

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**EFEITO DA APLICAÇÃO DE ONDAS DE CHOQUE
EXTRACORPÓREAS NA PLACA EPIFISÁRIA DA
TÍBIA DE COELHOS**

ELISA HOLTHAUSEN CAMINOTO

BOTUCATU - SP

Abril 2007

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**EFEITO DA APLICAÇÃO DE ONDAS DE CHOQUE
EXTRACORPÓREAS NA PLACA EPIFISÁRIA DA
TÍBIA DE COELHOS**

ELISA HOLTHAUSEN CAMINOTO

Tese apresentada junto ao Programa de
Pós-Graduação em Medicina Veterinária
para a obtenção do título de Doutor

Orientadora: Profa. Dra. Ana Liz Garcia
Alves

BOTUCATU – SP

Abril 2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Caminoto, Elisa Holthausen.

Efeito da aplicação de ondas de choque extracorpóreas na placa epifisária da tíbia de coelhos / Elisa Holthausen Caminoto. – Botucatu [s.n.], 2007.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2007.

Orientador: Ana Liz Garcia Alves

Assunto CAPES: 50501070

1. Ortopedia veterinária - Cirurgia 2. Tíbia - Cirurgia 3. Coelho - Cirurgia 4. Densitometria

CDD 636.08973

Palavras-chave: Coelhos; Densitometria; Ondas de choque; Placa epifisária; TGF- β

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

Nome do Autor: Elisa Holthausen Caminoto

Data: 26 de abril de 2007

Constituição da Comissão Examinadora:

Profa. Dra. ANA LIZ GARCIA ALVES

Prof. Dr. LUIS CARLOS VULCANO

Profa. Dra. VÂNIA MARIA DE VASCONCELOS MACHADO

Prof. Dr. STEFANO CARLO FILIPPO HAGEN

Profa. Dra. DEBORA APARECIDA PIRES DE CAMPOS ZUCCARI

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao Guilherme, meu marido e companheiro de todas as horas, à minha filha Vitória, que veio para dar novo sentido à tudo, aos meus pais Edson e Vera e aos meus irmãos Ricardo e Felipe, por todo o apoio e paciência, que permitiram a realização de mais esta etapa da minha formação.

AGRADECIMENTOS

A todos que foram importantes para o desenvolvimento deste trabalho.

À Professora Doutora ANA LIZ GARCIA ALVES, minha orientadora, pela confiança, apoio e amizade.

Aos professores e colegas do curso de Pós Graduação em Cirurgia Veterinária, pelos momentos compartilhados.

Aos residentes, estagiários e funcionários dos Departamentos de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária e de Diagnóstico por Imagem, pela amizade e auxílio na realização dos trabalhos práticos.

Ao Professor Doutor LUIS CARLOS VULCANO, pela paciência e apoio.

À Professora Doutora VÂNIA MARIA DE VASCONCELOS MACHADO, pelo apoio e auxílio.

Ao Doutor PAULO TEIXEIRA, e a todos os funcionários do Biotério Central da UNESP - Campus de Botucatu, pelo auxílio com os animais.

Ao Professor Mestre ALTAMIR DOS SANTOS, pela disponibilidade de seu equipamento de DXA e por acreditar em nossa pesquisa.

À Professora Doutora DEBORA PIRES DE CAMPOS ZUCCARI pela amizade, incentivo e auxílio.

Aos docentes e funcionários do Laboratório de Histotécnica e de Biologia Molecular da FAMERP - São José do Rio Preto, pelo auxílio na manipulação do material.

A MARIA LUIZA DE AVELLAR CORDEIRO CAMINOTO, pelo apoio, incentivo e cuidado de vó para a Vitória.

A ANOR E MARIA DE LOURDES CORDEIRO, pelo apoio e incentivo.

Aos demais professores, amigos e colegas que contribuíram para que esta pesquisa fosse realizada, os mais sinceros agradecimentos.

“Para ser grande, sê inteiro:

Nada teu exagera ou exclui.

Sê todo em cada coisa.

Põe quanto és

No mínimo que fazes”

Ricardo Reis (Fernando Pessoa)

RESUMO

CAMINOTO, E. H. **Efeito da aplicação de ondas de choque extracorpóreas na placa epifisária da tíbia de coelhos**. Botucatu, 2007, 97p. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”.

Este estudo teve por objetivo analisar os efeitos da aplicação de ondas de choque extracorpóreas na placa epifisária proximal da tíbia em coelhos. Foram utilizados 10 coelhos jovens, submetidos a três aplicações de 1500 pulsos de ondas de choque, com intervalo de duas semanas, sobre a epífise proximal da tíbia direita, padronizando a esquerda como controle. As avaliações foram feitas por meio de radiografias, para verificar as alterações na densitometria óptica óssea. Ao final do experimento foi feita a absorciometria de energia dupla de Raios-x (DXA) e eutanásia para a colheita de material para histopatologia e imuno-histoquímica para TGF- β , possibilitando a comparação entre os membros tratados e os membros controle. As ondas de choque extracorpóreas causaram um aumento na espessura da placa de crescimento epifisária, tanto na espessura total, quanto na espessura das zonas proliferativa e hipertrófica, uma diminuição do comprimento das tíbias tratadas, em relação ao controle, e o aumento de densidade mineral óssea, ao utilizar a avaliação por meio da densitometria óptica em imagem radiográfica.

Palavras-chave: Placa Epifisária; Coelhos; Ondas de choque; Densitometria; TGF- β

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effects of the extracorporeal shock wave therapy on the tibial proximal epiphyseal growth plate in young rabbits. Ten rabbits were submitted to extracorporeal shock wave therapy in the right tibial proximal epiphyseal growth plate, three treatments, with interval of two weeks. The left hind limb was untreated as control. The evaluations were done through x-rays and optical densitometry, and at the end of the study dual energy x-ray absorptiometry evaluation, histopathology and immunohistochemistry evaluation for TGF- β were done. Extracorporeal shock wave therapy caused increased height of the epyphiseal growth plate, reduction on tibial total length and increased bone mineral density evaluated through optcal radiographic densitometry in mmAl.

Key words: Growth plate; Rabbit; ESWT; Shock waves; Densitometry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Aparência histológica da placa de crescimento epifisária de coelho. Coloração Tricrômio de Masson, 200x.....	20
Figura 2 - Equipamento de ondas de choque extracorpóreas.....	37
Figura 3 - Sonda R05.....	37
Figura 4 - Local de aplicação das ondas de choque extracorpóreas.....	37
Figura 5 - Imagem radiográfica durante o experimento.....	39
Figura 6 - Penetrômetro de Alumínio (<i>Phantom</i>).....	40
Figura 7 - Porta-chassi c/ penetrômetro de Alumínio.....	40
Figura 8 - Telas do programa computacional utilizado na avaliação da densitometria óptica em imagem radiográfica.....	41
Figura 9 - Tela do programa computacional utilizado na avaliação da espessura da placa de crescimento.....	43
Figura 10 - Idade em dias e média de peso em kg dos animais durante o experimento.....	46
Figura 11 - Valores do comprimento das tíbias nas imagens radiográficas no início do experimento (semana 0) e ao final do experimento (semana 9), em cm, nos membros tratados (A) e controle (B).....	49
Figura 12 - Valores médios e desvio padrão da densitometria óptica em imagem radiográfica no início do experimento (semana 0), a cada aplicação das ondas de choque extracorpóreas (semanas 1, 3 e 5) e ao final do experimento (semana 9), em mmAl, nos membros tratado (A) e controle (B).....	51
Figura 13 - Resultado da densitometria óptica em imagem radiográfica do coelho 1, tíbia tratada, em mmAl (círculo) na última avaliação (semana 9).....	51
Figura 14 - Valores da DXA ao final do experimento (semana 9), em g/cm ² , nos membros tratados (A) e controle (B).....	53
Figura 15 - Resultado da avaliação da DXA do animal número 4.....	53
Figura 16 - Fotomicrografias de uma secção vertical da placa de crescimento proximal da tíbia, com magnificação de 200x.....	54

