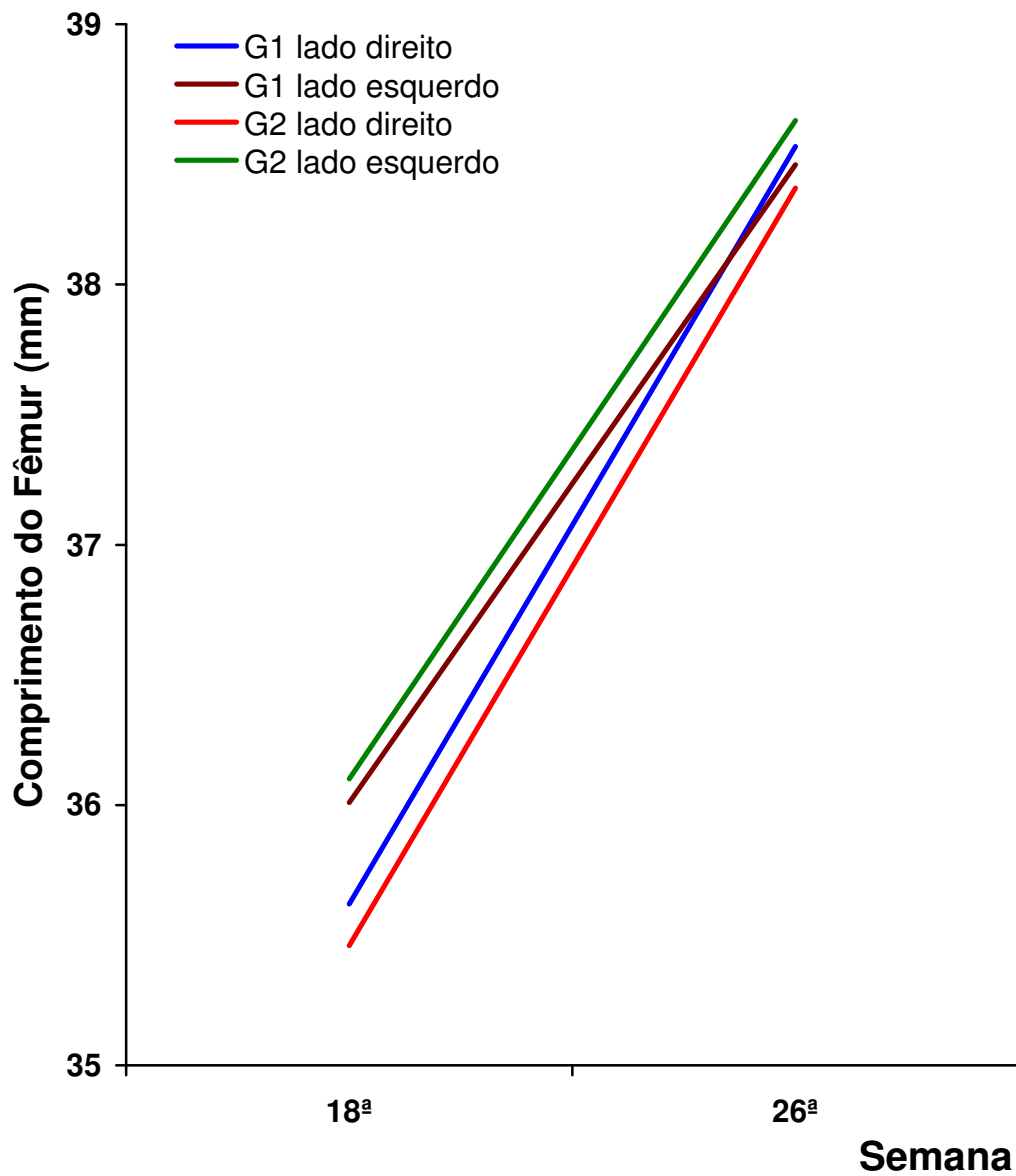


Figura 30: Comprimento do fêmur. Valor médio em cada grupo e momento. Lados direito e esquerdo. G1 (Grupo tratado 30 aplicações) - G2 (Grupo tratado 45 aplicações)

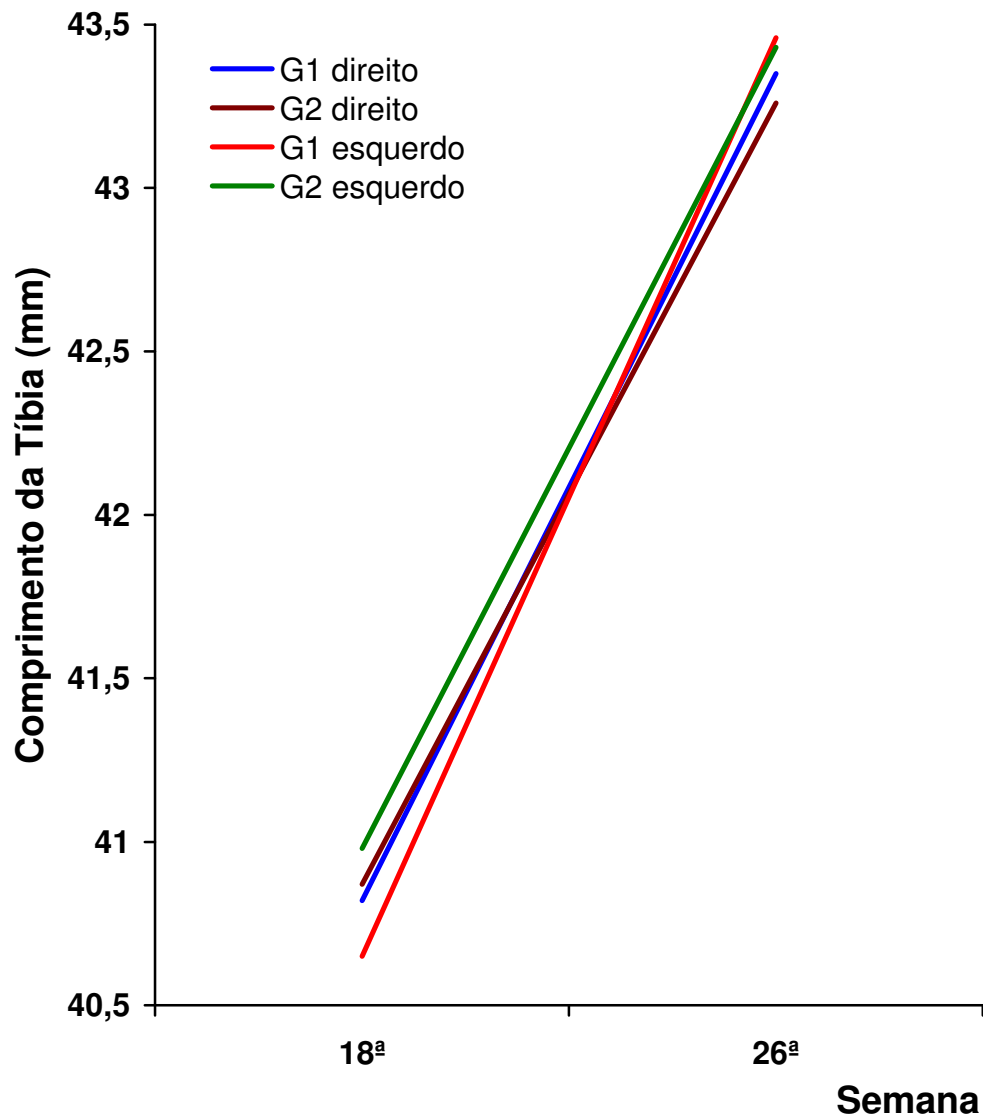


Figura 31: Comprimento da tíbia. Valor médio em cada grupo e momento. Lados direito e esquerdo. G1 (Grupo tratado 30 aplicações) - G2 (Grupo tratado 45 aplicações)

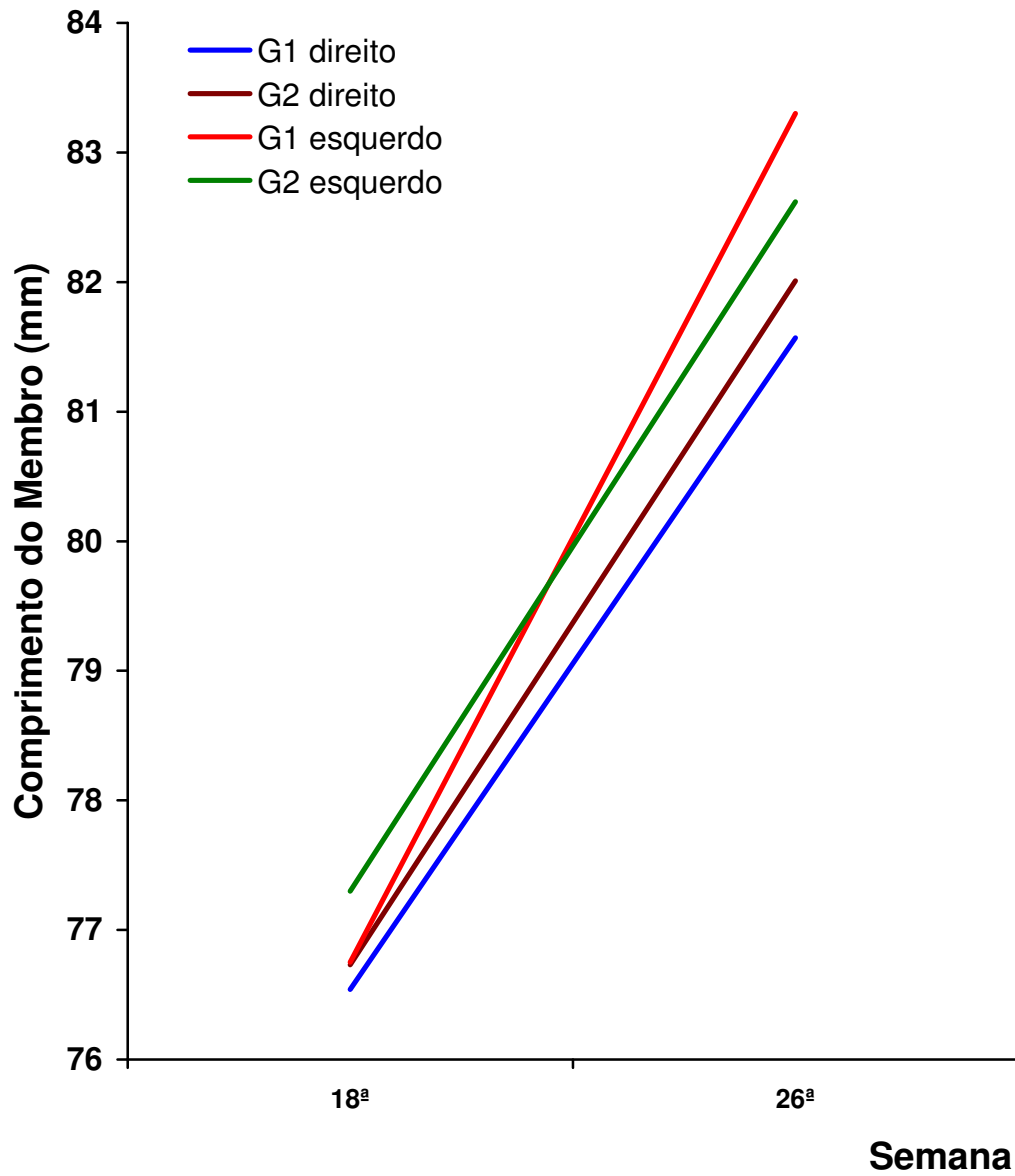


Figura 32: Comprimento do membro. Valor médio para cada grupo e momento. Lados direito e esquerdo. G1 (Grupo tratado 30 aplicações) - G2 (Grupo tratado 45 aplicações)

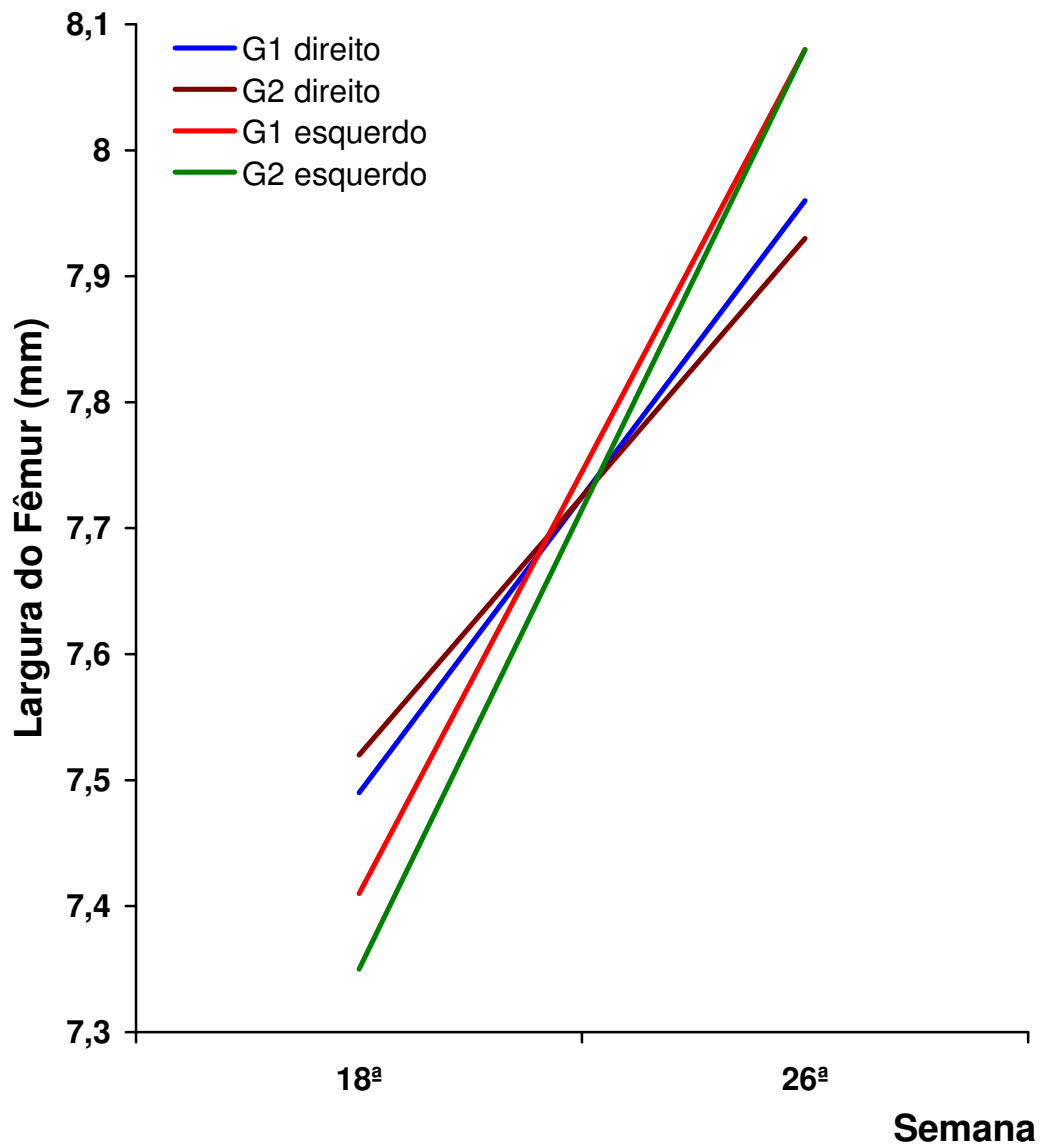


Figura 33: Largura do fêmur. Valor médio em cada grupo e momento. Lados direito e esquerdo. G1 (Grupo tratado 30 aplicações) - G2 (Grupo tratado 45 aplicações)