Figura 17 - Mensuração média da espessura total da placa de crescimento e das zonas proliferativa e hipertrófica ao final do experimento (semana 9) em mm para os grupos tratado e controle.....	55
Figura 18 - Fotomicrografias do procedimento imuno-histoquímico para TGF- β de uma secção vertical da placa de crescimento proximal da tíbia, com magnificação de 200x.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Idade em dias e média de peso em kg dos animais durante o experimento.....	46
Tabela 2 - Valores do comprimento das tíbias nas imagens radiográficas no início do experimento (semana 0), a cada aplicação das ondas de choque extracorpóreas (semanas 1, 3 e 5) e ao final do experimento (semana 9), em cm, nos membros tratados (A) e controle (B).....	48
Tabela 3 - Valores médios e desvio padrão da densitometria óptica em imagem radiográfica no início do experimento (semana 0), a cada aplicação das ondas de choque extracorpóreas (semanas 1, 3 e 5) e ao final do experimento (semana 9), em mmAl, nos membros tratados (A) e controle (B).....	50
Tabela 4 - Valores da DXA ao final do experimento (semana 9), em g/cm ² , nos membros tratados (A) e controle (B).....	52
Tabela 5 - Espessura total média, da zona proliferativa e da zona hipertrófica da placa de crescimento em mm no final do experimento (semana 9)	56
Tabela 6 - Valores médios e desvio padrão da densitometria óptica em imagem radiográfica no início do experimento (semana 0), a cada aplicação das ondas de choque extracorpóreas (semanas 1, 3 e 5) e ao final do experimento (semana 9), em mmAl, nos membros tratados (A) e controle (B).....	88
Tabela 7 - Cálculos do teste t de Student para amostras pareadas - Valores médios da densitometria óptica em imagem radiográfica no início do experimento (semana 0).....	89
Tabela 8 - Cálculos do teste t de Student para amostras pareadas - Valores médios da densitometria óptica em imagem radiográfica antes da primeira aplicação de ondas de choque extracorpóreas na primeira semana do experimento (Semana 1).....	89
Tabela 9 - Cálculos do teste t de Student para amostras pareadas - Valores médios da densitometria óptica em imagem radiográfica antes da segunda aplicação de ondas de choque extracorpóreas na terceira semana do experimento (Semana 3).....	90
Tabela 10 - Cálculos do teste t de Student para amostras pareadas - Valores médios da densitometria óptica em imagem radiográfica antes da terceira aplicação de ondas de choque extracorpóreas na quinta semana do experimento (Semana 5).....	90

Tabela 11 - Cálculos do teste t de Student para amostras pareadas - Valores médios da densitometria óptica em imagem radiográfica ao final do experimento, na nona semana (Semana 9).....	91
Tabela 12 - Cálculos do teste t de Student para amostras pareadas - Valores médios da DXA ao final do experimento, na nona semana (Semana 9)..	91
Tabela 13 - Cálculos do teste t de Student para amostras pareadas – Valores do comprimento em centímetros das tíbias nas imagens radiográficas no início do experimento (semana 0).....	92
Tabela 14 - Cálculos do teste t de Student para amostras pareadas – Valores do comprimento em centímetros das tíbias nas imagens radiográficas antes da primeira aplicação de ondas de choque extracorpóreas na primeira semana do experimento (Semana 1).....	92
Tabela 15 - Cálculos do teste t de Student para amostras pareadas – Valores do comprimento em centímetros das tíbias nas imagens radiográficas antes da segunda aplicação de ondas de choque extracorpóreas na terceira semana do experimento (Semana 3).....	93
Tabela 16 - Cálculos do teste t de Student para amostras pareadas – Valores do comprimento em centímetros das tíbias nas imagens radiográficas antes da terceira aplicação de ondas de choque extracorpóreas na quinta semana do experimento (Semana 5).....	93
Tabela 17 - Cálculos do teste t de Student para amostras pareadas – Valores do comprimento em centímetros das tíbias nas imagens radiográficas ao final do experimento, na nona semana (Semana 9).....	94
Tabela 18 - Cálculo do percentual de inibição do crescimento no final do experimento (semana 9), pela fórmula descrita por Ross & Zionts (1997).....	94
Tabela 19 - Cálculos do teste t de Student para amostras pareadas – Valores da espessura total média da placa de crescimento em mm no final do experimento (semana 9).....	95
Tabela 20 - Cálculos do teste t de Student para amostras pareadas – Valores da espessura da zona proliferativa da placa de crescimento em mm no final do experimento (semana 9).....	95
Tabela 21 - Cálculos do teste t de Student para amostras pareadas – Valores da espessura da zona hipertrófica da placa de crescimento em mm no final do experimento (semana 9).....	96
Tabela 22 - Valores da espessura total média, da zona proliferativa e da zona hipertrófica da placa de crescimento em mm no final do experimento (semana 9).....	97

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

cm - centímetro

cm² - centímetro quadrado

CMO – conteúdo mineral ósseo

DMO - densidade mineral óssea

DXA - absorciometria de energia dupla de Raios-X

FGF - fator de crescimento fibroblástico

g – grama

IGF - fator de crescimento semelhante à insulina

kg - quilograma

kV – kilovoltagem

kVp – pico de kilovoltagem

mAs – miliamperagem por segundo

mJ - milijoule

mm - milímetro

mm² - milímetro quadrado

mmAl – milímetro de alumínio

MPa – megapascal

P – nível crítico amostral

ppp – ponto por polegada

PTHrP - peptídeo relacionado ao hormônio da paratireóide

t – teste t de Student

TGF-β - fator de crescimento transformador beta

TGF-β1 - fator de crescimento transformador beta 1

TOC - terapia por ondas de choque extracorpóreas

VEGF - fator de crescimento vascular endotelial

% - porcentagem

μm – micrômetro

β - beta

≤ - menor ou igual

SUMÁRIO

Página

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	17
1.1. Considerações gerais.....	17
1.2. Placa de crescimento epifisária.....	19
1.3. Terapia por ondas de choque extracorpóreas.....	22
1.4. Métodos de avaliação do efeito das ondas de choque extracorpóreas..	27
1.4.1. Avaliação radiográfica.....	27
1.4.2. Densitometria óptica em imagem radiográfica.....	28
1.4.3. Absorciometria de energia dupla de raios-X (DXA).....	29
1.4.4. Imuno-histoquímica.....	31
2. OBJETIVO.....	34
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1. Animais experimentais.....	35
3.2. Terapia por ondas de choque extracorpóreas.....	35
3.3. Avaliação clínica.....	37
3.4. Avaliação radiográfica.....	38
3.5. Densitometria óptica em imagem radiográfica.....	39
3.6. Absorciometria de energia dupla de raios-X (DXA).....	42
3.7. Avaliação histopatológica.....	42
3.8. Avaliação imuno-histoquímica.....	44
3.9. Eutanásia.....	44
3.10. Avaliação estatística.....	45
4. RESULTADOS.....	46
4.1. Avaliação clínica.....	46
4.2. Avaliação radiográfica.....	47
4.3. Densitometria óptica em imagem radiográfica.....	49
4.4. Absorciometria de energia dupla de raios-X (DXA).....	52
4.5. Avaliação histopatológica.....	54
4.6. Avaliação imuno-histoquímica.....	57
5. DISCUSSÃO.....	58
6. CONCLUSÕES.....	68

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
8. TRABALHO CIENTÍFICO.....	77
9. APÊNDICE.....	88

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

O crescimento dos ossos longos é o resultado de uma série de processos biológicos precisamente orquestrados e rigorosamente regulados, denominado ossificação endocondral, envolvendo a proliferação e diferenciação dos condrócitos, que culmina na formação de uma matriz cartilaginosa calcificada, subsequentemente reabsorvida e substituída por osso lamelar. A regulação desses eventos celulares ocorre através da integração de sinais, tanto de hormônios sistêmicos, como de fatores de crescimento produzidos no local, transmitidos ao núcleo e convertidos em alterações na expressão gênica. A elucidação dos processos celulares e moleculares que regulam a ossificação endocondral na placa de crescimento é um passo obrigatório no planejamento de estratégias racionais de tratamento da miríade de alterações do desenvolvimento, genéticas e traumáticas que ocorrem na placa de crescimento de crianças ou animais imaturos (Ballock & O'Keefe, 2003).

Embora as investigações sobre a natureza do crescimento ósseo tenham começado há 250 anos, a compreensão dos mecanismos do crescimento começou nos últimos trinta anos, através do desenvolvimento de novas tecnologias de investigação biológica e várias questões ainda permanecem sem resposta (Robertson Jr., 1990).

Deformidades angulares são os desvios laterais ou mediais do eixo longo do membro em um plano sagital e são descritas de acordo com a articulação envolvida como ponto central e com a direção da extremidade do membro distal ao desvio. Diversos fatores etiológicos pré-natais e pós-natais podem estar envolvidos. As deformidades angulares dos membros ocorrem com frequência nos eqüinos e em outros mamíferos, incluindo o ser humano (Mitten & Bertone, 1994; Ross & Zions, 1997; Greet, 2000; Raab et al., 2001; Stashak, 2001).

Sob uma perspectiva clínica, para a correção de uma deformidade angular, o objetivo deve ser a alteração da taxa de crescimento dentro de uma

única placa de crescimento (Lerner & Kuhn, 1997). A progressão de uma deformidade esquelética pós-natal pode ser associada com o crescimento endocondral modulado mecanicamente. Acredita-se que as deformidades angulares produzam distribuição assimétrica de forças sobre a placa de crescimento, causando crescimento assimétrico em um ciclo contínuo (Stokes et al., 2006).

O tratamento é indicado se o grau de deformidade for severo, ou se houver o agravamento do quadro. O tratamento para as deformidades angulares inclui procedimentos clínicos e cirúrgicos. Os procedimentos cirúrgicos incluem o retardamento do crescimento através de fixação da placa de crescimento, ou o estímulo do crescimento através da transecção e elevação do periósteo, e os procedimentos clínicos incluem a redução da movimentação, o ajuste dietético e a correção do apoio ao solo (Bertone et al., 1985; Mitten & Bertone, 1994; Slone et al., 2000; Raab et al., 2001; Stashak, 2001; Read et al., 2002).

A terapia por ondas de choque extracorpóreas (TOC) é uma tecnologia emergente, e a maioria dos estudos encontrados na literatura se baseia na avaliação de resultados retrospectivos em medicina humana. Podemos sustentar os efeitos biológicos das ondas de choque em relatos de sua utilização experimental em animais, como nos estudos de Yeaman et al. (1989); Van Arsdalen et al. (1991), Kaulesar Sukul et al. (1993); Lüssenhop et al. (1997), Rompe et al. (1998); Väterlein et al., (2000), Takahashi et al. (2001), Caminoto et al. (2005) e de Giusti et al. (2005).

A terapia por ondas de choque extracorpóreas (TOC) pode ser uma nova forma de tratamento para as deformidades angulares em eqüinos, segundo Bathe et al. (2006), que com ondas de choque radiais, trataram as deformidades angulares de 17 animais, com 88% de melhora, utilizando as ondas de choque para retardar o crescimento, sem a necessidade de tratamento cirúrgico. Não foi pesquisada a dose adequada para alcançar a modulação da placa epifisária, e foi citada a necessidade de novas pesquisas para a validação da sua utilização clínica.

1.2. PLACA DE CRESCIMENTO EPIFISÁRIA

O crescimento longitudinal do osso ocorre na região da placa de crescimento epifisária, por meio de um processo denominado ossificação endocondral (Speer, 1989). A taxa de crescimento longitudinal é regulada por diversos fatores endócrinos, como o hormônio de crescimento, hormônios tireoidianos, glicocorticóides e esteróides sexuais. Além disso, o processo de proliferação, diferenciação celular, angiogênese e ossificação também é regulado localmente por fatores de crescimento como o peptídeo relacionado ao hormônio da paratireóide (PTHrP), fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), fator de crescimento transformador beta (TGF- β) e fator de crescimento fibroblástico (FGF), resultando em alterações na expressão gênica dos condrócitos da placa de crescimento (Ballock & O'Keefe, 2003).

Estes eventos moleculares levam à alterações no tamanho dos condrócitos, composição da matriz extracelular, secreção de enzimas e fatores de crescimento e expressão de receptores. As fases importantes destes eventos são a calcificação da matriz, a apoptose dos condrócitos e a finalização da formação óssea endocondral (Van Der Eerden et al., 2003). Neste processo, os centros de ossificação se desenvolvem no centro do futuro osso longo (diáfise) e nas suas extremidades (epífises), a partir da placa de crescimento epifisária que existe entre eles (Banks, 1992).

A placa de crescimento epifisária pode ser dividida em uma série de regiões anatômicas que se diferenciam por estágios morfológicos e bioquímicos únicos, durante o processo da diferenciação dos condrócitos. A progressão dos condrócitos através dos estágios de repouso, proliferação e hipertrofia, que culmina na calcificação da matriz e morte celular ocorre em vinte e quatro horas em animais de laboratório (Anderson, 1989; Speer, 1989).

Por convenção, podemos definir três zonas principais, de acordo com os fenômenos celulares que ocorrem: na zona de repouso, a relação entre matriz extracelular e volume celular é alta, e os condrócitos pequenos e arredondados se encontram dispersos em um padrão irregular, produzindo matriz extracelular e com baixa taxa de mitose. Na zona proliferativa, os condrócitos assumem uma aparência achatada, se dividem, e se tornam organizados em colunas.

Com a maturação, a síntese de matriz extracelular permite que as células recém divididas se separem umas das outras. Na zona hipertrófica, a divisão celular cessa e os condrócitos começam sua diferenciação terminal, que é associada a um grande aumento no volume celular, no sentido longitudinal, contribuindo para o crescimento do osso. O metabolismo celular se torna predominantemente anaeróbio, e ocorre a presença de cálcio, fósforo e fosfatase alcalina nas vesículas de matriz, necessários para este processo de calcificação (Anderson, 1989; Speer, 1989; Robertson Jr., 1990, Braden, 1993) (Figura 1).

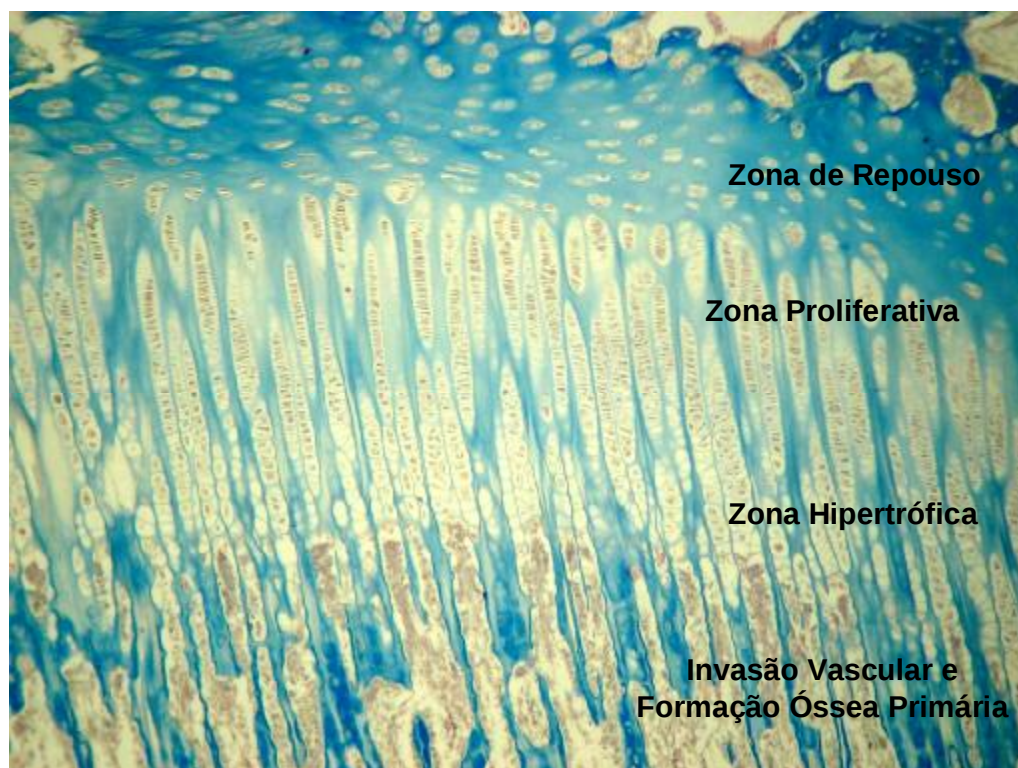


FIGURA 1 - Aparência histológica da placa de crescimento epifisária de coelho. Coloração Tricrômio de Masson, 200x.

A matriz extracelular cartilaginosa consiste basicamente de colágeno, principalmente do tipo II e X, de proteoglicanos, como o agregan, e de outras proteínas não-colagenosas. (Robertson Jr., 1990; Ballock & O'Keefe, 2003).