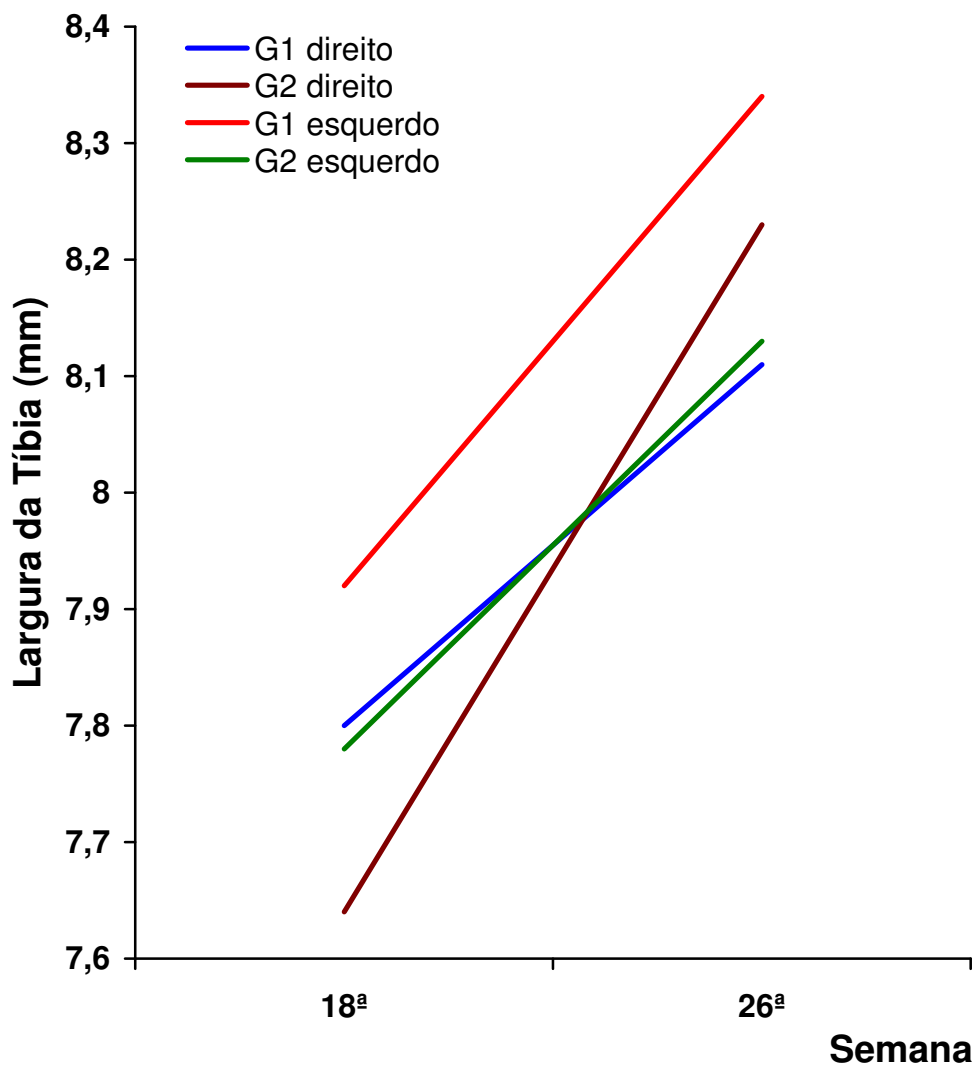


Figura 34: Largura da tíbia. Valor médio em cada grupo e momento. Lados direito e esquerdo. G1 (Grupo tratado 30 aplicações) - G2 (Grupo tratado 45 aplicações)

4.7 Morfometria

4.7.1 Morfometria da epífise distal do fêmur direito

4.7.1.1 Morfometria das zonas de repouso, proliferação e maturação (ZONA DE PROLIFERAÇÃO) da epífise distal do fêmur direito

A tabela 25 apresenta:

- Os valores da média e do desvio padrão da medida da soma das zonas de repouso, proliferação e maturação (ZONA DE PROLIFERAÇÃO) da epífise distal do fêmur direito, nos quatro grupos estudados: 30 aplicações de ultra-som - G1 (tratado) e G3 (controle) e 45 aplicações de ultra-som - G2 (tratado) e G4 (controle); nos momentos do experimento: M1 - 13^a semana de vida, M2 – 18^a semana de vida e M3 - 26^a semana de vida.

- O resumo do resultado da análise estatística ($p < 0,05$).

Na figura 35 estão dispostos graficamente os valores da média nos momentos em que foi obtida a medida.

A tabela 26 apresenta a análise estatística com as hipóteses testadas e os comentários.

Tabela 25: Média e desvio padrão (μm) da morfometria das zonas de repouso, proliferação e maturação (ZONA DE PROLIFERAÇÃO) da epífise distal do fêmur direito. Grupo 30 aplicações - G1 (tratado), G3 (controle) e Grupo 45 aplicações - G2 (tratado), G4 (controle), nos momentos estudados (13^a, 18^a, 26^a semanas) e, análise estatística

GRUPO	MOMENTO		
	13 ^a semana	18 ^a semana	26 ^a semana
G1	140,8±22,24 aα	129,4±20,72 aAα	108,9±10,94 aAα
G3	132,0±14,33 aα	140,8±19,38 aAα	111,5±20,15 aAα
G2		133,4±11,04 aAα	115,0±24,94 aAα
G4		104,3±19,57 aAα	94,6±12,72 aAα

Letras minúsculas: comparação do ultra-som (tratado e controle), fixados o número de aplicações (30 e 45) e o momento (13^a, 18^a e 26^a semanas de vida)

Letras maiúsculas: comparação de número aplicações, fixados o ultra-som e o momento

Letras gregas: comparação de momentos, fixados, o ultra-som e o número de aplicações.

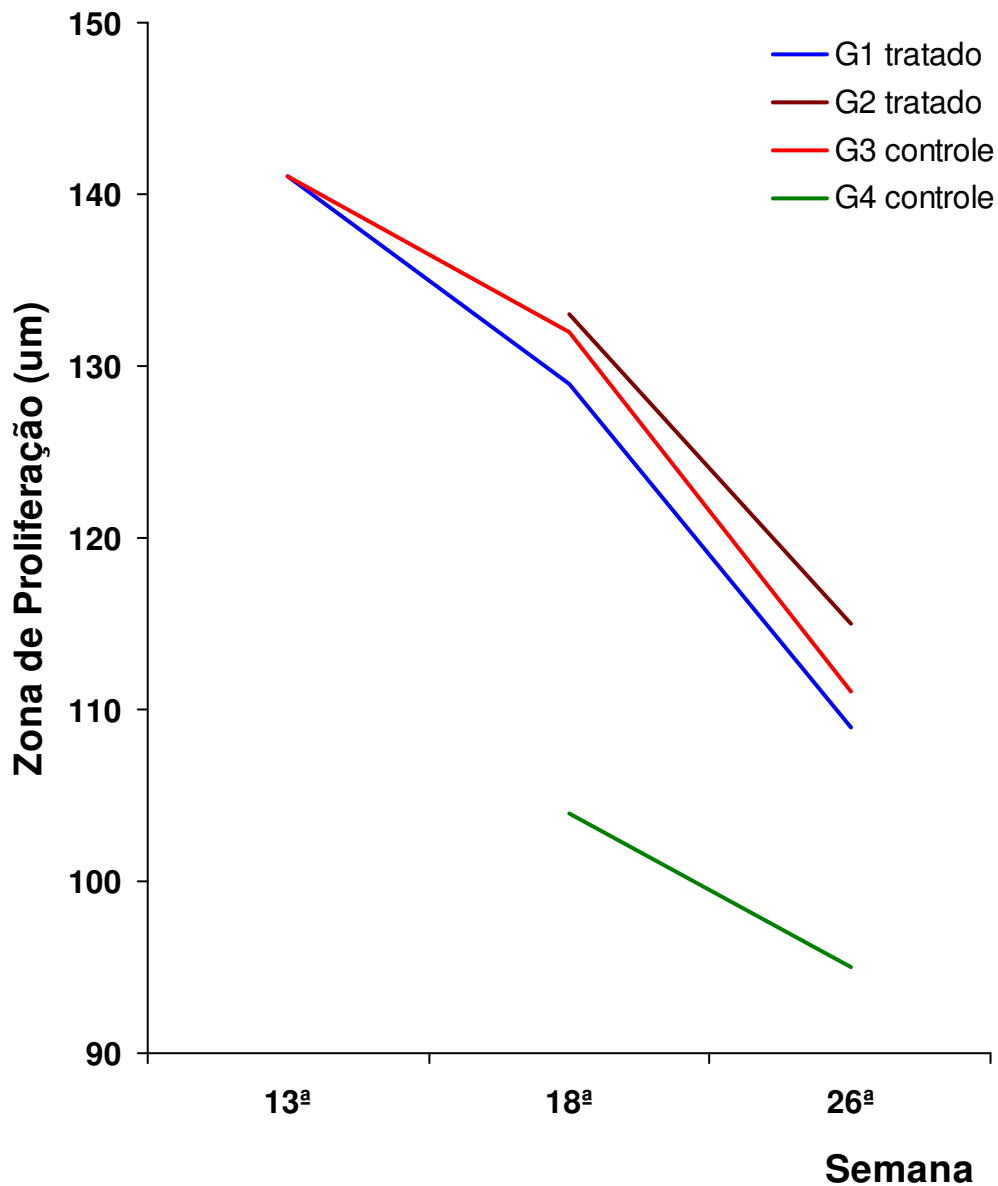


Figura 35: Morfometria das zonas de repouso, proliferação e maturação (ZONA DE PROLIFERAÇÃO) da epífise distal do fêmur direito. Grupos 30 aplicações de ultra-som - G1 (tratado) e G3 (controle) e grupos 45 aplicações de ultra-som - G2 (tratado) e G4 (controle)

Tabela 26: Hipóteses testadas e comentários da morfometria das zonas de repouso, proliferação e maturação (ZONA DE PROLIFERAÇÃO) da epífise distal do fêmur direito. Grupo 30 aplicações - G1 (tratado), G3 (controle) e Grupo 45 aplicações - G2 (tratado), G4 (controle), nos momentos estudados (13^a, 18^a, 26^a semanas)

HIPÓTESES TESTADAS	COMENTÁRIOS		
Efeito do ultra-som (tratados - G1 e G2 e controles - G3 e G4), fixados momento (13 ^a , 18 ^a e 26 ^a) e número de aplicações (30 e 45).	13 ^a semana	30 aplicações	G1 \cong G3
	18 ^a semana	30 aplicações	G1 \cong G3
		45 aplicações	G2 \cong G4
	26 ^a semana	30 aplicações	G1 \cong G3
		45 aplicações	G2 \cong G4
	Efeito do número de aplicações, fixados momento e ultra-som	18 ^a semana	G1 e G2
G3 e G4			30 \cong 45 aplicações
26 ^a semana		G1 e G2	30 \cong 45 aplicações
		G3 e G4	30 \cong 45 aplicações
Efeito de momento, fixados número de aplicações e ultra-som.	30 aplicações	G1	13 ^a \cong 18 ^a \cong 26 ^a
		G3	13 ^a \cong 18 ^a \cong 26 ^a
	45 aplicações	G2	18 ^a \cong 26 ^a
		G4	18 ^a \cong 26 ^a

4.7.1.2 Morfometria das zonas hipertrófica, e hipertrófica calcificada (ZONA HIPERTRÓFICA) da epífise distal do fêmur direito

A tabela 27 apresenta:

- os valores da média e do desvio padrão da medida das zonas hipertrófica e hipertrófica calcificada (ZONA HIPERTRÓFICA) da epífise distal do fêmur direito, nos quatro grupos estudados: 30 aplicações de ultra-som - G1 (tratado) e G3 (controle) e 45 aplicações de ultra-som - G2 (tratado) e G4 (controle); nos momentos do experimento: M1 - 13^a semana de vida; M2 - 18^a semana de vida e M3 - 26^a semana de vida.

- o resumo do resultado da análise estatística ($p < 0,05$).

Na figura 36 estão dispostos graficamente os valores da média em cada um dos momentos em que foi obtida a medida.

A tabela 28 apresenta a análise estatística com as hipóteses testadas e os comentários.

Tabela 27: Média e desvio padrão (μm) da morfometria das zonas hipertrófica e hipertrófica calcificada (ZONA HIPERTRÓFICA) da epífise distal do fêmur direito. Grupo 30 aplicações - G1 (tratado), G3 (controle), Grupo 45 aplicações - G2 (tratado), G4 (controle), nos momentos estudados (13^a, 18^a, 26^a semanas) e análise estatística

GRUPO	MOMENTO		
	13 ^a semana	18 ^a semana	26 ^a semana
G1	81,2±9,44 aα	73,1±16,64 aAα	66,3± 9,77 aAα
G3	76,2±6,48 aα	76,9±7,170 aAα	59,9±11,75 aAα
G2		72,4±10,68 aAα	65,3± 9,78 aAα
G4		52,4± 5,90 aBα	51,4± 7,47 aAα

Letras minúsculas: comparação do ultra-som (tratado e controle), fixados o (30 e 45) e o momento (13^a, 18^a e 26^a semanas de vida)

Letras maiúsculas: comparação de número aplicações, fixados o ultra-som e o momento

Letras gregas: comparação de momentos, fixados, o ultra-som e o número de aplicações.

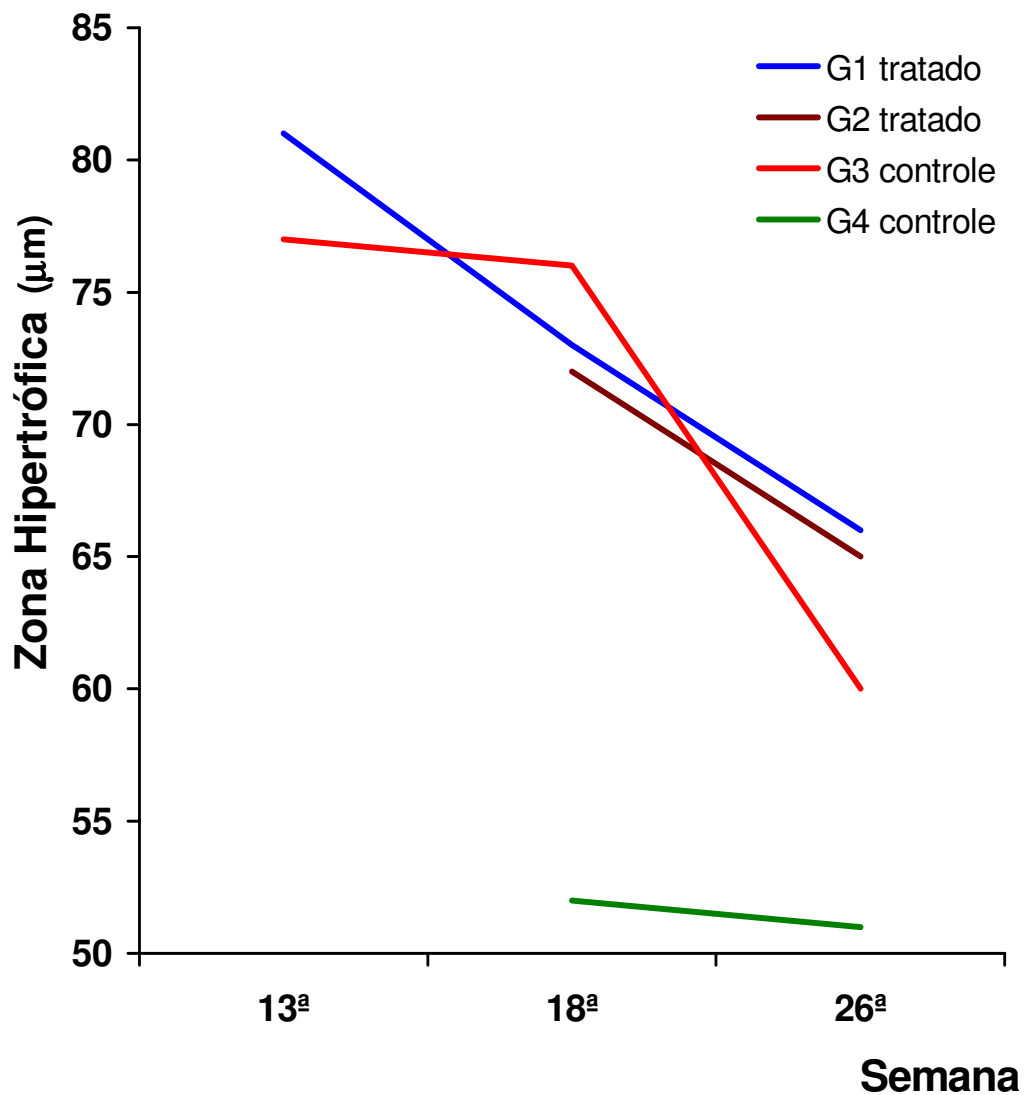


Figura 36: Morfometria das zonas hipertrófica e hipertrófica calcificada (ZONA HIPERTRÓFICA) da epífise distal do fêmur direito. Grupos 30 aplicações de ultra-som - G1 (tratado) e G3 (controle) e grupos 45 aplicações de ultra-som - G2 (tratado) e G4 (controle)

Tabela 28: Hipóteses testadas e comentários da morfometria das zonas hipertrófica e hipertrófica calcificada (ZONA HIPERTRÓFICA) da epífise distal do fêmur direito. Grupo 30 aplicações - G1 (tratado), G3 (controle), Grupo 45 aplicações - G2 (tratado), G4 (controle), nos momentos estudados (13^a, 18^a, 26^a semanas)

HIPÓTESES TESTADAS		COMENTÁRIOS	
Efeito do ultra-som (tratados - G1 e G2 e controles - G3 e G4), fixados momento (13 ^a , 18 ^a e 26 ^a semanas) e número de aplicações (30 e 45).	13 ^a semana	30 aplicações	G1 ≅ G3
	18 ^a semana	30 aplicações	G1 ≅ G3
		45 aplicações	G2 ≅ G4
	26 ^a semana	30 aplicações	G1 ≅ G3
		45 aplicações	G2 ≅ G4
	Efeito do número de aplicações, fixados, momento e ultra-som	18 ^a semana	G1 e G2
26 ^a semana		G3 e G4	30 > 45 aplicações
		G1 e G2	30 ≅ 45 aplicações
		G3 e G4	30 ≅ 45 aplicações
Efeito de momento, fixados número de aplicações e ultra-som.	30 aplicações	G1	13 ^a ≅ 18 ^a ≅ 26 ^a
		G3	13 ^a ≅ 18 ^a ≅ 26 ^a
	45 aplicações	G2	18 ^a ≅ 26 ^a
		G4	18 ^a ≅ 26 ^a

4.7.1.3 Morfometria da epífise distal do fêmur direito

A tabela 29 apresenta:

- os valores da média e do desvio padrão da medida da epífise distal do fêmur direito, nos quatro grupos estudados: 30 aplicações de ultra-som - G1 (tratado) e G3 (controle) e 45 aplicações de ultra-som - G2 (tratado) e G4 (controle); nos momentos do experimento: M1 - 13^a semana de vida; M2 - 18^a semana de vida e M3 - 26^a semana de vida.

- o resumo do resultado da análise estatística ($p < 0,05$).

Na figura 37 estão dispostos graficamente os valores da média em cada um dos momentos em que foi obtida a medida.

A tabela 30 apresenta a análise estatística com as hipóteses testadas e os comentários.

Tabela 29: Média e desvio padrão (μm) da morfometria da epífise distal do fêmur direito. Grupos 30 aplicações - G1 (tratado), G3 (controle), Grupo 45 aplicações - G2 (tratado), G4 (controle), nos momentos estudados (13^a, 18^a, 26^a semanas) e análise estatística

GRUPO	MOMENTO		
	13 ^a semana	18 ^a semana	26 ^a semana
G1	225,0 \pm 17,24 aα	202,4 \pm 31,56 aAα	165,6 \pm 25,98 aAα
G3	211,0 \pm 18,67 aα	206,2 \pm 16,63 aAα	170,7 \pm 28,26 aAα
G2		198,6 \pm 4,60 aAα	180,8 \pm 17,40 aAα
G4		162,1 \pm 26,90 aBα	147,9 \pm 16,17 aAα

Letras minúsculas: comparação do ultra-som (tratado e controle), fixados o (30 e 45) e o momento (13^a, 18^a e 26^a semanas de vida)

Letras maiúsculas: comparação de número aplicações, fixados o ultra-som e o momento

Letras gregas: comparação de momentos, fixados, o ultra-som e o número de aplicações.

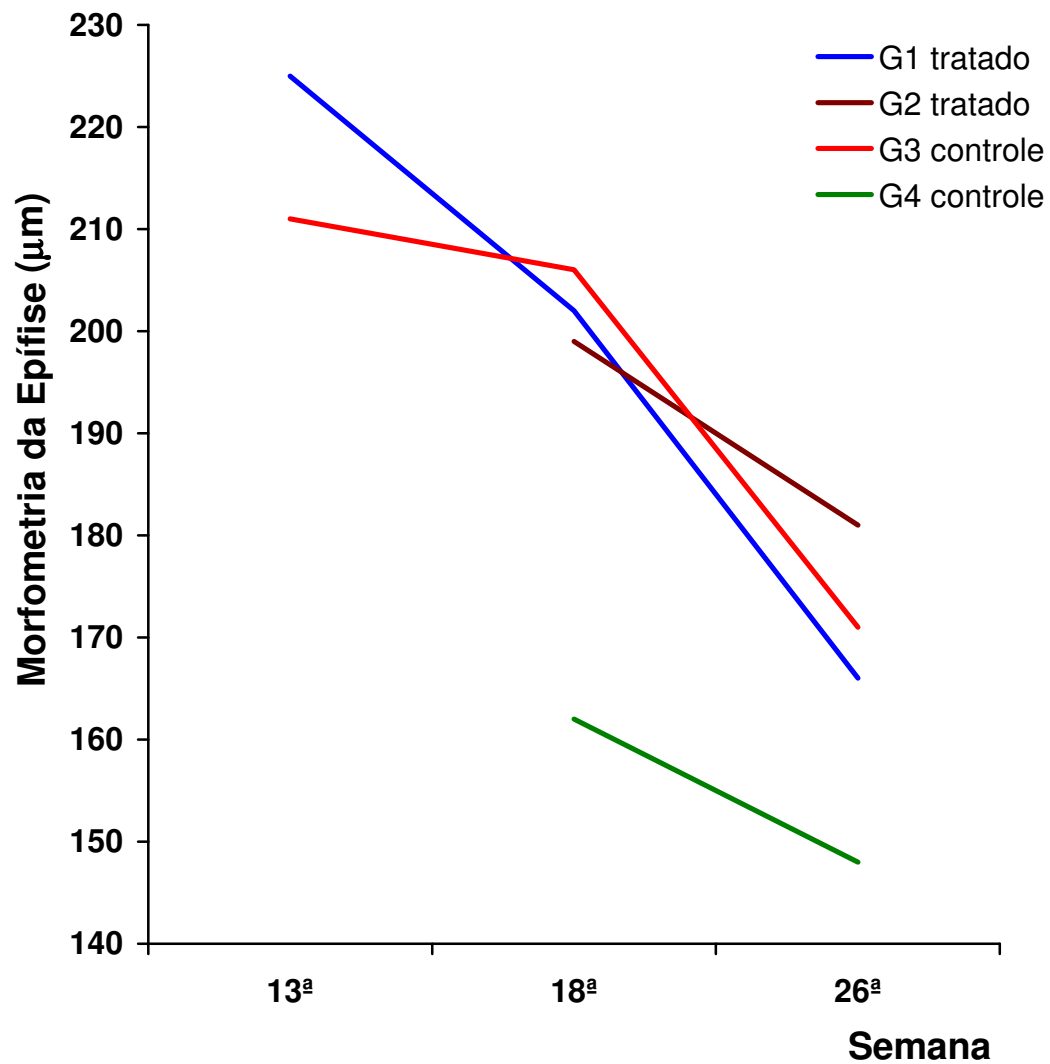


Tabela 30: Hipóteses testadas e comentários da morfometria da epífise distal do fêmur direito. Grupo 30 aplicações - G1 (tratado), G3 (controle) e Grupo 45 aplicações - G2 (tratado), G4 (controle), nos momentos estudados (13ª, 18ª, 26ª semanas)

HIPÓTESES TESTADAS		COMENTÁRIOS	
Efeito do ultra-som (tratados - G1 e G2 e controles - G3 e G4), fixados momento (13 ^a , 18 ^a e 26 ^a semanas) e número de aplicações (30 e 45).	13 ^a semana	30 aplicações	G1 \cong G3
	18 ^a semana	30 aplicações	G1 \cong G3
		45 aplicações	G2 \cong G4
	26 ^a semana	30 aplicações	G1 \cong G3
		45 aplicações	G2 \cong G4
	Efeito do número de aplicações, fixados, momento e ultra-som.	18 ^a semana	G1 e G2
G3 e G4			30 > 45 aplicações
26 ^a semana		G1 e G2	30 \cong 45 aplicações
		G3 e G4	30 \cong 45 aplicações
Efeito de momento, fixados, número de aplicações e ultra-som.	30 aplicações	G1	13 ^a \cong 18 ^a 18 ^a \cong 26 ^a 13 ^a > 26 ^a
		G3	13 ^a \cong 18 ^a \cong 26 ^a
	45 aplicações	G2	18 ^a \cong 26 ^a
		G4	18 ^a \cong 26 ^a

4.7.2 Morfometria da epífise proximal da tíbia direita

4.7.2.1 Morfometria das zonas de repouso, proliferação e maturação (ZONA DE PROLIFERAÇÃO) da epífise proximal da tíbia direita

A tabela 31 apresenta:

- os valores da média e do desvio padrão da medida da Morfometria das zonas de repouso, proliferação e maturação (ZONA DE PROLIFERAÇÃO) da epífise proximal da tíbia direita, nos quatro grupos estudados: 30 aplicações de ultra-som - G1 (tratado) e G3 (controle) e 45 aplicações de ultra-som - G2 (tratado) e G4 (controle); nos momentos do experimento: M1 - 13^a semana de vida; M2 – 18^a semana de vida e M3 - 26^a semana de vida.

- o resumo do resultado da análise estatística ($p < 0,05$).

Na figura 38 estão dispostos graficamente os valores da média em cada um dos momentos em que foi obtida a medida.

A tabela 32 apresenta a análise estatística com as hipóteses testadas e os comentários.

Tabela 31: Média e desvio padrão (μm) da morfometria das zonas de repouso, proliferação e maturação (ZONA DE PROLIFERAÇÃO) da epífise proximal da tíbia direita. Grupo 30 aplicações - G1 (tratado), G3 (controle), Grupo 45 aplicações - G2 (tratado), G4 (controle), nos momentos estudados (13^a, 18^a, 26^a semanas) e análise estatística

GRUPO	MOMENTO		
	13 ^a semana	18 ^a semana	26 ^a semana
G1	129,2 \pm 17,58 aα	97,3 \pm 20,89 aAβ	93,0 \pm 18,33 aAβ
G3	104,9 \pm 14,72 bα	92,6 \pm 6,93 aAα	69,7 \pm 3,66 aAα
G2	–	106,9 \pm 11,28 aAα	94,6 \pm 14,94 aAα
G4	–	83,7 \pm 12,62 aAα	75,6 \pm 11,32 aAα

Letras minúsculas: comparação do ultra-som (tratado e controle), fixados o (30 e 45) e o momento (13^a 18a e 26a semanas de vida)

Letras maiúsculas: comparação de número aplicações, fixados o ultra-som e o momento

Letras gregas: comparação de momentos, fixados, o ultra-som e o número de aplicações.

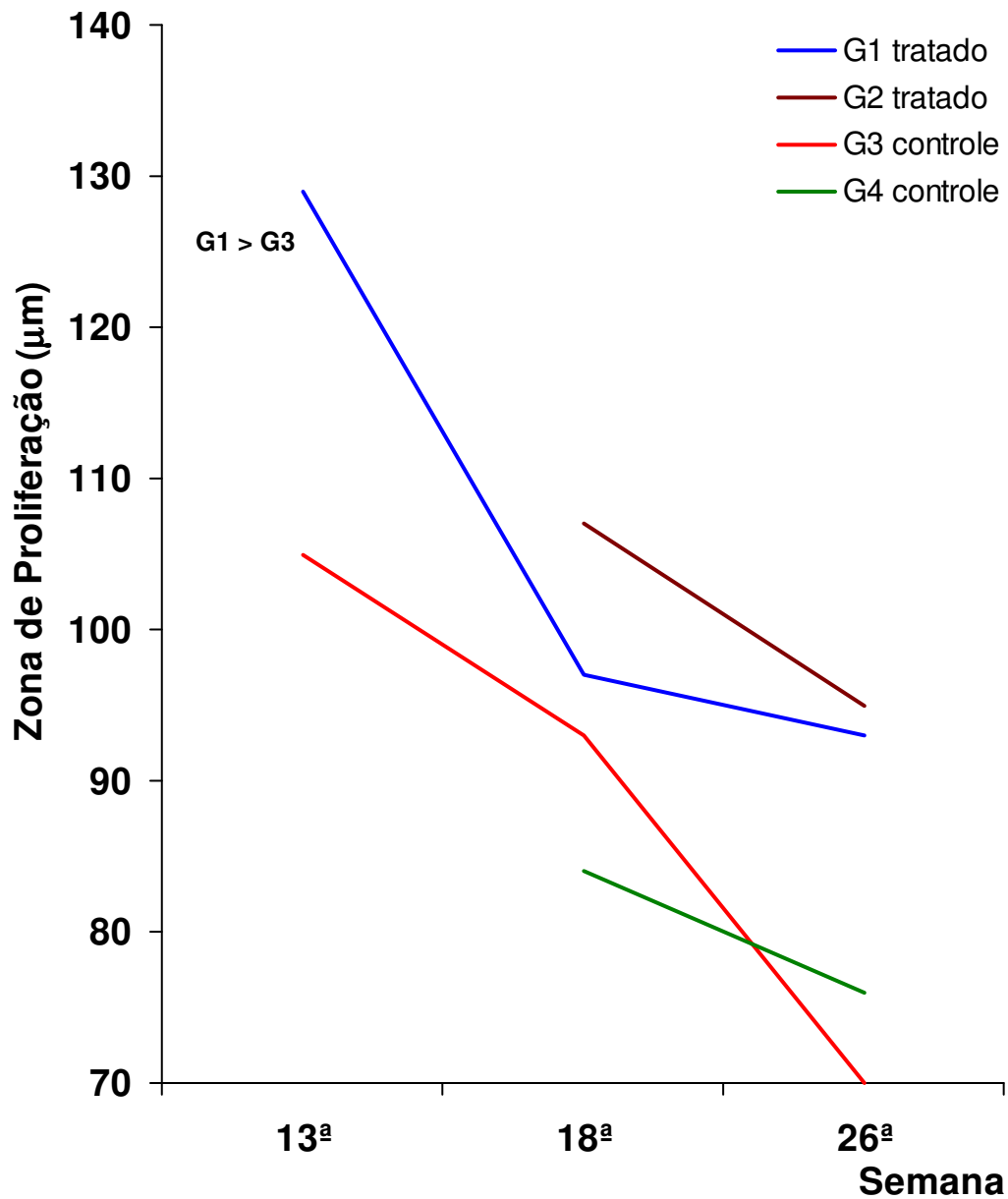


Figura 38: Morfometria das zonas de repouso, proliferação e maturação (ZONA DE PROLIFERAÇÃO) da epífise proximal da tíbia direita. Grupos 30 aplicações de ultra-som - G1 (tratado) e G3 (controle) e grupos 45 aplicações de ultra-som - G2 (tratado) e G4 (controle)