As vesículas de matriz são os primeiros locais para a deposição de núcleos de hidroxapatita de cálcio, que servem como ponto inicial para a

mineralização, como um septo longitudinal de matriz calcificada entre as colunas de condrócitos hipertróficos (Anderson, 1989).

Na região da invasão vascular, capilares provenientes da metáfise atravessam o último septo transversal de cartilagem mineralizada para entrar na lacuna do condrócito hipertrófico. Aproximadamente dois terços do septo longitudinal são ativamente reabsorvidos por condroclastos, enquanto que o terço remanescente serve como modelo para a deposição de matriz óssea pelos osteoblastos. Esta região contendo tanto cartilagem mineralizada como matriz óssea é conhecida como trabécula primária, e é subsequentemente remodelada na metáfise em trabécula de osso lamelar ou trabécula secundária (Speer, 1989; Braden, 1993).

A proliferação celular ocorre sob o controle de um processo de autorregulação envolvendo três moléculas sinalizadoras sintetizadas pelos condrócitos da placa de crescimento: o PTHrP, a proteína *Indian Hedgehog* (Ihh), e o TGF- β . *In vitro*, o TGF- β é um potente inibidor da maturação, incluindo a hipertrofia celular, a expressão de colágeno tipo X e a atividade da fosfatase alcalina. O TGF- β é secretado pelos condrócitos em uma forma inativa ligada a uma molécula de latência, ressaltando a importância da definição dos fatores de ativação do TGF- β na placa de crescimento, entre eles metaloproteinases da matriz, outras proteases e condições ácidas como durante a reabsorção óssea osteoclástica (Ballock & O'Keefe, 2003; Van Der Eerden et al., 2003).

O crescimento endocondral da placa epifisária depende da combinação da quantidade e da taxa de proliferação dos condrócitos da zona proliferativa e da taxa de hipertrofia e síntese de matriz da zona hipertrófica (Stokes, 2006).

Na medida em que o esqueleto se aproxima da maturidade, a taxa de crescimento longitudinal do osso diminui, e a proliferação dos condrócitos da placa de crescimento é reduzida. Esta diminuição no crescimento é associada a alterações estruturais na fise, incluindo um declínio gradual da espessura da placa de crescimento devido à redução na altura das zonas proliferativa e hipertrófica, assim como redução no tamanho e densidade das colunas das células hipertróficas. Nos humanos e em outros mamíferos, a placa de crescimento é completamente reabsorvida após a puberdade, resultando em

fusão da epífise à metáfise. Este processo de fechamento fisário ocorre sob controle do estrógeno, tanto nos machos como em fêmeas, por mecanismos ainda não esclarecidos. Uma vez que o potencial proliferativo das células da placa de crescimento cessa, a fusão epifisária pode ocorrer espontaneamente (Ballock & O'Keefe, 2003).

1.3. TERAPIA POR ONDAS DE CHOQUE EXTRACORPÓREAS

Em medicina humana, a litotripsia extracorpórea por ondas de choque é um procedimento terapêutico de efeito comprovado para o tratamento de cálculos renais. Nos últimos anos, a terapia por ondas de choque extracorpóreas (TOC) tem sido utilizada para enfermidades ortopédicas em medicina, principalmente nas tendinites e desmites de inserção crônicas, refratárias a outras terapias convencionais (Haupt, 1997), como a epicondilite úmero-radial (Rompe et al., 1997), a tendinose calcárea (Haupt, 1997), e o esporão de calcâneo (Krischek et al., 1998; Cosentino et al., 2001), com efeito analgésico clinicamente significativo (Cosentino et al., 2001).

Em medicina veterinária, destacadamente em eqüinos, esta terapia vem sendo utilizada para o tratamento de diversas enfermidades ortopédicas (Brems et al., 1999; Bär et al., 2000; Caminoto et al., 2003; Caminoto et al., 2005).

Uma onda de choque é uma onda de pressão caracterizada por uma alta pressão de pico, com curta duração do pulso, seguida por uma rápida descompressão, até a pressão negativa. As ondas de choque podem ser geradas de várias formas, como a partir de efeito eletro hidráulico, piezo elétrico, eletromagnético ou energia pneumática que, neste caso, gera as ondas de pressão radiais. O sistema eletro hidráulico (*Spark Gap*) utiliza um eletrodo submerso em um compartimento com um refletor elipsóide. Uma faísca elétrica é gerada entre as extremidades desse eletrodo, onde ocorre a vaporização das moléculas de água, gerando uma onda de choque esférica, refletida pelo elipsóide metálico da parede interna para o tecido alvo (Ogden & Kischkat, 2001).

Os parâmetros físicos mais importantes para o tratamento de enfermidades ortopédicas através das ondas de choque são a distribuição da pressão, a densidade energética e a energia acústica total (Haupt 1997; Ogden & Kischkat, 2001). As ações das ondas de choque sobre os tecidos foram postuladas por Haupt (1997), e incluem cavitações extracelulares, ionização de moléculas e aumento da permeabilidade de membranas, que são efeitos diretos das ondas de choque. Na fase subsequente, ocorre a difusão de radicais e interações com biomoléculas, e em seguida ocorrem as reações intracelulares e alterações moleculares. Muitas das interações teciduais ainda não estão completamente esclarecidas. Ogden & Kischkat (2001) presumem que nos tecidos moles ocorra a micro-ruptura do tecido denso fibrótico pouco vascularizado, possibilitando o desenvolvimento micro vascular inicial, seguido pela reparação tecidual adequada. O efeito osteogênico foi demonstrado na maioria dos estudos (Valchanou & Michailov, 1991; Delius et al., 1995; Haupt, 1997; Siebert & Buch, 1997; Rompe et al., 1998; Ikeda et al., 1999; Mc Clure et al., 2001; Ogden & Kischkat, 2001; Takahashi et al., 2001).

Os efeitos biológicos das ondas de choque são dependentes da dose utilizada (Kaulesar Sukul et al., 1993; Rompe et al., 1997), como o efeito de destruição celular em células em suspensão “in vitro”, e a influência estimulante no processo de cicatrização de tecidos lesados.

Wang et al (2002) relataram o efeito das ondas de choque na promoção seletiva do crescimento de células osteoprogenitoras da medula óssea, em diferentes doses, com efeito estimulante em doses mais baixas, e efeito inibitório em doses mais altas.

Martini et al. (2003) compararam três níveis energéticos em cultura de células osteoblásticas, e relataram aumento nos níveis de óxido nítrico, osteocalcina e TGF- β , além do aumento da diferenciação celular quando a aplicação foi feita com a dose de 0,15 mJ/mm² ou 14 kV. No grupo de 0,40 mJ/mm² ou 28 kV, entretanto, a viabilidade das células foi reduzida, comprovando a dependência da dose para os efeitos biológicos nos tecidos e células e sua efetividade no crescimento ósseo através da diferenciação de células da medula óssea em osteoblastos e da indução do TGF- β .

Chen et al. (2001) e Wang et al. (2000; 2002) consideram que a promoção da osteogênese pelas ondas de choque ocorre via aumento dos

osteocodróitos e proliferação dos osteoblastos associada à indução do fator de crescimento transformador beta 1 (TGF- β 1) e expressões protéicas relacionadas ao osso. O TGF- β 1 e seu receptor têm sido comprovadamente demonstrados durante a reparação óssea (Eingartner et al., 1999).

Wang et al. (2000) em um estudo com fratura de fêmur utilizaram a dose de 0,06 mJ/mm², com um número de pulsos variando de 250 a 1000. Este mesmo grupo de pesquisadores, no seu estudo de 2002 sugere uma dose de 0,16 mJ/mm², com variação do número de pulsos entre 250 e 2000 (Wang et al., 2002). Em ambos os estudos foram observados efeitos positivos das ondas de choque sobre a concentração de fatores de crescimento, entre eles o TGF- β 1, que tem um efeito quimiotático e mitogênico nas células osteoblásticas.

Kurzweil et al. (1988) avaliaram o peso corporal, o comprimento do fêmur e do rim, e o diâmetro acetabular de coelhos desmamados submetidos à aplicação de 1000 pulsos com dose de 18 kV, sem efeito no crescimento das estruturas anatômicas ou no fechamento da placa epifisária.