Tabela 32: Hipóteses testadas e comentários da morfometria das zonas de repouso, proliferação e maturação (ZONA DE PROLIFERAÇÃO) da epífise proximal da tíbia direita. Grupo 30 aplicações - G1 (tratado), G3 (controle), Grupo 45 aplicações, G2 (tratado) e G4 (controle), nos momentos estudados (13^a, 18^a, 26^a semanas)

HIPÓTESES TESTADAS		COMENTÁRIOS	
Efeito do ultra-som (tratados - G1 e G2 e controles - G3 e G4), fixados momento (13 ^a , 18 ^a e 26 ^a semanas) e número de aplicações (30 e 45).	13 ^a semana	30 aplicações	G1 > G3
	18 ^a semana	30 aplicações	G1 ≅ G3
		45 aplicações	G2 ≅ G4
	26 ^a semana	30 aplicações	G1 ≅ G3
		45 aplicações	G2 ≅ G4
	Efeito do número de aplicações, fixados, Momento e ultra-som.	18 ^a semana	G1 e G2
G3 e G4			30 ≅ 45 aplicações
26 ^a semana		G1 e G2	30 ≅ 45 aplicações
		G3 e G4	30 ≅ 45 aplicações
Efeito de momento, fixados, número de aplicações e ultra-som.	30 aplicações	G1	13 ^a > 18 ^a ≅ 26 ^a
		G3	13 ^a ≅ 18 ^a ≅ 26 ^a
	45 aplicações	G2	18 ^a ≅ 26 ^a
		G4	18 ^a ≅ 26 ^a

4.7.2.2 Morfometria das zonas hipertrófica e hipertrófica calcificada (ZONA HIPERTRÓFICA) da epífise proximal da tíbia

A tabela 33 apresenta:

- os valores da média e do desvio padrão da medida da Morfometria das zonas hipertrófica e hipertrófica calcificada (ZONA HIPERTRÓFICA) da epífise proximal da tíbia direita, nos quatro grupos estudados: 30 aplicações de ultra-som - G1 (tratado) e G3 (controle) e 45 aplicações de ultra-som - G2 (tratado) e G4 (controle); nos momentos do experimento: M1 - 13^a semana de vida; M2 – 18^a semana de vida e M3 - 26^a semana de vida.
- o resumo do resultado da análise estatística ($p < 0,05$).

Na figura 39 estão dispostos graficamente os valores da média em cada um dos momentos em que foi obtida a medida.

A tabela 34 apresenta a análise estatística com as hipóteses testadas e os comentários.

Tabela 33: Média e desvio padrão (μm) da morfometria das zonas hipertrófica e hipertrófica calcificada (ZONA HIPERTRÓFICA) da epífise proximal da tíbia. Grupos 30 aplicações, G1 (tratado), G3 (controle), Grupo 45 aplicações - G2 (tratado), G4 (controle), nos momentos estudados (13^a, 18^a, 26^a semanas) e análise estatística

GRUPO	MOMENTO		
	13 ^a semana	18 ^a semana	26 ^a semana
G1	75,2±7,09 aα	51,1±5,39 aAβ	47,5±7,21 aAβ
G3	54,6±4,78 bα	53,9±6,20 aAα	45,5±1,73 aAα
G2	–	53,4±4,58 aAα	48,3±9,03 aAα
G4	–	40,8±6,55 aBα	38,6±7,70 bAα

Letras minúsculas: comparação do ultra-som (tratado e controle), fixados o (30 e 45) e o momento (13^a, 18^a e 26^a semanas de vida)

Letras maiúsculas: comparação de número aplicações, fixados o ultra-som e o momento

Letras gregas: comparação de momentos, fixados, o ultra-som e o número de aplicações.

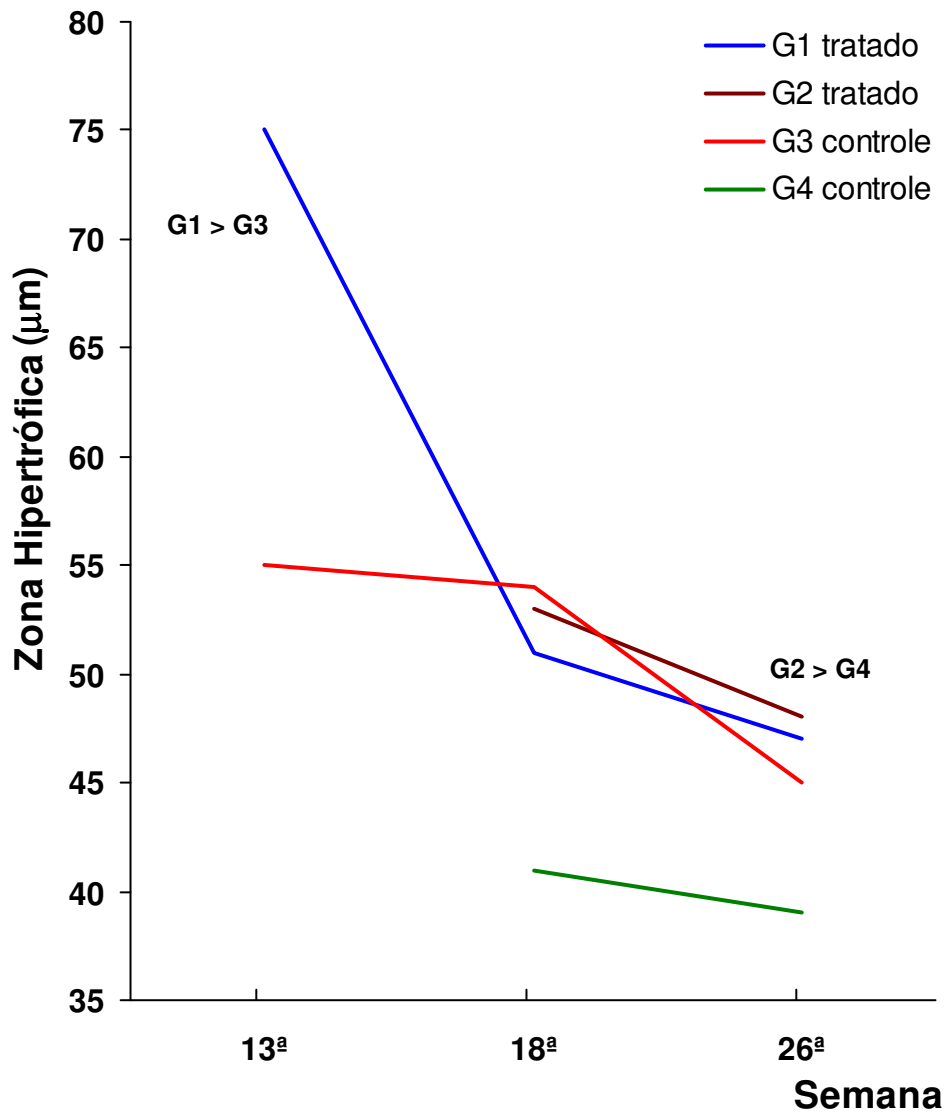


Figura 39: Morfometria das zonas hipertrófica e hipertrófica calcificada (ZONA HIPERTRÓFICA) da epífise proximal da tíbia direita. Grupos 30 aplicações de ultra-som - G1 (tratado) e G3 (controle) e grupos 45 aplicações de ultra-som - G2 (tratado) e G4 (controle). Valores em micrômetros

Tabela 34: Hipóteses testadas e comentários da morfometria das zonas hipertrófica e hipertrófica calcificada (ZONA HIPERTRÓFICA) da epífise proximal da tibia direita. Grupo 30 aplicações - G1 (tratado), G3 (controle), Grupo 45 aplicações - G2 (tratado), G4 (controle), nos momentos estudados (13^a, 18^a, 26^a semanas)

HIPÓTESES TESTADAS	COMENTÁRIOS			
Efeito do ultra-som (tratados - G1 e G2 e controles - G3 e G4), fixados momento (13 ^a , 18 ^a e 26 ^a semanas) e número de aplicações (30 e 45).	13 ^a semana	30 aplicações	G1 > G3	
	18 ^a semana	30 aplicações	G1 ≅ G3	
		45 aplicações	G2 ≅ G4	
	26 ^a semana	30 aplicações	G1 ≅ G3	
		45 aplicações	G2 > G4	
	Efeito do número de aplicações, fixados momento e ultra-som.	18 ^a semana	G1 e G2	30 ≅ 45 aplicações
G3 e G4			30 > 45 aplicações	
26 ^a semana		G1 e G2	30 ≅ 45 aplicações	
		G3 e G4	30 ≅ 45 aplicações	
Efeito de momento, fixados número de aplicações e ultra-som.		30 aplicações	G1	13 ^a > 18 ^a ≅ 26 ^a
			G3	13 ^a ≅ 18 ^a ≅ 26 ^a
	45 aplicações	G2	18 ^a ≅ 26 ^a	
		G4	18 ^a ≅ 26 ^a	

4.7.2.3 - Morfometria da epífise proximal da tíbia

A tabela 35 apresenta:

- os valores da média e do desvio padrão da medida da Morfometria da epífise proximal da tíbia direita, nos quatro grupos estudados: 30 aplicações de ultra-som - G1 (tratado) e G3 (controle) e 45 aplicações de ultra-som - G2 (tratado) e G4 (controle); nos momentos do experimento: M1 - 13^a. semana de vida; M2 – 18^a. semana de vida e M3 - 26^a. (semana de vida).

- o resumo do resultado da análise estatística ($p < 0,05$).

Na figura 40 estão dispostos graficamente os valores da média em cada um dos momentos em que foi obtida a medida.

A tabela 36 apresenta a análise estatística com as hipóteses testadas e os comentários.

Tabela 35: Média e desvio padrão (μm) da morfometria da epífise proximal da tíbia. Grupos 30 aplicações. G1 (tratado), G3 (controle), Grupo 45 aplicações - G2 (tratado), G4 (controle), nos momentos estudados (13^a, 18^a, 26^a semanas) e análise estatística

GRUPO	MOMENTO		
	13 ^a semana	18 ^a semana	26 ^a semana
G1	227,2 \pm 20,96 aAα	180,1 \pm 18,57 aAβ	165,2 \pm 16,54 aAβ
G3	158,6 \pm 19,00 bAα	151,6 \pm 11,58 aAα	115,8 \pm 3,95 bAβ
G2	–	167,7 \pm 21,39 aAα	166,9 \pm 10,56 aAα
G4	–	121,8 \pm 21,76 bAα	121,8 \pm 19,79 bAα

Letras minúsculas: comparação do ultra-som (tratado e controle), fixados o (30 e 45) e o momento (13^a, 18^a e 26^a semanas de vida)

Letras maiúsculas: comparação de número aplicações, fixados o ultra-som e o momento

Letras gregas: comparação de momentos, fixados, o ultra-som e o número de aplicações.

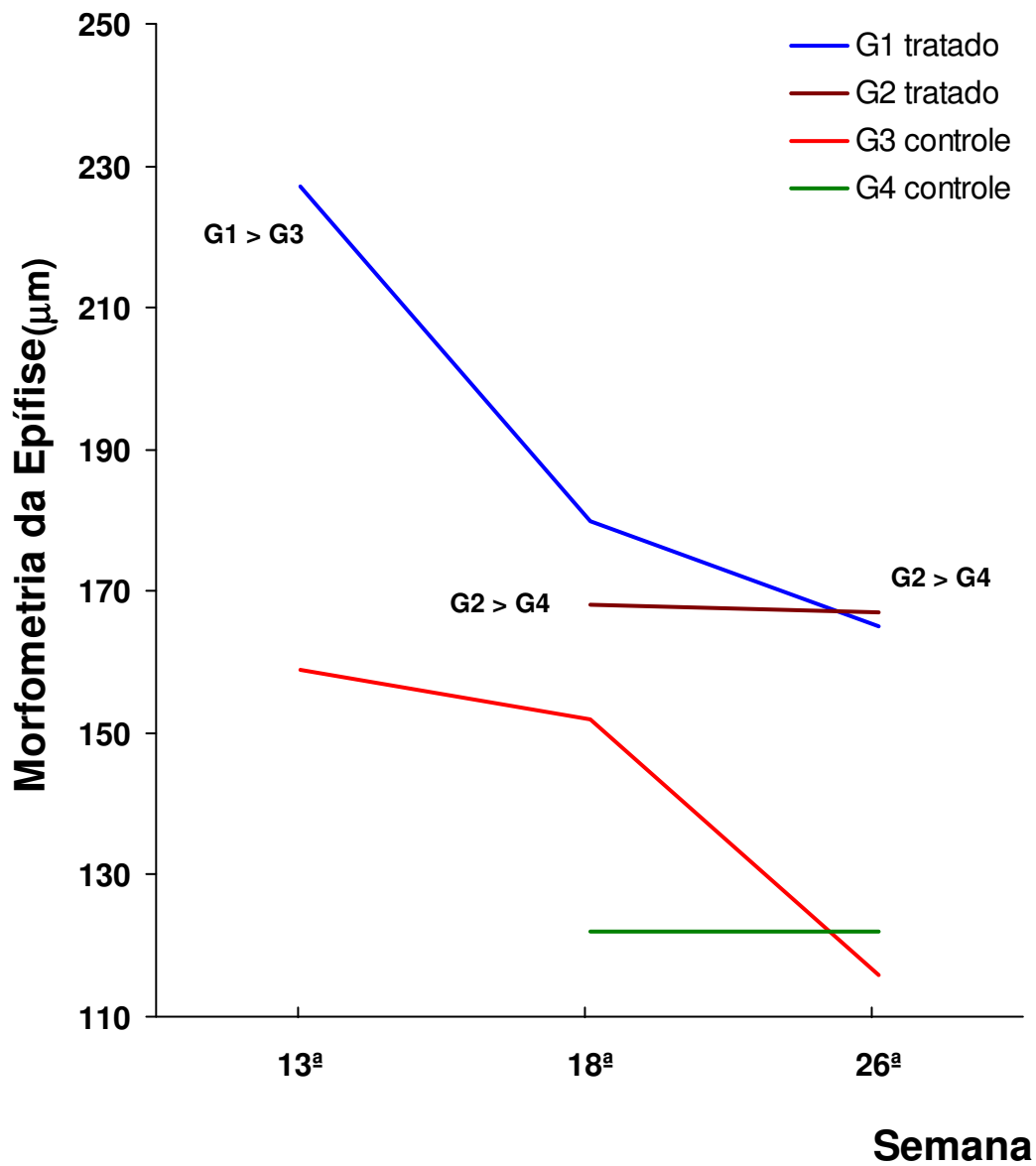


Figura 40: Morfometria da epífise distal da tíbia direita. Grupos 30 aplicações de ultra-som - G1 (tratado) e G3 (controle) e grupos 45 aplicações de ultra-som - G2 (tratado) e G4 (controle). Valores em micrômetros

Tabela 36: Hipóteses testadas e comentários da morfometria da epífise proximal da tíbia direita. Grupo 30 aplicações - G1 (tratado), G3 (controle), Grupo 45 aplicações - G2 (tratado), G4 (controle), nos momentos estudados (13^a, 18^a, 26^a semanas)

HIPÓTESES TESTADAS		COMENTÁRIOS	
Efeito do ultra-som tratados (G1 e G2) e controles (G3 e G4) fixados, momento (13 ^a , 18 ^a e 26 ^a semanas) e número de aplicações (30 e 45).	13 ^a semana	30 aplicações	G1 > G3
	18 ^a semana	30 aplicações	G1 ≅ G3
		45 aplicações	G2 > G4
	26 ^a semana	30 aplicações	G1 > G3
		45 aplicações	G2 > G4
Efeito do número de aplicações, fixados momento e ultra-som.	18 ^a semana	G1 e G2	30 ≅ 45 aplicações
		G3 e G4	30 ≅ 45 aplicações
	26 ^a semana	G1 e G2	30 ≅ 45 aplicações
		G3 e G4	30 ≅ 45 aplicações
Efeito de momento, fixados número de aplicações e ultra-som.	30 aplicações	G1	13 ^a > 18 ^a ≅ 26 ^a
		G3	13 ^a ≅ 18 ^a > 26 ^a
	45 aplicações	G2	18 ^a ≅ 26 ^a
		G4	18 ^a ≅ 26 ^a

4.7.3 Morfometria - Figuras

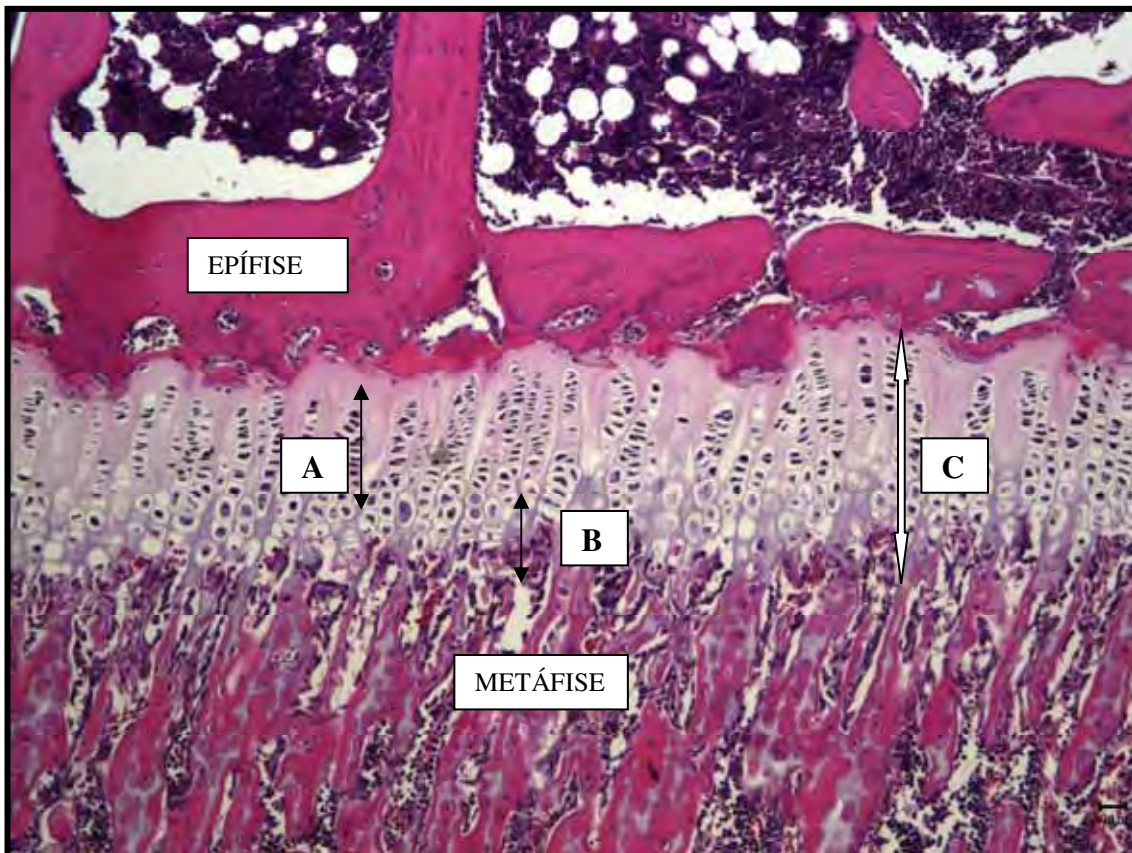


Figura 41. Disco epifisial da tíbia. Grupo tratado - 30 aplicações (G1) - 13^a semana: A (Zonas de repouso +de proliferação + de maturação); B (Zonas hipertrófica + hipertrófica calcificada); C (Disco epifisial).

H.E. - AO 30 x

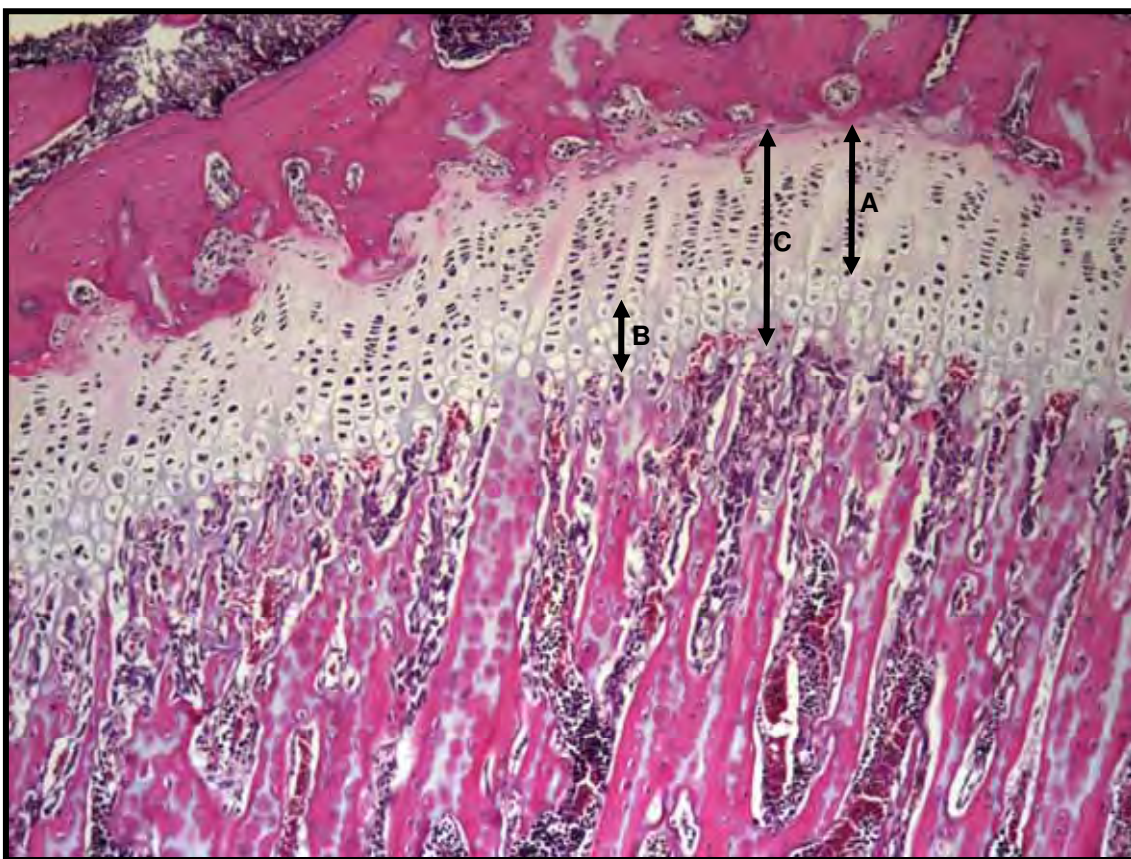


Figura 42. Disco epifisial do fêmur. Grupo tratado - 30 aplicações (G1) - 13ª semana: A – (Zonas de repouso, + de Proliferação + Zona de maturação); B – (Zonas hipertrófica + hipertrófica calcificada); C (Disco epifisial).

H.E. - AO 25 x

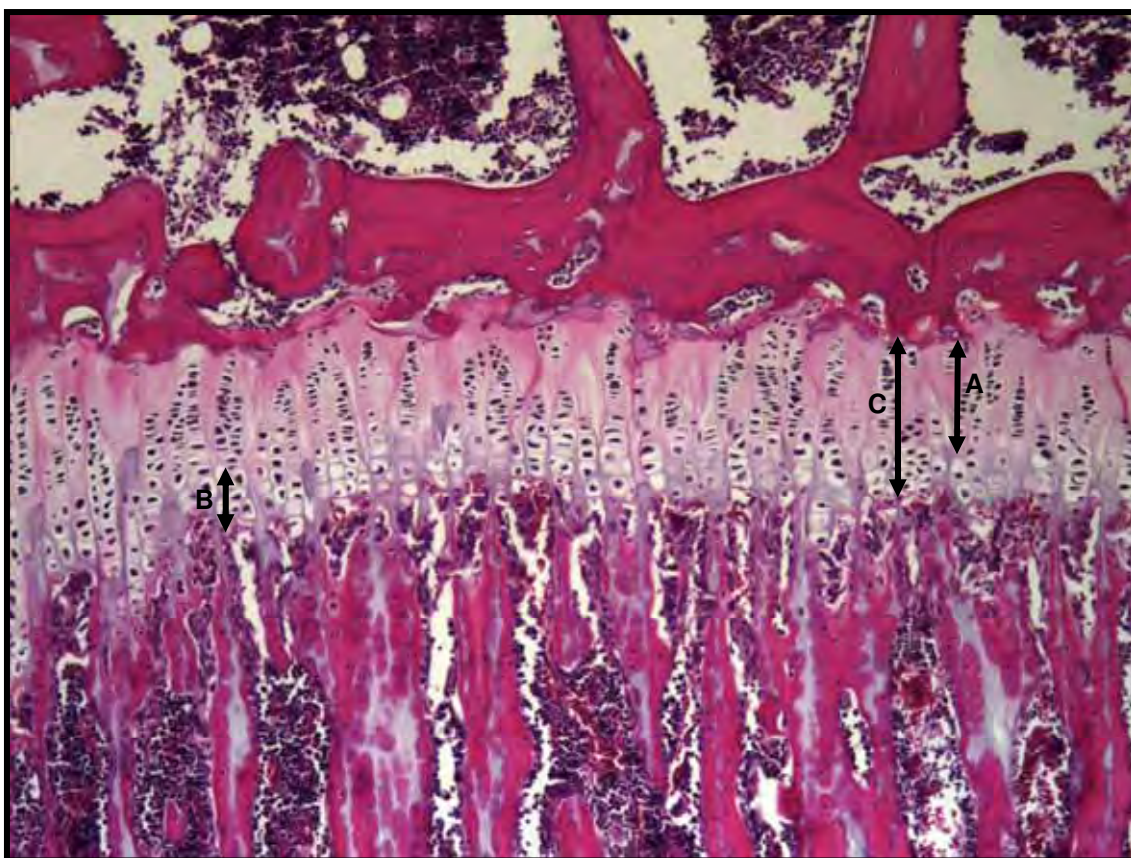


Figura 43. Disco epifisial da tíbia. Grupo tratado - 30 aplicações (G1) - 18ª semana: A (Zonas de repouso +de proliferação + de maturação); B (Zonas hipertrófica + hipertrófica calcificada); C (Disco epifisial).

H.E. AO 25 x

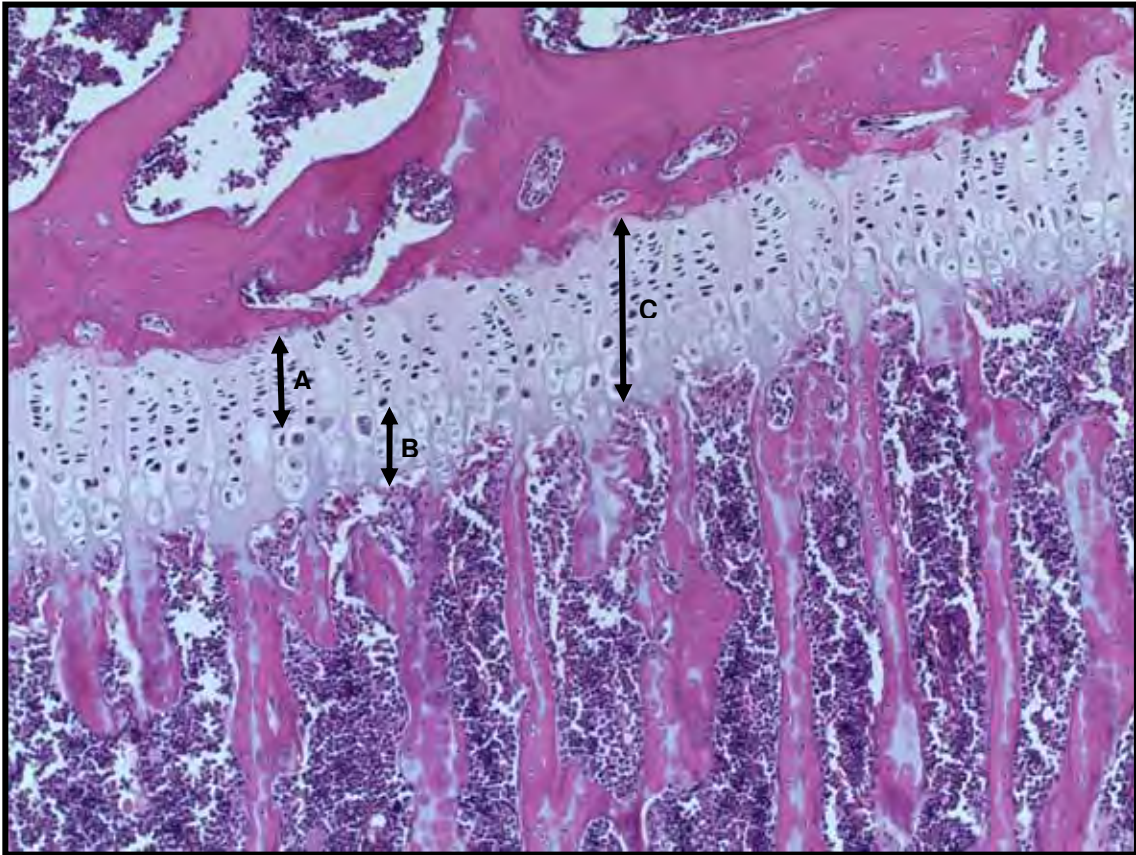


Figura 44. Disco epifisial da tíbia. Grupo controle - 45 aplicações (G4) - 18ª semana: A (Zonas de repouso +de proliferação + de maturação); B (Zonas hipertrófica + hipertrófica calcificada); C (Disco epifisial).