Yeaman et al. (1989) pesquisaram o efeito das ondas de choque na placa epifisária de ratos, utilizando 1500 pulsos com dose de 20 kV, e foram avaliados a espessura da placa de crescimento e o comprimento das tíbias e fêmures, notando um efeito de displasia focal em alguns animais, sem alteração na espessura, estimulando sua maturação precoce através do estímulo para a ação dos osteoclastos e sua posterior substituição por osteoblastos. Estes efeitos são dose-dependentes, porém não foi estudada a dose adequada para se obter a modulação da placa epifisária. Van Arsdalen et al., (1991) também estudaram o efeito das ondas de choque nos fêmures de coelhos imaturos, com 1000 pulsos e dose de 18 kV, e não notaram alterações na epífise, nem alterações no crescimento e desenvolvimento ósseo.

Lüssenhop et al., (1997) estudaram a influência das ondas de choque na placa de crescimento de 36 coelhos, em dois grupos com idades distintas, esperando obter alterações na placa epifisária, promovendo seu fechamento precoce. Neste estudo, as ondas de choque foram aplicadas na placa de crescimento da tíbia direita, ficando a esquerda como controle, com a utilização de respectivamente 2000 e 4000 pulsos para os grupos um e dois, com a dose de 1,2 mJ/mm². Os animais foram eutanasiados com três, seis e doze semanas, e houve o desenvolvimento de crescimento em varo nas tíbias

tratadas, sem significância estatística e sem alterações microscópicas na placa epifisária.

Väterlein et al., (2000) estudaram o efeito das ondas de choque na cartilagem articular de 24 coelhos com 100 dias de vida, divididos em quatro grupos de seis animais, submetidos à aplicação de 2000 pulsos com dose de $1,2 \text{ mJ/mm}^2$ na articulação fêmur-tíbio-patelar esquerda, ficando a articulação direita como controle. Os animais foram eutanasiados com três, seis, doze e vinte e quatro semanas após o tratamento, submetidos à avaliação radiográfica, macroscópica e microscópica da cartilagem, e não foi relatada nenhuma alteração radiográfica ou microscópica, sendo relatado hematoma subperiosteal no grupo eutanasiado após três semanas.

Dorotka et al. (2003) avaliaram o efeito das ondas de choque na citotoxicidade e proliferação de condrócitos e células estromais da medula óssea, em cultura de condrócitos, em diferentes doses, utilizando 500 pulsos com dose de 0,02, 0,06 ou $0,17 \text{ mJ/mm}^2$ para a avaliação da citotoxicidade, e com 100, 500 ou 1000 pulsos, com dose de 0,02, 0,06 ou $0,17 \text{ mJ/mm}^2$ para a avaliação do potencial de proliferação, observando efeito dose-dependente de redução do potencial de proliferação dos condrócitos, e de aumento da citotoxicidade ao lactato.

Nassenstein et al. (2005) trataram a epífise proximal da tíbia de 18 coelhos jovens com 800 pulsos, na dose de $0,32 \text{ mJ/mm}^2$, e na avaliação após 72 horas, 14 dias e 4 semanas da aplicação, não observaram lesões histológicas à placa de crescimento epifisária.

Em um estudo clínico envolvendo 17 potros com deformidade angulares que não responderam ao tratamento conservativo, Bathe et al., (2006) utilizaram as ondas de choque radiais, com a dose de 3 bar de pressão, equivalente à aproximadamente $0,15 \text{ mJ/mm}^2$ e 2000 pulsos, em duas a cinco aplicações com intervalo semanal, na região do local de maior crescimento da fise, tendo como resultado o retardamento do crescimento de maneira satisfatória em 88% dos casos, sendo que os autores admitem a necessidade de estudos controlados para validar estes resultados.

Hubert et al. (2006) não encontraram diferença na taxa de aposição mineral em lesões experimentais no osso terceiro metacárpico em um estudo com oito eqüinos, onde utilizaram o membro contra-lateral como controle, e

foram administradas duas aplicações de ondas de choque extracorpóreas, e não foi citada a dose utilizada.

O efeito das ondas de choque na placa de crescimento epifisária também foi estudado por Giusti et al. (2005), que utilizaram coelhos de cinco semanas de idade. Este autor aplicou as ondas de choque extracorpóreas sobre a placa epifisária proximal da tíbia de coelhos, com uma única aplicação, variando o número de ondas em dois grupos de 1000 e 4000 pulsos, e variando a intensidade em três níveis energéticos: 14 kV, 21 kV e 28 kV. Neste estudo, as avaliações foram feitas após seis semanas da aplicação, através da mensuração das tíbias e da mensuração microscópica da placa de crescimento, não tendo alterações estatisticamente significativas, porém observando a tendência à diminuição do crescimento das tíbias que receberam um maior número de ondas de choque.

Existem poucos relatos sobre a influência das ondas de choque extracorpóreas sobre as propriedades do osso, como a densidade mineral óssea. Wang et al. (2004) em um estudo com um modelo experimental de fratura fechada em coelhos, utilizando uma única aplicação de ondas de choque, com três grupos experimentais: controle, baixa energia (2000 pulsos a $0,18 \text{ mJ/mm}^2$), e alta energia (4000 pulsos e $0,47 \text{ mJ/mm}^2$), tiveram como resultado, após a avaliação radiográfica e através da absorciometria de energia dupla de Raios-x (DXA), um aumento na densidade mineral óssea (DMO) dos membros tratados pela TOC significativo no grupo de alta energia, sugerindo a relação de dependência da dose para o efeito de aumento da densidade mineral óssea.

Maier et al. (2002) verificaram a aplicação de ondas de choque em fêmur de coelhos, 1500 pulsos, com doses de $0,5 \text{ mJ/mm}^2$ e $0,9 \text{ mJ/mm}^2$. As avaliações incluíram cintilografia óssea, ressonância magnética e histopatologia, sendo observadas alterações na fisiologia normal do osso com a dose menor e alterações deletérias, como edema de tecidos moles ao redor dos fêmures, edema na medula óssea, coleção de líquido no periósteo e efusão intra-articular moderada na dose maior.

As vantagens da terapia por ondas de choque extracorpóreas são a baixa taxa de complicações e o fato de ser um procedimento ambulatorial não invasivo. Diferentes protocolos de aplicação podem ser utilizados, desde que a

quantidade total de energia empregada para o tratamento seja a mesma (Krischek et al., 1998; Schaden et al., 2001; Wang et al., 2001). Os efeitos colaterais são relacionados a presença de edema, hematomas e petéquias locais. As contra-indicações atualmente são relacionadas à presença de placa epifisária, tecido alveolar, cerebral, medular ou neoplasia no local de aplicação ou condições sistêmicas como infecção aguda, coagulopatia ou gestação. A presença de placa epifisária é considerada como contra-indicação porque os efeitos das ondas de choque sobre a sua fisiologia ainda não foram totalmente esclarecidos (Schaden et al., 2001).

Kaulesar Sukul et al. (1993), Rompe et al. (1998), Ogden & Kischkat, (2001), Maier et al. (2002) e Martini et al. (2003) propuseram que os efeitos biológicos das ondas de choque são proporcionais à energia total absorvida pelo tecido em questão, porém existe controvérsia quando diferentes estudos especificando somente a densidade do fluxo energético, ou o número de pulsos do protocolo utilizado são comparados. Esta afirmação corrobora a necessidade de novos estudos que possibilitem a comparação entre os diferentes protocolos de tratamento para as diversas enfermidades onde as ondas de choque extracorpóreas possam ser utilizadas.

1.4. MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DO EFEITO DAS ONDAS DE CHOQUE EXTRACORPÔREAS:

1.4.1. Avaliação Radiográfica

A avaliação radiográfica é uma importante ferramenta diagnóstica para o sistema músculo-esquelético, sendo o método de escolha para observação do grau de fechamento da placa de crescimento epifisária, avaliação geométrica e da estrutura óssea, permitindo o diagnóstico das deformidades angulares. O fechamento funcional da placa de crescimento ocorre um pouco antes do fechamento radiográfico, e alterações na densidade óssea ocorrem antes que as alterações sejam radiograficamente visíveis (Kawebum et al., 1994; Stashak, 2001; Hernandez-Vaquero et al., 2005).

De acordo com o estudo de Kaweblum et al. (1994), radiografias padronizadas antero-posteriores são uma técnica adequada para a avaliação da maturidade da placa de crescimento proximal da tíbia em coelhos.

No estudo de Lyon et al. (2003), o comprimento das tíbias foi mensurado da porção mais proximal do planalto da tíbia até seu ponto mais distal para a avaliação do efeito do ultra-som terapêutico na placa de crescimento de coelhos.