H.E. - AO 30 x

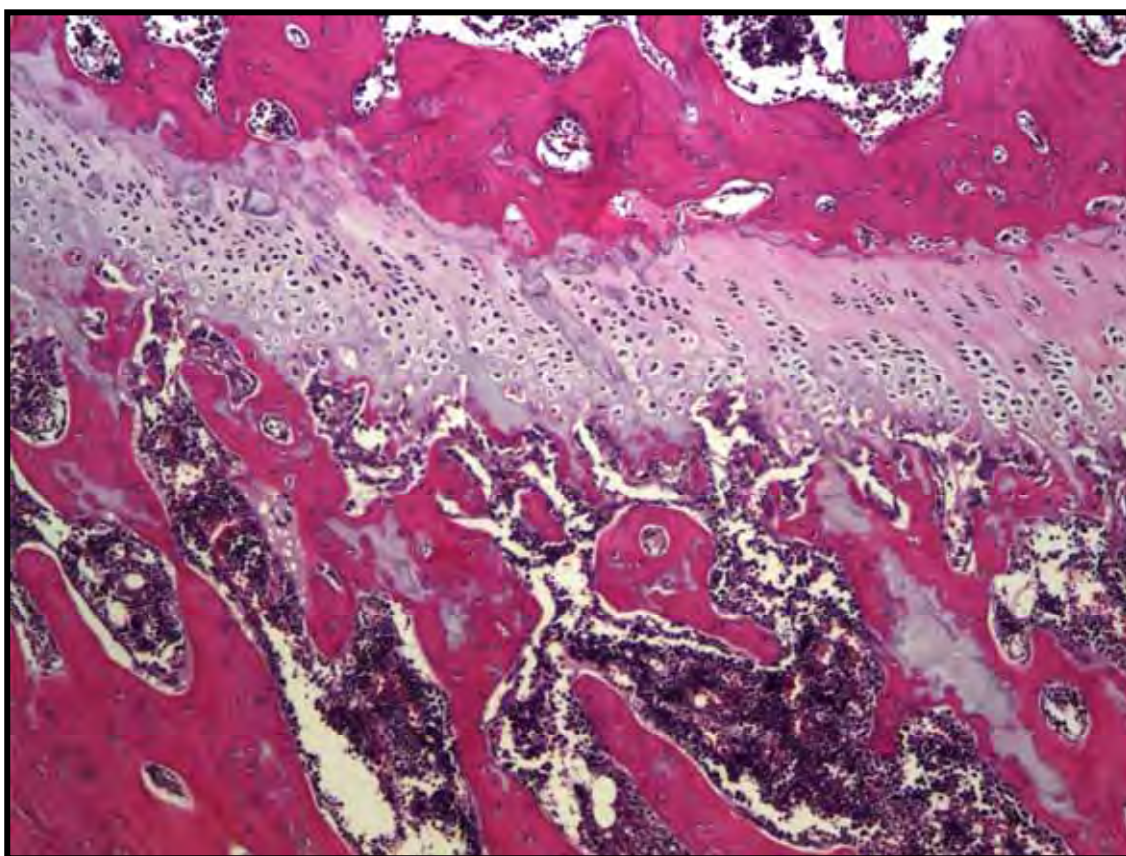


Figura 45. Disco epifisial do fêmur. Grupo tratado - 45 aplicações (G2) - 18^a semana
H.E. - AO 20 x

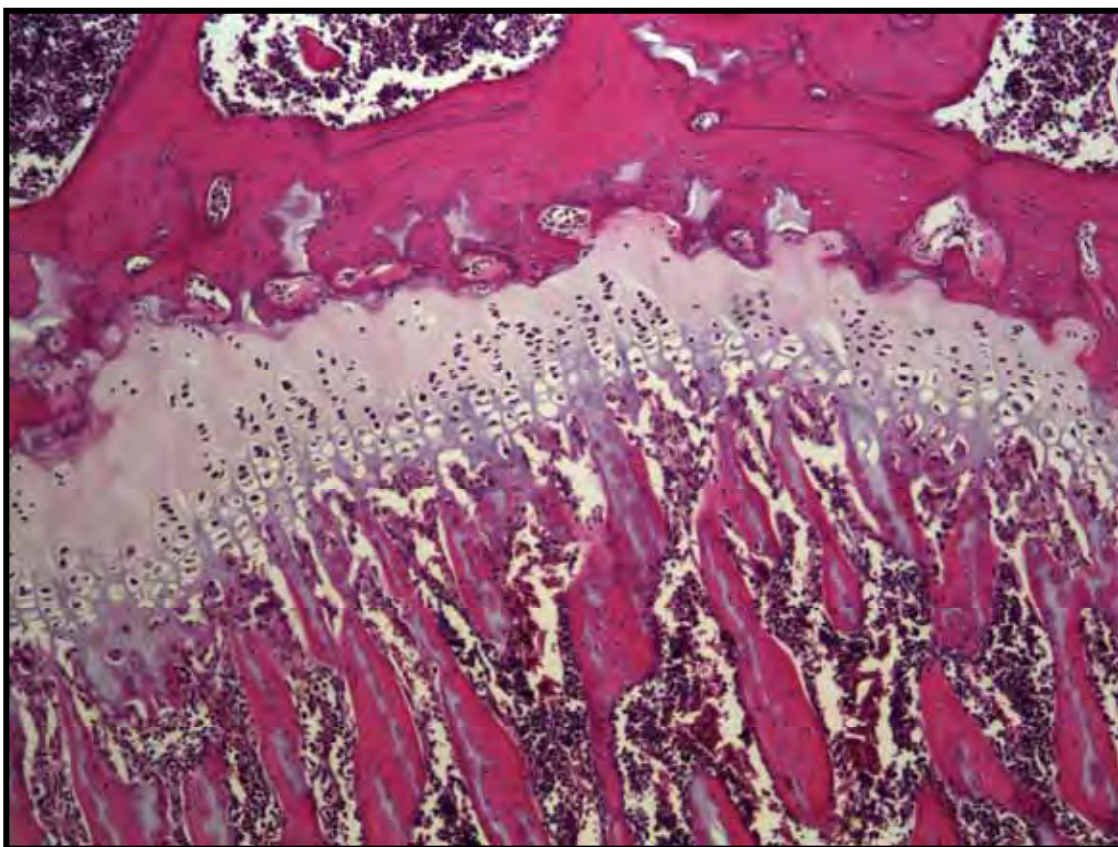


Figura 46. Disco epifisial do fêmur. Grupo tratado - 30 aplicações (G1) - 26^a semana
H.E. - AO 25 x

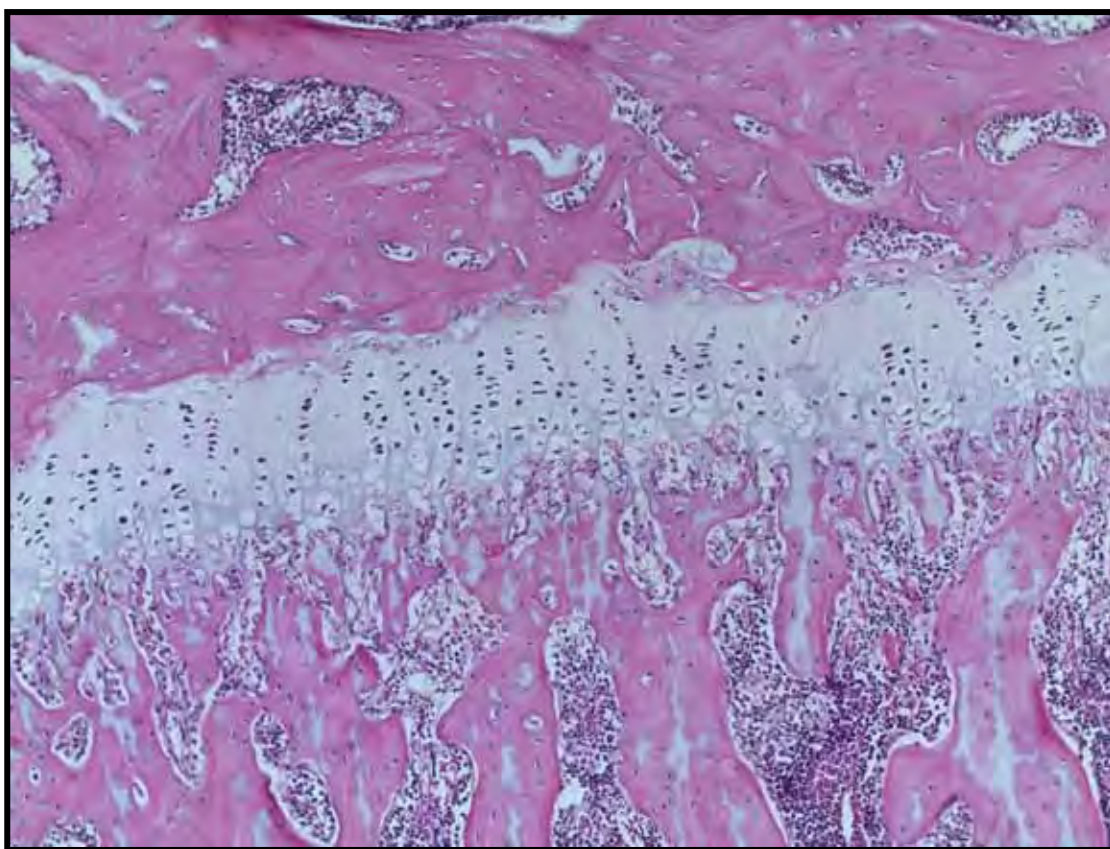


Figura 47. Disco epifisial do fêmur. Grupo controle - 45 aplicações (G4) - 26^a semana
H.E. - AO 25 x

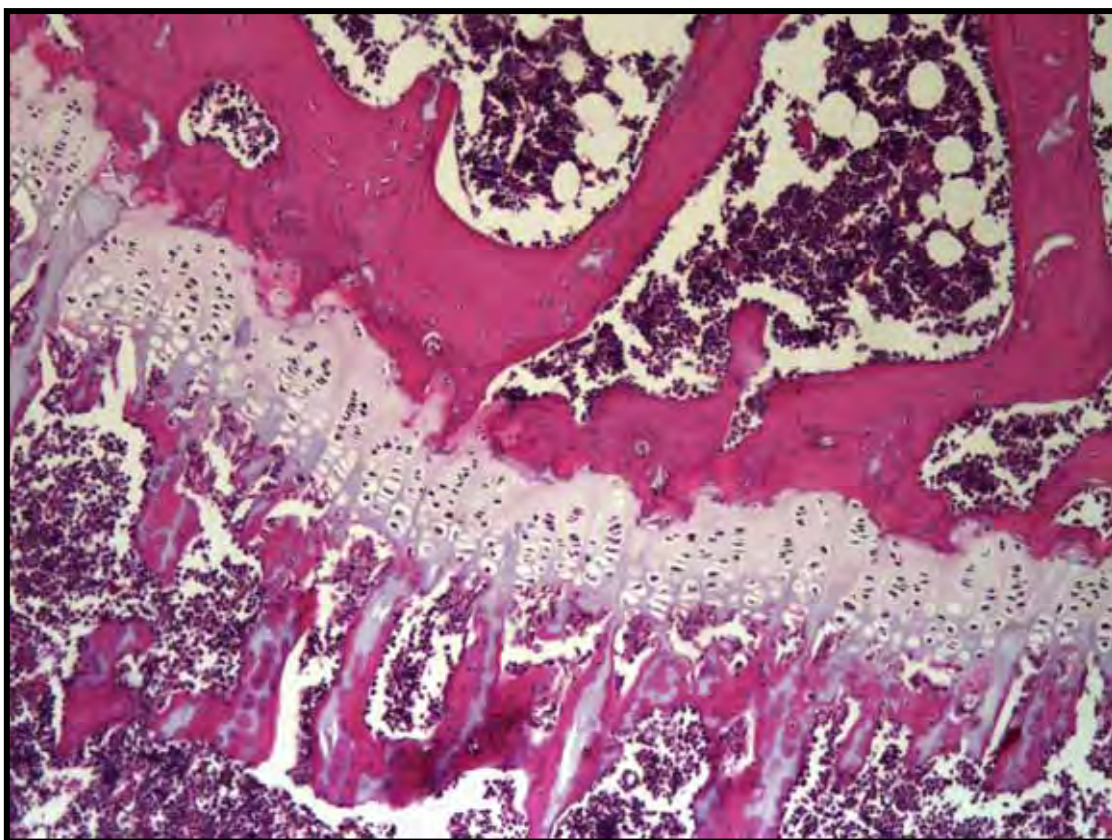


Figura 48. Disco epifisial da tíbia. Grupo tratado - 45 aplicações (G2) - 26^a semana
H.E. - AO 25 x

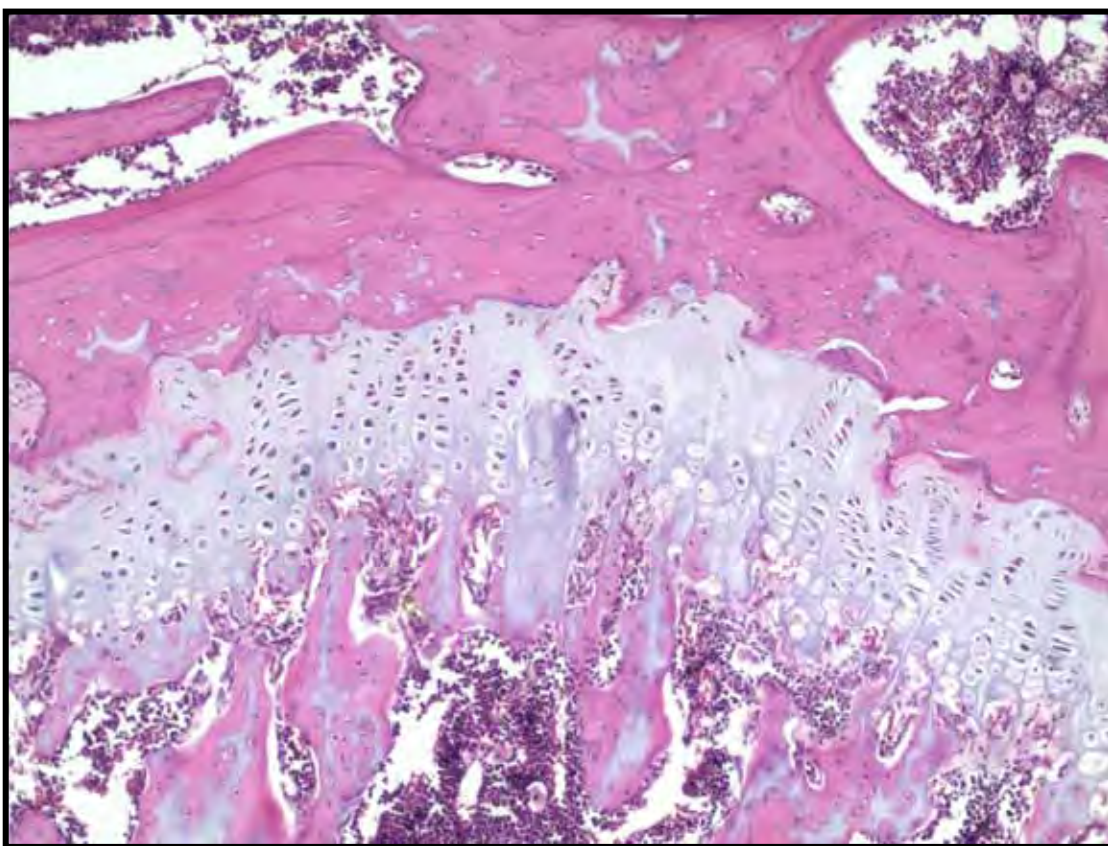


Figura 49. Disco epifisial do fêmur. Grupo controle - 30 aplicações (G3) - 26^a semana
H.E. - AO 30 x

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

5.1 Animal de Experimentação

Na escolha do rato como animal de experimentação considerou-se:

a) conhecimento da biologia dos tecidos examinados no estudo, técnicas padronizadas para as comparações desejadas e experiência acumulada em número expressivo de experimentos semelhantes;

b) necessidade de animais jovens, com disco epifisial em atividade, para estudar possível efeito do ultra-som sobre o crescimento ósseo; acompanhamento por tempo longo o suficiente para observarmos o indivíduo adulto e assim detectar alterações, que mesmo pequenas no curto prazo, pudessem ser reconhecidas e mensuradas no animal adulto ou que quando presentes durante o tratamento fossem efêmeras, desaparecendo ao longo do tempo;

c) que a manutenção de animais em condições de laboratório por longo tempo acarreta inúmeras dificuldades; desde os cuidados diários de acordo com princípios éticos de manipulação de animais; o fornecimento de água, alimentação “ad-libitum” e cuidados higiênicos; e custos, que trazem relação com o porte do animal e com o período de tempo compreendido desde o início do experimento até o estabelecimento da idade adulta;

d) facilidade de obtenção dos animais nas quantidades e idade necessárias, com amostra o mais uniforme possível.

O rato tem sido objeto de inúmeros trabalhos a respeito de aspectos biológicos e relativos à histologia do disco epifisial; é modelo de comparação a outros animais e, guarda semelhança ao padrão humano (Barnes, et al. 1947; Shenk et. al., 1968; Brighton et. al., 1969, Brighton a,b 1971,1978; Kember 1972; Warrell e Taylor 1979; Steimberg 1981; Taylor et. al. 1987).

Embora, outros animais tenham sido utilizados em estudos sobre o ultra-som, como cães, carneiros, porcos e principalmente coelhos, o rato tem sido escolha freqüente (De Forester et. al., 1953; Abramovich, 1970; Duarte, 1984; Taylor et. al., 1987; Wiltink et. al., 1994; Reher et. al., 1997; Spadaro & Albanese, 1998; Azuma et. al., 2001).

Ao contrário do homem que, adulto, tem o disco epifisial “fechado”, ou seja, a espessura do disco diminui progressivamente até o desaparecimento durante a adolescência e início da fase adulta, estabelecendo uma continuidade óssea entre a epífise e a metáfise, no rato o disco epifisial persiste durante toda a vida, embora a atividade não seja uniforme, diminuindo significativamente ao longo dos primeiros seis meses de vida.

Essas características foram relatadas por Kember (1973) que demonstrou que após período de taxas crescentes de desenvolvimento ósseo, que chamou de desenvolvimento pós-embriônico e, que termina na terceira semana de vida do rato, a velocidade do crescimento longitudinal do osso diminui gradativamente até a 26^a semana de vida. Após, a taxa de crescimento ósseo é residual, restando pequena atividade durante toda a vida do animal, ao contrário de outros mamíferos.

Apesar dessa diferença biológica, em prazo relativamente curto (seis meses ou 26 semanas) qualquer influência exercida, pelo tratamento, sobre o crescimento ósseo durante o desenvolvimento do animal, estará presente ou nunca se manifestará, o que também torna o rato atraente modelo em experimentação animal.

5.2 Modelo de Agressão

5.2.1 Local

O disco epifisial é estrutura histológica interposta entre a epífise e a metáfise, responsável pelo crescimento longitudinal dos ossos. Embora, Junqueira & Carneiro (2004) tenham dividido o disco epifisial em cinco camadas ou subdivisões histológicas, Schenk et. al., (1968), Brighton (1978) e outros autores que desenvolveram estudos sobre crescimento ósseo (Spadaro e Albanese, 1998; Lyon et. al., 2003; Ogurtan et. al., 2002; Korstjens et. al., 2004), definiram o disco em três camadas: a zona de cartilagem em repouso situada na porção mais próxima à epífise; a zona de proliferação juntamente com a zona de maturação, onde ocorre a divisão celular e os condrócitos adotam formação em colunas e, a zona hipertrófica somada a zona de calcificação, mais próxima à metáfise, onde os condrócitos aumentam de

tamanho e a matriz fundamental é progressivamente impregnada de íons de cálcio ocorrendo a morte celular. Na região metafisária a zona hipertrófica é invadida por vasos sanguíneos, notando-se a presença de osteoclastos e osteoblastos que promovem a reabsorção dos condrócitos e a formação de osso.

Decidiu-se medir o disco epifisial em sua altura (ou largura) total (Disco Epifisial) e dividi-lo, para obtenção das medidas, em duas camadas distintas: a primeira - designada Zona de Proliferação – compreendendo a zona de células em repouso e as zonas de proliferação e maturação e, a segunda designada – Zona Hipertrófica – compreendendo a zona hipertrófica e a zona hipertrófica calcificada.

O joelho como local de escolha para a aplicação do ultra-som no rato deve-se a facilidade de expor a região à intervenção, acessar as estruturas ósseas sem interposição muscular entre o cabeçote do ultra-som e as estruturas ósseas e, ser região modelo freqüente para estudos histológicos do disco epifisial, além do fato de que as epífises, distal do fêmur e proximal da tíbia, são responsáveis por percentual significativo do crescimento do membro caudal.

5.2.2 Método

Como o rato apresenta, na epífise proximal da tíbia, taxa decrescente de crescimento a partir da terceira semana de vida (Kember, 1973), o estudo visou atuar com o tratamento proposto, o mais brevemente possível.

Diferentemente do procedimento de Spadaro e Albanese (1998) e Lyon et. al. (2003), não foi possível submeter os animais ao tratamento sem anestesia. Realizar o experimento, com os animais em vigília induzia agitação e agressividade e, tornava impossível manter o cabeçote corretamente acoplado durante os dez minutos da aplicação (ou simulação) do ultra-som.

Todos os animais foram, portanto, anestesiados antes de cada aplicação do ultra-som.

O tamanho e peso do animal e a maior sensibilidade à anestesia, tornou necessário iniciar o estudo a partir da quarta semana de vida. O tempo

de 13 semanas de vida foi considerado para término da aplicação do ultra-som, atuando o tratamento durante período considerado como o segundo (após o crescimento pós-embriônico, entre o nascimento e a terceira semana de vida, segundo Kember, 1973) de maior atividade do disco epifisial da tibia do rato e conseqüentemente do crescimento ósseo.

O protocolo de estudo previa um total de 30 ou 45 aplicações de ultra-som, até o final da 13^a semana de vida. Assim o grupo de 45 aplicações deveria receber, desde o início do experimento na quarta semana de vida, cinco aplicações (e anestésias) semanais, o que provocava aumento da mortalidade dos animais, dificultando em demasiado esta proposição.

Decidiu-se, mesmo assim, estabelecer grupo com esse número de aplicações e para isto foi necessário estender o tratamento até a 18^a semana de vida. Foram realizadas em todos os grupos, três aplicações semanais (e/ou anestésias) entre a quarta e o final da 9^a semana de vida, quatro aplicações semanais entre a 10^a e a 13^a semana e, no grupo 45 aplicações, outras três aplicações (e/ou anestésias) semanais até a 18^a semana de vida, estabelecida como o segundo momento deste experimento.

O estudo prolongou-se até o final do sexto mês de vida, ou 26 semanas, quando o rato inicia o declínio (se considerar que o animal vive em média um ano) com mínima atividade biológica no disco epifisial (Kember 1973), de forma a observar os efeitos, se presentes, no animal desenvolvido.

A cada momento do experimento dez animais foram escolhidos por sorteio para eutanásia, obtenção das medidas de comprimento do osso e da largura da epífise e como no grupo de 30 aplicações foram estabelecidos três distintos momentos (13^a, 18^a e 26^a semanas de vida), foram necessários ao menos trinta animais (utilizamos 35 ou 36), por grupo (tratado e controle). No grupo de 45 aplicações, estabelecido dois momentos apenas (18^a e 26^a semanas de vida) a necessidade foi de 20 animais (utilizamos 25 ou 26) por grupo (tratado e controle), num mínimo de 100 animais (utilizamos 122).

5.2.3 Avaliação clínica

Dados, como o peso dos animais, foram obtidos para que, indiretamente, pudéssemos monitorar a condição clínica. Os animais,

semanalmente, antes da anestesia e aplicação do ultra-som, foram observados quanto à sua atividade física e marcha. Após a anestesia eram pesados, realizada a tricotomia, observada a pele à procura de possíveis lesões e comparadas as movimentações articulares passivas de ambos os joelhos.

Não foram observadas alterações da marcha, atividade física dos animais e diferenças entre as movimentações articulares e desvios de eixo dos joelhos tratados (direito) e esquerdos (controle). O ultra-som não provocou lesões de pele.

Nas duas primeiras semanas ocorreram 12 dos 17 óbitos observados em todo o experimento. As causas foram a sensibilidade ao anestésico e a asfixia do animal, que ainda sobre o efeito do anestésico, não reagia ao ficar sob os outros animais, após o procedimento. O protocolo passou a incluir período de “recuperação anestésica” em local aquecido, até o despertar do animal. Só depois eram, então, recolocados em suas caixas o que evitou mortes subseqüentes. Cinco animais foram encontrados mortos e, ao contrário do ganho do peso habitual, havia na semana anterior à de suas mortes, perda de peso em dois animais ou manutenção do peso em outros três. Em um desses animais havia secreção purulenta nos pulmões, um foi encontrado semi-devorado e os demais foram descartados, antes de serem examinados. Não houve mortes de animais além da 8ª semana de vida (quatro primeiras semanas do experimento).

O peso médio semanal, de cada grupo estudado, desde a terceira semana de vida, apresentou ligeiro afastamento dos pontos médios ao longo do tempo, sem que houvesse diferença estatística entre os quatro grupos em cada um dos três momentos do estudo.

Ao longo do tempo os animais apresentaram, como era esperado, aumento do peso. A comparação do peso entre as semanas 13ª e 18ª não mostrou diferença estatística, embora os animais tenham aumentado normalmente seu peso e isto foi uniforme em todos os grupos estudados. Em estudo anterior havia concluído que a aplicação do ultra-som em diferentes potências não interfere no desenvolvimento corpóreo normal dos animais (Barreto, 1998).

Nas medidas comprimentos do fêmur, da tíbia e do membro e larguras das epífises distal do fêmur e proximal da tíbia, quando comparados, no grupo tratado, o lado direito com o lado esquerdo no mesmo animal ou, com o lado direito do grupo não tratado (controle), não foi encontrada diferença estatística. Quando os dados do lado direito dos animais do grupo tratado com 30 aplicações foram comparados com o mesmo lado dos animais do grupo tratado com 45 aplicações, também não foi encontrada diferença.

Assim, a aplicação do ultra-som não interferiu (nem estimulando nem inibindo) no desenvolvimento do comprimento longitudinal e na largura óssea do fêmur e da tíbia, no membro objeto do tratamento (direito), tanto comparado ao lado contra-lateral, quanto ao mesmo lado do grupo controle, independente do número de aplicações a que foram submetidos, em todos os momentos estudados. As variações encontradas ocorreram, tanto nos grupos tratados, quanto nos seus controles, sem que houvesse um padrão que pudesse sugerir efeito do tratamento.

5.2.4 Morfometria

Os parâmetros estudados no disco epifisial do fêmur não evidenciaram alterações estatísticas. Assim foram os resultados, quando da comparação entre os grupos tratados e seus respectivos controles nos parâmetros Zona de Proliferação, Zona Hipertrófica e Disco Epifisia, tanto para 30 quanto para 45 aplicações.

O resultado da comparação, no fêmur, entre os grupos tratados com 30 aplicações e 45 aplicações, não mostrou diferença estatística, em relação ao número de vezes em que esse tratamento foi aplicado. Ao comparar o grupo controle 30 aplicações de ultra-som (G3) com o grupo controle 45 aplicações (G4), encontramos na 18ª semana de vida diferença estatística significativa, embora essa comparação não tenha sentido (ambos são controles não tendo sido submetidos ao ultra-som), mostrando que eventuais diferenças podem existir sem que haja qualquer influência do tratamento instituído. Há, portanto que se ter cautela com a presença de alguma diferença, isoladamente.

Na medida Zona de Proliferação da tíbia, no grupo de 30 aplicações, na 13ª semana, tratado foi maior do que o controle. No grupo 45 aplicações de ultra-som não houve diferença estatística entre tratado e controle.

Na medida Zona Hipertrófica, no grupo 30 aplicações tratado foi maior do que o controle na 13ª. semana e, para 45 aplicações o grupo tratado foi maior que o controle na 26ª. semana.

Na medida Disco Epifisial, no grupo 30 aplicações, tratado foi maior que controle na 13ª semana e na 26ª semana e, para 45 aplicações tratado foi maior que controle na 18ª e na 26ª semanas.

As diferenças mostram efeito do tratamento, sugerindo haver estímulo ao aumento da altura individual das zonas do disco epifisial (e de seu todo) pelo ultra-som.

Não houve diferença entre os grupos tratados com 30 aplicações e com 45 aplicações.

5.2.5 Considerações finais

A aplicação do ultra-som, nas condições deste trabalho, foi realizada em animais jovens, durante período em que o animal está em franco crescimento e propício ao estudo de tratamentos que possam exercer influência sobre seu crescimento. Foi aplicado três ou quatro vezes por semana durante nove ou quatorze semanas, até a idade adulta do animal e os dados estatísticos mostram que o ultra-som, ainda que de modo não uniforme, tanto no grupo tratado com 30 aplicações quanto no grupo tratado com 45 aplicações de ultra-som, provocou aumento, estatisticamente relevante, em zonas do disco epifisial da tíbia (mas não do fêmur) entre os animais tratados e controles, mas isso não foi suficiente para alterar o comprimento ósseo e a largura das epífises, tanto do fêmur quanto da tíbia.

Os mecanismos de ação do ultra-som, sobre os tecidos não são bem conhecidos e, apesar dos avanços, esta afirmação está presente, na literatura, desde a publicação de Wells em 1970, até as de Leighton e de Haar ambos em 2007. Qual seria a razão, ou razões, que fazem com que o ultra-som tenha efeito positivo sobre a consolidação de fraturas, mas não no preenchimento de falhas ósseas em mandíbulas? Porque o ultra-som

influenciou a altura de diferentes zonas histológicas, bem como de toda a altura do disco epifisial, mas sem alterar o crescimento ósseo como mostrado neste experimento? Essas são perguntas para as quais não há ainda respostas satisfatórias.

Baseado, também, nas observações sobre as ondas em diversos meios, supõe-se e mesmo existe confirmações de ações do ultra-som nos tecidos biológicos, como o aquecimento, cavitação, aumento da permeabilidade da membrana celular, formação de micro bolhas pela cavitação, aumento da susceptibilidade de tumores à quimioterápicos, necrose tecidual, destruição óssea e articular, estímulo à consolidação óssea e, relatos não concordantes sobre o crescimento ósseo e o disco epifisial.

Wiltink et. al. (1995) aplicaram ultra-som pulsátil e contínuo, por sete dias, nas potências de 0,1, 0,33, 0,49, 0,55 e 0,77 W/cm² uma única vez, por um ou cinco minutos, na cartilagem epifisial de metatarsianos de fetos de camundongos (mantidos em meio de cultura) com 16 e 17 dias. Compararam o comprimento e a taxa de crescimento com o seu respectivo controle e entre as diferentes potências. Não encontraram diferenças entre tratado e controle ao aplicar ultra-som contínuo nas potências de 0,1 e 0,5 W/cm² por um minuto, embora concluíssem por tendência, no grupo tratado com 0,5 W/cm², a que o lado tratado tivesse uma taxa de crescimento longitudinal menor que o controle. Ao aplicarem ultra-som pulsátil na potência de 0,77 W/cm² encontraram aumento da taxa de crescimento do 4º ao 7º dia e aumento na altura da zona proliferativa, mas não da zona hipertrófica. Nas potências de 0,1, 0,33 e 0,49 W/cm² não encontraram nenhuma diferença estatística entre o grupo tratado e seu respectivo controle.

Spadaro e Albanese (1998), aplicando ultra-som pulsátil em ratos na potência de 0,03 W/cm², durante 20 minutos por dia e por quatro semanas, não encontraram diferenças no comprimento ósseo, entre lados tratado e controle.

Ogurtan et. al. (2002) estudaram a aplicação de ultra-som pulsátil nas potências de 0,2 e 0,5 W/cm² no rádio e ulna de coelhos, em aplicações diária por cinco minutos, durante 10, 15 e 20 dias. Não encontraram diferença entre tratado e controle para qualquer um dos seis grupos estudados. Ao compararem o grupo tratado de 0,5 W/cm² com o grupo tratado de 0,2 W/cm²

notaram aumento da taxa de crescimento dos animais e do tamanho da cartilagem epifisial, para o grupo de 10 dias e, diminuição para os grupos de 15 e 20 dias.