1.4.2. Densitometria óptica em imagem radiográfica

A densitometria óptica em imagem radiográfica óssea (Vulcano et al., 1997; Lepage et al., 2001; Rahal et al., 2002; Vulcano & Santos, 2003; Prado Filho & Sterman, 2004; Godoy et al., 2005; Hernandez-Vaquero et al. 2005; Vulcano et al., 2006), é um método que permite a utilização de equipamento de fácil disponibilidade, possibilitando sua utilização em Medicina Veterinária, e foi considerado um método de boa sensibilidade, precisão e reprodutibilidade. O objetivo desta técnica é a mensuração da densidade óssea através da utilização de um penetrômetro de alumínio utilizado como referencial densitométrico, em forma de cunha, constituído de degraus, com variação em espessura, expressando o resultado em mmAl, ou seja, em equivalente radiográfico ósseo em alumínio (Lepage et al., 2001). Este método é capaz de detectar pequenas diferenças no conteúdo mineral, quando são utilizadas radiografias padronizadas (Vulcano & Santos, 2003; Vulcano et al., 2006). A reprodutibilidade desta técnica foi obtida, com a margem de erro de 5%, segundo Vulcano & Santos (2003).

Esta técnica se baseia no estabelecimento de uma curva de calibração obtida a partir dos valores da densidade óptica radiográfica dos degraus da escala de alumínio (*phantom*), confeccionada com uma liga específica e padronizada internacionalmente, sendo composta por 20 degraus, variando de 1mm de espessura para o primeiro degrau, acrescentando-se 1 mm a cada degrau, tolerando-se variação máxima na espessura de $\pm 0,03$ mm, utilizado como referencial densitométrico padrão. Assim, cada imagem radiográfica tem sua curva traçada em função da transferência dos valores da escala (Prado Filho & Sterman, 2004; Vulcano & Santos, 2003). A escala é utilizada como

referência para a calibragem do sistema de comparação entre as densidades, evitando as possíveis variáveis que este método poderia apresentar, minimizando as diferenças no padrão radiográfico entre os filmes analisados, permitindo obter resultados mais precisos (Vulcano et al., 2006)

A estrutura óssea a ser analisada é radiografada ao lado do penetrômetro de alumínio, acoplado a um porta-chassi, posicionado de forma que os degraus mais espessos encontrem-se junto à região proximal do membro do animal (Vulcano & Santos, 2003).

As imagens radiográficas são digitalizadas e analisadas por programas computacionais específicos, capazes de comparar a tonalidade de cinzas da imagem radiografada com a densidade obtida através da tonalidade da escala de alumínio (Prado Filho & Sterman, 2004; Hernandez-Vaquero et al. 2005).

1.4.3. Absorciometria de energia dupla de Raios-x (DXA)

A densidade mineral óssea (DMO) é a concentração de mineral por volume unitário de osso. Ela se relaciona com as propriedades e características histológicas do material (Mc Clure et al., 2001; Castañeda et al., 2006).

A Absorciometria de energia dupla de Raios-X (DXA) é uma técnica atualmente considerada como um bom padrão para a mensuração da densidade mineral óssea (DMO). A técnica baseia-se na atenuação, pelo corpo do paciente, de um feixe de radiação gerado por uma fonte de raios-x com dois níveis de energia. Este feixe atravessa o paciente no sentido pósterio-anterior e é captado por um detector, e a densidade de cada amostra é calculada à partir da radiação que alcança o detector em cada pico de energia. Os tecidos moles, como a gordura, água, músculos e vísceras atenuam a energia de forma diferente do tecido ósseo, permitindo a construção de uma imagem da área de interesse. O exame fornece o valor absoluto da densidade mineral óssea (DMO) da área estudada, em g/cm², que representa as gramas de cálcio por centímetro quadrado de tecido ósseo em corte transversal e o valor do conteúdo mineral ósseo (CMO), que é a quantidade de mineral em gramas contida na região avaliada (Grier et al.; 1996; Lepage et al., 2001; Mc Clure et al., 2001; Castañeda et al., 2006).

A técnica da DXA permite o exame rápido, não invasivo e preciso para a mensuração da massa ou densidade óssea em qualquer parte do esqueleto, sendo sua utilização para a avaliação do conteúdo mineral ósseo (CMO) e da densidade mineral óssea (DMO) amplamente difundida em humanos. Esta técnica tem sido adaptada para animais devido à necessidade de avaliação da composição óssea e corpórea em modelos experimentais. Para assegurar precisão na mensuração da DXA em animais, deve ser dada atenção ao posicionamento adequado, permitindo ao operador a definição da mesma região de interesse utilizando pontos de referência anatômicos claramente definidos na imagem examinada (Paniagua et al., 1998; Grier et al.; 1996).

Durante o exame, a fonte e o detector se movem sobre o paciente, com o detector mensurando a quantidade de raios-x que passam através do paciente. Os raios-x de dois diferentes níveis de energia sofrem a interferência do osso, gordura e massa magra. Algoritmos em programas computacionais específicos calculam então a quantidade e tipo de tecido em cada pixel examinado. (Grier et al.; 1996).

A DXA é considerada como adequada para a mensuração da DMO em animais (Grier et al.; 1996; Paniagua et al., 1998; Mc Clure et al., 2001). A comparação destas duas técnicas de densitometria foi realizada em um estudo de Hernandez-Vaquero et al. (2005), que encontraram forte correlação entre a densitometria óptica em imagem radiográfica e a absorciometria de energia dupla de Raios-x (DXA) em medicina.

Para animais de pequeno porte, como ratos, furões, coelhos e gatos, deve ser utilizada uma técnica diferente de aquisição da imagem, denominada de ultra-alta resolução regional, na qual o número de linhas da varredura é aumentado e a velocidade do braço de exame é reduzida. Nesta técnica é utilizado um colimador menor. A resolução pode então ser aumentada mais de sete vezes, se comparado com um exame normal (Grier et al., 1996; Mc Clure et al., 2001). Paniagua et al. (1998) estudaram a utilização da DXA em ratos, confirmando sua precisão para a mensuração da densidade mineral óssea (DMO) e a alta correlação do conteúdo mineral ósseo (CMO). Segundo Grier et al., (1996) poucos relatos utilizaram coelhos para a avaliação da osteoporose, mas este animal tem sido amplamente utilizado em estudos de crescimento ósseo em implantes e na interface osso-implante. Hamanishi et al. (1994)

avaliaram a utilização da DXA óssea em um experimento com tíbias de coelhos imaturos e adultos, com a utilização de transplante de células da medula óssea. Castañeda et al. (2006) consideraram a DXA como um método preciso para avaliação da massa óssea em coelhos, em um estudo para avaliação de um modelo experimental de osteoporose.

Em um estudo com ratos, Takahashi et al. (2001) utilizaram a DXA para avaliação do efeito das ondas de choque na osteogênese, demonstrando maior conteúdo mineral ósseo (CMO) nos fêmures tratados. Wang et al. (2004) também utilizaram a DXA para avaliar o efeito das ondas de choque nas propriedades biomecânicas do osso, em coelhos adultos, e notaram efeito dose-dependente de aumento da densidade mineral óssea (DMO) após fratura em coelhos, com significância estatística para a dose energética mais alta, porém com tendência ao aumento na dose mais baixa.

A DXA foi utilizada também com sucesso em alguns estudos com suínos, caninos, primatas e eqüinos muitas vezes limitados à utilização de peças anatômicas (Grier et al., 1996; Lepage et al., 2001; Mc Clure et al., 2001).

1.4.4. Imuno-histoquímica

A imuno-histoquímica pode ser considerada como a demonstração do antígeno em secções teciduais através da utilização das interações específicas antígeno-anticorpo, pela ligação de um marcador ao anticorpo primário, ligado a um anticorpo secundário que potencializa a reação, permitindo a identificação e caracterização da expressão de uma determinada substância em um fragmento de tecido, com a preservação de sua arquitetura normal. A escolha da técnica adequada deve ser baseada em parâmetros como o tipo de tecido sob investigação e o grau de sensibilidade necessária (Gimeno et al., 2002).