Lyon et. al. (2003) aplicaram, em coelhos, ultra-som pulsátil, nas potências de $0,5 \text{ W/cm}^2$ e $2,2 \text{ W/cm}^2$, diariamente, por 20 minutos, durante 42 dias. Tomaram medidas em três pontos distintos do disco epifisial distal do fêmur e proximal da tíbia e também dos comprimentos do fêmur e da tíbia. Compararam os resultados entre os dois grupos e entre cada grupo com os respectivos controles (joelho contralateral). Não encontraram, para todos os parâmetros, diferença entre tratados e seu controle e também nenhuma diferença entre as medidas de comprimento e largura entre os dois grupos tratados. Entretanto, notaram que disco epifisial dos animais do grupo de $2,2 \text{ W/cm}^2$ foi maior do que o dos animais do grupo $0,5 \text{ W/cm}^2$, tanto para o fêmur quanto para a tíbia.

Seinsheimer e Clement (1981), em estudo com coelhos, concluíram que tanto o número de células da camada proliferativa quanto o grau de mitose dessas células e a quantidade de matriz na zona hipertrófica guardam relação com a taxa de crescimento longitudinal do disco epifisial.

Rolian (2008), em trabalho com camundongos e gerbos (rato-canguru), concluiu que o ciclo de maturação da cartilagem epifisária é “conservadoramente” semelhante entre os vertebrados. Observou que, apesar de não haver uma total compreensão dos fatos, a diferença de crescimento longitudinal dos ossos, entre as espécies e também, entre ossos longos do indivíduo adulto dentro da mesma espécie, guarda relação mais significativa com o número de células da camada basal que com a dimensão das outras duas camadas.

Kortsjens et. al. (2004), sugeriram que o ultra-som não interfere com as células das zonas de repouso e de proliferação embora aumente o tamanho das zonas hipertróficas e de calcificação do disco epifisial.

Não há, na literatura e também neste estudo, evidências que o ultra-som provoque estímulo ao crescimento ósseo. Seja qual for o mecanismo de atuação ao estimular o calo de fratura, maior vascularização, aparente diminuição da dor e resposta inflamatória em tecidos moles, cicatrização de

úlceras de pele, o ultra-som provoca, apenas, como sugere Korstjens et. al. (2004), aumento da altura do disco epifisial e, este efeito não é suficiente, talvez por não interferir com as células da zona de cartilagem em repouso, para desencadear alterações consistentes no crescimento ósseo longitudinal.

O ultra-som, na prática clínica e em estudos experimentais, pode variar amplamente em todos os parâmetros que definem a sua aplicação ou prescrição de tratamento. Pode-se escolher inúmeras possibilidades para o tempo de cada aplicação, a frequência de emissão da onda ultra-sonora, a potência de emissão, o modo de emissão, se contínuo ou pulsátil e, dentro da emissão pulsátil, a frequência do pulso na unidade tempo e a relação “on-off” de pulso. Os estudos publicados utilizaram ampla variação nas prescrições de tratamento, mas existem ainda, possibilidades quase inesgotáveis nessas escolhas.

Nesta breve revisão, somente no estudo de Wiltink et. al. (1995) foi relatada a ocorrência de estímulo ao crescimento ósseo e, ainda por período determinado. Após o presente estudo considero, com reservas, a possibilidade de poder o ultra-som estimular o crescimento ósseo, por ação direta no disco epifisial, embora reconheça haver espaço, no conhecimento científico, para novas investigações.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Nas condições deste trabalho e no rato, não se observou efeito do ultra-som terapêutico contínuo, sobre o crescimento ósseo do fêmur e da tíbia.

REFERÊNCIAS

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

Abramovich A. Effect of ultrasound on the tibia of the young rat. *J Dental Res.* 1970;49:1182.

Azuma Y, Ito M, Harada Y, Takagi H, Ohta T, Jingushi S. Low-intensity pulsed ultrasound accelerates rat femoral fracture healing by acting on the various cellular reactions in the fracture callus. *J Bone Mineral Res.* 2001;16:671-80.

Bailey MR, Khokhlova VA, Saposhnikov OA, Kargl SG, Crum LA. Physical mechanism of the therapeutic effect of ultrasound (A review). *Acoustical Physics.* 2003;49:369-88.

Barnes LL, Sperling G, Mccay CM. Bone growth in normal and retarded growth rats. *J Gerontol.* 1947;2:240-3.

Barnett SB, Rott HD, Haar GR, Ziskin MC, Maeda K. The sensitivity of biological tissue to ultrasound. *Ultrasound Med Biol.* 1997;23:805-12.

Barnett SB, Ter Haar GR, Ziskin MC, Rott HD, Francis AD, Maeda K. International recommendations and guidelines for the safe use of diagnostic ultrasound in medicine. *Ultrasound Med Biol.* 2000;26:355-66.

Barreto AA. Efeitos do ultra-som terapêutico sobre a placa epifisária e o crescimento ósseo. Estudo experimental em ratos [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista; 1998.

Brighton CT, Ray RD, Soble LW, Kuettner KE. In vitro epiphyseal-plate growth in various oxygen tensions. *J Bone Joint Surg Am.* 1969;51:1383-96.

Brighton CT, Heppenstall RB. Oxygen tension in zones of the epiphyseal plate, the metaphysis and diaphysis. *J Bone Joint Surg Am.* 1971;51:719-28.

* International Committee of Medical Journal Editors. Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journal: sample references.[homepage on the Internet]. Bethesda: U.S. National Library of Medicine; 2003[last updated 2009 May 14]. Available from:http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html
National Library of Medicine. List of journals indexed in Index Medicus. Washington, 2003. 240p.

Brighton CT. Structure and function of the growth plate. Clin. Orthop. 1978;136:22-32.

Buchtala J, Viehweger G. Zur frage der ultraschallschädigung jugendlicher Knochen. Strahlentherapie. 1949;79:160-2.

Buchtala J. The present state of ultrasonic therapy. Br J Phys Med. 1952;15: 3-6.

Cambras RA, Puente JJJ, Perez HB, Angulo MAR, Concepcion TP. Limb Lengthening in Children. Orthopaedics. 1984;7:476-9.

Claes L, Willie B. The enhancement of bone regeneration by ultrasound. Progr Biophys Mol Biol. 2007;93:384-98.

Coakley WT. Biophysical effects of ultrasound at therapeutics intensities. Physioterapy. 1978;64:166-9.

De Forest RE, Herrick JF, James JM, Krusen FH. Effects of ultrasound on growing bone. Arch Phys Med Rehabil. 1953;34:21-31.

Duarte LR. The stimulation of bone growth by ultrasound. Acta Orthop Trauma Surg. 1983;101:153-9.

Dyson M, Pond JB. The effects of ultrasound on circulation. Physioterapy. 1973;59:284-7.

Emmami A, Petren MM, Larsson S. No effect of low-intensity ultrasound on healing time of intramedullary fixed tibial fractures. J Orthop. 1999;13:252-7.

Gebauer D, Correl J. Pulsed Low-Intensity Ultrasound: A New Salvage Procedure for Delayed Unions and Nonunions After Leg Lengthening in Children. J Pediatr Orthop. 2005;25:750-4.

Gebauer D, Mayer E, Orthner E. Nonunions treated by pulsed low-intensity ultrasound. J Orthop Trauma. 2000;14:154.

Goddard DH, Revell PA, Cason J, Gallagher S, Currey HLF. Ultrasound has no anti-inflammatory effect. *Ann Rheum Dis*. 1983;42:582-4.

Haar G. Therapeutic ultrasound. *Eur J Ultrasound*. 1999;9:3-9.

Haar G. Therapeutics applications of ultrasound. *Prog Biophys Mol Biol*. 2007;93:111-29.

Heckman JD, Ryaby JP, McCabe J, Frey JJ, Kilcoyne RF. Acceleration of tibial fracture-healing by non-invasive, low-intensity pulsed ultrasound. *J Bone Joint Surg*. 1994;76A:26-34.

Ilizarov GA. The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues. Part I. The influence of stability of fixation and soft-tissue preservation. *Clin Orthop Relat Res*. 1989a;238:249-81.

Ilizarov GA. The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues. Part II. The influence of the rate and frequency of distraction. *Clin Orthop Relat Res*. 1989b;239:263-85.

Ito S. Study on ultrasonic irradiation in orthopedic surgery. *Hirosaki Med J*. 1964;16:242-60.

Johnson RA, Wichern DW. *Applied multivariate statistical analysis*. 5th ed. New Jersey: Prentice-Hall; 2002. 5^a. ed. Prentice-Hall, New Jersey, p.767.

Junqueira LC, Carneiro J. Tecido ósseo. In: *Histologia básica*. 10^a-ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. Cap.8, p.136-53.

Kember NF. Comparative patterns of cell division in epiphyseal cartilage plates in the rat. *J Anat*. 1972;111:137-42.

Kember NF. Aspects of the maturation process in growth cartilage in the rat tibia. *Clin Orthop*. 1973;95:288-94.

Korstjens CM, Nolte PA, Burger EH, Albers GHR, Semeins CM, Aartman IHA, et al. Stimulation of bone cell differentiation by low - intensity ultrasound- a histomorphometric in vitro study. *J Orthop Res.* 2004;22:495-500.

Kramer JF. Ultrasound: evaluation of its mechanical and thermal effects. *Arch Phys Med Rehabil.* 1984;65:223-7.

Kristiansen TK, Ryaby JP, McCabe J, Frey JJ, Roe LR. Accelerate healing of distal fractures with use of specific, low-intensity ultrasound. *J Bone Joint Surg Am.* 1997;79:961-73.

Lehmann JF. The biophysical basis of biologic ultrasonic reactions with special reference to ultrasonic therapy. *Arch Phys Med Rehabil.* 1953;34:139-52.

Lehmann JF, Delauter BJ. Diatermia e terapia pelo calor e frio superficiais. In: Krusen: Tratado de Medicina Física e Reabilitação. 3ª ed. Rio de Janeiro: Manole; 1994. Cap.13, p.281-359.

Lehmann JF, Delateur BJ, Stonebridge JB, Warren CG. Therapeutic temperature distribution produced by ultrasound as modified by dosage and volume of tissue exposed. *Arch Phys Med Rehabil.* 1967a;48:662-6.

Lehmann JF, Delateur BJ, Warren CG, Stonebridge JB. Heating produced by ultrasound in bone and soft tissue. *Arch Phys Med Rehabil.* 1967b;48:397-401.

Leighton TG. What is ultrasound?. *Prog Biophys Mol Biol.* 2007;93:3-83.

Lerner A, Stein H, Soudry M. Compound high-energy limb fractures with delayed union: our experience with adjuvant ultrasound stimulation (exogen). *Ultrasonics.* 2004;42:915-7.

Leung KS, Lee WS, Tsui HF, Liu PPL, Cheung WH. Compound tibial fracture outcomes following treatment with low-intensity pulsed ultrasound. *Ultrasound Med Biol.* 2004;30:389-95.

Lyon R, Liu XC, Meier J. The effects of therapeutic vs. high-intensity ultrasound on the rabbit growth plate. *J Orthop Res.* 2003;21:865-71.

Malizos KN, Hantes ME, Protopappas AP. Low intensity pulsed ultrasound for bone healing: An overview. *Injury*. 2006;37:S56-62.

Mayr E, Frankel V, Rüter A. Ultrasound – an alternative healing method for nonunions?. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2000;120:1-8.

Nelson PA, Herrick JF, Krusen FH. Temperatures produced in bone marrow, bone and adjacent tissues by ultrasonic diathermy. *Arch Phys Med Rehabil*. 1950;31:687-95.

Ogurtan Z, Celik I, Izci C, Boydak M, Alkan F, Yilmaz K. Effect of experimental therapeutic ultrasound on the distal antebrachial growth plates in one-month-old rabbits. *Vet J*. 2002;164:280-7.

Protopappas VC, Baga DA, Fotiadis DI, Likas AC, Papachristos AA, Malizos KN. An ultrasound wearable system for the monitoring and acceleration of fracture healing in long bones. *IEEE Trans Biomed Eng*. 2005;52:1597-608.

Reher P, Elbeshir EI, Harvey W, Meghji S, Harris M. The stimulation of bone formation *in vitro* by therapeutic ultrasound. *Ultrasound Med Biol*. 1997;23:1251-58.

Robertson VJ. Dosage and treatment response in randomized clinical trials of therapeutic ultrasound. *Phys Ther Sport*. 2002;3:124-33.

Rolian C. Developmental basis of limb length in rodents: evidence for multiple divisions of labor in mechanisms of endochondral bone growth. *Evol Dev*. 2008;10:15-28.

Rubin C, Bolander M, Ryaby BS, Hadjiargirou M. The use of low-intensity ultrasound to accelerate the healing of fractures. *J Bone Joint Surg Am*. 2001;83:259-70.

Schenk RK, Eiener J, Spiro D. Fine structural aspects of vascular invasion of the tibial epiphyseal plate of growing rats. *Acta Anat*. 1968;69:1-17.

Sharma M, Mackenzie WG, Bowen JR. Severe Tibial Growth retardation in total fibular hemimelia after limb lengthening. J Pediatr Orthop. 1996;16:438-44.

Seinsheimer F, Clement BS. Parameters of longitudinal growth rate in rabbit epiphyseal growth plates. J Bone Joint Surg Am. 1981;63:627-30.

Siska PA, Gary S, Gruen GS, Pape HC. External adjuncts to enhance fracture healing: What is the role of ultrasound?. Injury. 2008;39:1095-1105.

Spadaro JA, Albanese AA. Application of low-intensity ultrasound to growing bone in rats. Ultrasound Med Biol. 1998;24:567-73.

Stein H, Lerner A. How does pulsed low-intensity ultrasound enhance fracture healing?. Orthopedics. 2005;28:1161-3.

Steinberg ME, Trueta J. Effects of activity on bone growth and development in the rat. Clin Orthop Relat Res. 1981;156:52-60.

Tarantal AF, Gargosky SE, Ellis DS, O'Brien Jr WD, Hendrickx AG. Hematologic and growth-related effects of frequent prenatal ultrasound exposure in the long-tailed macaque (*macaca fascicularis*). Ultrasound Med Biol. 1995;21:1073-81.

Taylor JF, Warrell E, Evans RA. Response of the growth plates to tibial osteotomy in rats. J Bone Joint Surg Br. 1987;69:664-9.

Uchida T, Ohkusa H, Nagata Y, Hyodo T, Satoh T, Irie A. Treatment of localized prostate câncer using high-intensity focused ultrasound. BJU Int. 2006;97:56-61.

Xavier CAM, Duarte LR. Estimulação ultra-sônica do calo ósseo. Rev Bras Orthop. 1983;18:73-80.

Wagner H. Operative lengthening of the femur. Clin Orthop Relat Res. 1978;136:125-42.

Warden SJ. A new direction of ultrasound therapy in sports medicine. *Sports Med.* 2003;33:95-107.

Warrell E, Taylor JF. The role of periosteal tension in the growth of long bones. *J Anat.* 1979;128:179-84.

Wells PNT. Ultrasonics in medicine and biology. *Phys Med Biol.* 1977;22:629-69.

Wiltink A, Nijweide PJ, Oosterbaan WA, Hekkemberg RT, Helders PJM. Effect of therapeutic ultrasound on endochondral ossification. *Ultrasound Med Biol.* 1995;21:121-7.

Zar JH. *Biostatistical analysis.* 4th. ed. New Jersey: Prentice Hall;1999.