O Fator de Crescimento Transformador β (*Transforming Growth Factor β* - TGF- β) é uma citocina conservada evolutivamente, com pouca variação entre as espécies. Entre os mamíferos, as isoformas mais freqüentes são a TGF β -1, TGF β -2 e TGF β -3. A isoforma melhor caracterizada e mais abundante é o TGF β -1, principalmente nas plaquetas e tecido ósseo (Ghahary et al., 2002;

Janssens et al., 2005). O TGF- β regula uma ampla gama de processos biológicos, incluindo a proliferação, sobrevivência, diferenciação e migração celular, e a produção de matriz extracelular. A formação óssea pelo TGF- β é promovida através da atração quimiotática de osteoblastos, aumento da proliferação de osteoblastos, e estágios iniciais da diferenciação com a produção de proteínas da matriz extracelular, estímulo da expressão de colágeno tipo II, síntese de proteoglicanos pelas células precursoras dos condrócitos e supressão da proliferação de precursores hematopoiéticos. Os membros da família do TGF- β são secretados como complexos latentes, que necessitam de ativação para desempenhar suas funções biológicas, em um processo mediado por proteases ou por acidificação. No processo de ossificação endocondral, o TGF- β 1 e o TGF- β 3 são detectados na zona de proliferação e na zona dos condrócitos hipertróficos, e o TGF- β 2 é encontrado em todas as regiões da cartilagem. Os osteoclastos também expressam o TGF- β 1 em grande quantidade (Janssens et al., 2005).

O TGF- β também é relacionado à reparação tecidual, cujas funções incluem o estímulo para a migração de fibroblastos e macrófagos, para a angiogênese e para a produção de colágeno, a regulação da atividade das proteinases e o aumento na atividade dos inibidores teciduais das metaloproteinases. Esse fator de crescimento desempenha um papel essencial na resolução do processo inflamatório. Apesar de sua ação pró-inflamatória na fase inicial da reparação tecidual, o TGF- β participa na modulação da deposição de componentes da matriz extracelular. O TGF- β aumenta significativamente a síntese de colágeno, fibronectina e glicosaminoglicanos pelos fibroblastos. Essa citocina tem sido considerada recentemente como capaz de influenciar tanto processos fisiológicos como patológicos. O efeito da forma ativa do TGF- β na proliferação dos fibroblastos é bifásico, mostrando uma alta proliferação de fibroblastos em resposta a baixas concentrações da forma ativa, e um efeito de supressão da proliferação em resposta a altas concentrações da forma ativa do TGF β , demonstrando sua capacidade de auto-regulação. O TGF- β se liga aos receptores de alta afinidade, após sua ativação, para poder exercer suas ações teciduais. Esses receptores se encontram presentes na superfície celular de diversos tipos de células.

(Bonewald & Mundi, 1989; Flanders et al., 1989; Thompson et al. (1989); Border & Ruoslahti, 1992; Ghahary et al., 2002).

Existem poucos estudos relatando a ação das ondas de choque sobre a concentração de TGF- β . Wang et al. (2000) sugerem que um dos possíveis mecanismos da ação das ondas de choque extracorpóreas está relacionado ao TGF- β .

2. OBJETIVO

Este estudo foi elaborado para avaliar as possíveis alterações no crescimento ósseo da tíbia em coelhos pela aplicação de ondas de choque extracorpóreas, levando-se em conta os resultados positivos encontrados por alguns pesquisadores em relação ao seu efeito no tecido ósseo, para investigar a possibilidade de seu emprego no tratamento de casos clínicos de deformidades angulares.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Este trabalho foi executado após aprovação pela Câmara de Ética em Experimentação Animal da FMVZ, UNESP, campus de Botucatu, sob o protocolo n. 132/2006.

Foram utilizados 10 coelhos jovens, com idade de 35 dias, da raça Nova Zelândia branca, clinicamente sadios, provenientes do Biotério Central UNESP – Campus de Botucatu. Os animais foram mantidos em gaiolas metálicas agrupados em duplas, alimentados com ração comercial¹ e água com livre demanda, renovada diariamente, em local tranquilo, livre de ruídos, com boa circulação de ar e à temperatura ambiente, com iluminação natural, respeitando o ciclo sono-vigília.

Os animais foram identificados individualmente através de numeração pintada nas orelhas.

O animal de número 07 veio à óbito por causas não relacionadas ao experimento na sexta semana do experimento.

3.2. TERAPIA POR ONDAS DE CHOQUE EXTRACORPÓREAS

A placa de crescimento epifisária proximal da tíbia direita, após sua identificação por meio de palpação, utilizando como ponto de referência anatômica a tuberosidade da tíbia, foi submetida à terapia por ondas de choque extracorpóreas² (TOC), com a aplicação de 1500 pulsos, por três vezes com intervalo de duas semanas entre elas, ficando o membro pélvico esquerdo não tratado como grupo controle, sempre com a intensidade energética E6, de 0,15 mJ/mm², e com frequência de pulso de 360 pulsos por minuto (Figura 2).

¹ Ração Natural Coelho PURINA, Cargill, Paulínia - SP

² Versatron, HMT. Suíça. Processo FAPESP 02/01822-0

O local de aplicação escolhido foi a placa de crescimento proximal da tíbia, por ser superficial, de fácil localização e por apresentar um tamanho relativamente grande, quando comparada ao tamanho do animal.

No presente estudo, a sonda utilizada foi a R05³ devido à sua zona focal, representado por uma elipse com 25 mm em seu maior diâmetro, no sentido da propagação da onda, atingindo toda a região da cartilagem de crescimento epifisária da tíbia dos coelhos utilizados no experimento (Figura 3).

Para cada aplicação, os coelhos foram anestesiados com xilazina⁴ na dose de 5 mg/kg e cetamina⁵, 35 mg/kg por meio de injeção intramuscular.

Antes de cada aplicação, a região a ser tratada foi tricotomizada, e foi aplicado gel de contato para proporcionar o melhor contato possível entre a pele do animal e o aparelho.

As aplicações foram realizadas colocando-se a sonda aplicadora em contato com a pele na região dorsal da epífise proximal da tíbia direita, sobre a placa de crescimento epifisária (Figura 4).

³ Sonda R05 - Versatron , HMT. Suíça. Processo FAPESP 02/01822-0

⁴ DOPASER 2%, Calier S.A., Barcelona, Espanha

⁵ DOPALEN, Vetbrands, Jacaréi - SP



FIGURA 2- Equipamento de ondas de choque extracorpóreas



FIGURA 3- Sonda R05



FIGURA 4 - Local de aplicação das ondas de choque extracorpóreas (TOC)

3.3. AVALIAÇÃO CLÍNICA

Em cada um dos animais, por meio de inspeção, foram realizadas as avaliações clínicas, para observação de alterações como claudicação durante o experimento, comparando o apoio do membro tratado com o contra-lateral..

Os animais foram pesados ao início do experimento, a cada aplicação de ondas de choque extracorpóreas e ao final do experimento.

3.4. AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA

Em cada um dos animais foi realizado o exame radiográfico da região da tíbia de ambos os membros pélvicos. A densidade óptica radiográfica foi mensurada, permitindo a avaliação inicial das estruturas submetidas ao experimento.

O controle foi considerado como o membro contra-lateral não tratado.

A avaliação radiográfica dos animais foi realizada no início do experimento, a cada tratamento com a terapia por ondas de choque extracorpóreas, e quatro semanas após o fim do tratamento.

A epífise proximal da tíbia foi radiografada, com o animal mantido em decúbito dorsal, sob contenção manual. Foram utilizados chassís 24x30 cm, distância foco-filme padronizada, e a técnica utilizada foi de 40 kVp e 1,6 mAs no início do experimento, a cada tratamento com a terapia por ondas de choque extracorpóreas, e quatro semanas após o fim do tratamento. Nesta última análise, a técnica foi alterada, sendo mantido 40 kVp e aumentado para 2,0 mAs devido ao crescimento dos animais (Figura 5).

O comprimento das tíbias foi mensurado através da utilização de uma régua sobre as imagens radiográficas, por um colaborador que não sabia a que grupo pertenciam as imagens, utilizando como pontos de referência anatômicos a porção mais proximal do planalto da tíbia e o ponto mais distal da tíbia. As mensurações obtidas na semana final do experimento (semana 9) foram inseridas na fórmula descrita por Ross & Zions (1997), para o cálculo do percentual de inibição do crescimento:

$$\% \text{inibição do crescimento} = \frac{\text{comprimento controle (cm)} - \text{comprimento tratado (cm)}}{\text{comprimento controle (cm)}} \times 100$$



FIGURA 5 - Imagem radiográfica durante o experimento

3.5. DENSITOMETRIA ÓPTICA EM IMAGEM RADIOGRÁFICA

A densitometria óptica em imagem radiográfica óssea foi obtida através da utilização de um penetrômetro de alumínio (*phantom*), ilustrado na Figura 6, utilizado como referencial de densidade, constituído de 20 degraus, com diferença de 1 mm entre eles, e com máxima variação em espessura de $\pm 0,03$ mm entre os degraus, colocado em uma moldura de madeira (Figura 7), na qual foi inserida o chassi radiográfico para obtenção da imagem radiográfica da epífise proximal da tíbia.

Após a revelação das radiografias em processadora automática, as imagens foram digitalizadas⁶ no modo transmissivo, em escala de 256 cinzas, 86 ppp, e analisadas através da utilização de programa computacional específico⁷, de acordo com os valores de cada degrau do penetrômetro relativos à espessura do penetrômetro padrão de alumínio (mmAl), servindo como referência para a densidade mineral óssea (DMO), como demonstrado na Figura 8.

⁶ SCANNER U-MAX POWER LOOK III.

⁷ ATHENA-SAI. Sistema de Inteligência Avançada Com. Imp. Exp. Ltda. Processo FAPESP 1998/10287-3

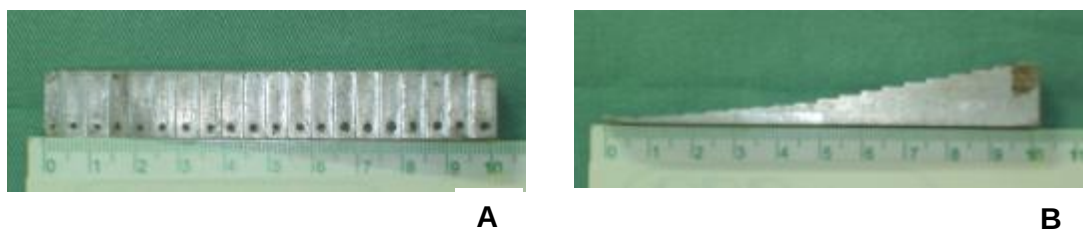
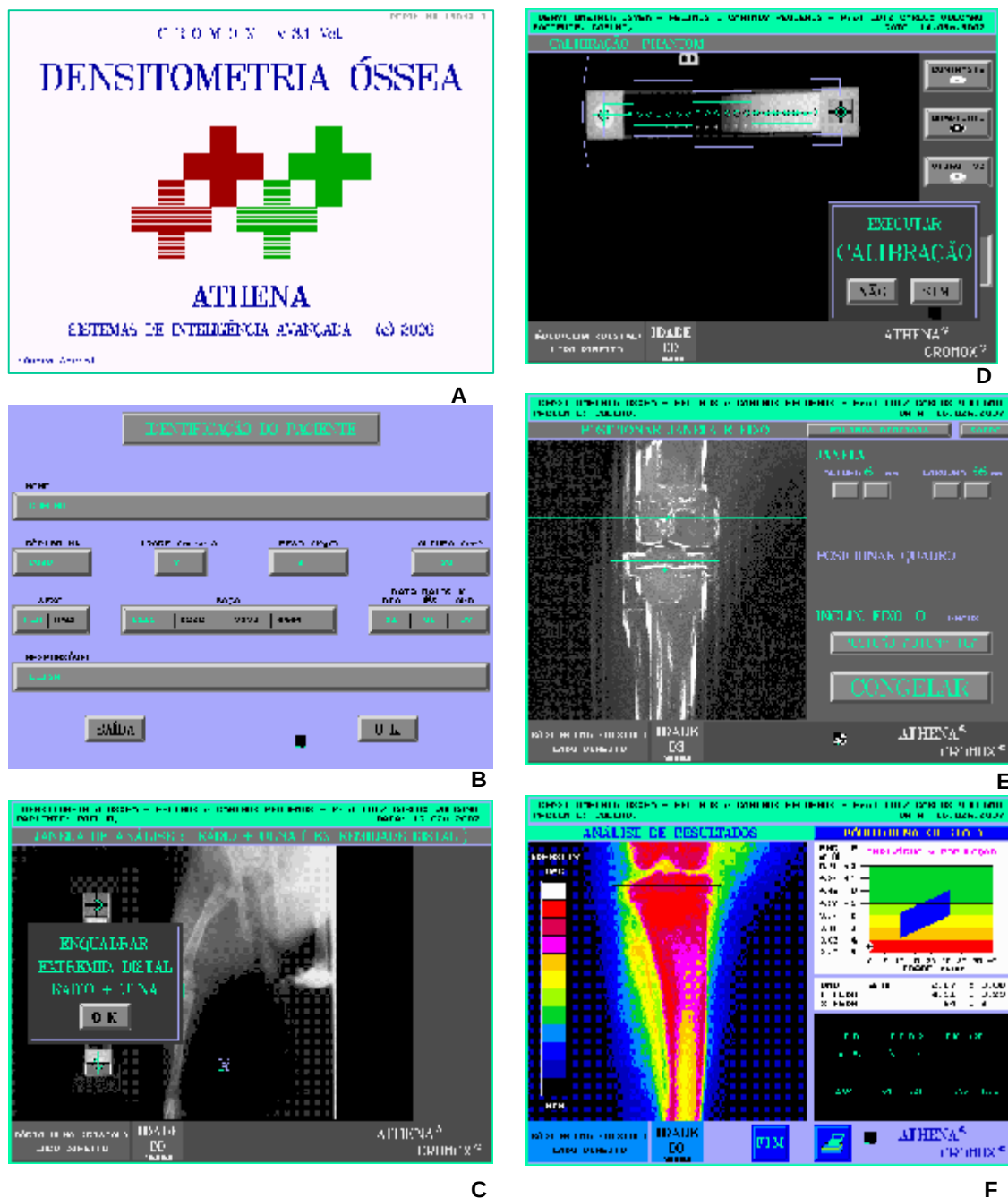


FIGURA 6 - Penetrômetro de Alumínio (*Phantom*). Visto de cima (A) e pela lateral (B)



FIGURA 7 - Porta-chassi c/ penetrômetro de Alumínio



3.6. ABSORCIOMETRIA DE ENERGIA DUPLA DE RAIOS-X (DXA)

A avaliação da Absorciometria de energia dupla de Raios-X (DXA) foi realizada através da utilização de equipamento⁸ com detector multi-elementos e raio com geometria em leque, utilizando o programa computadorizado fornecido pelo fabricante com o protocolo de pequenos animais, com a configuração regional de alta resolução.

Os animais foram posicionados em decúbito dorsal sobre a mesa de exame, logo após a eutanásia, e os membros pélvicos foram adequadamente posicionados para ficarem alinhados corretamente durante o exame. Após a aquisição da imagem, o programa analisa a densidade mineral óssea, após ajuste do brilho e contraste da imagem, da escolha da região global e da região de interesse. Neste experimento, a região de interesse foi a região da placa de crescimento proximal da tíbia dos membros tratados (direitos) e dos membros controle (esquerdos).

3.7. AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

O processamento do material foi realizado no laboratório de Histotecnologia da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP. As tíbias foram dissecadas, fixadas em formalina tamponada a 10%, submetidas à descalcificação em ácido nítrico a 10% durante três dias. Após descalcificação, os fragmentos foram incluídos em parafina, e posteriormente corados pelos métodos de hematoxilina-eosina (HE) e tricrômio de Masson. Os cortes histológicos abrangeram a região central da placa de crescimento, em um corte sagital no plano médio.

As lâminas foram analisadas à microscopia óptica, sem o conhecimento prévio dos membros a que pertenciam.

Para a histomorfometria, as imagens foram digitalizadas através da utilização de equipamento fotográfico digital⁹ acoplado ao microscópio óptico, e as imagens foram obtidas em uma magnificação de 200x. Após digitalização,

⁸ QDR 2000 plus. HOLOGIC, Bedford, MA, EUA. Cedido por Tomocentro Botucatu - SP

⁹ CYBER_SHOT DSC-W70, Sony Corp., China

as imagens obtidas no tamanho de 1632 x 1224 pixels foram mensuradas através de programa computacional¹⁰ de análise digital de imagens de domínio público. Foram analisados dois cortes histológicos da região sagital mediana da placa de crescimento proximal da tíbia de cada animal dos grupos tratado e controle. Em cada lâmina foi observado um campo correspondente ao centro do foco do equipamento de ondas de choque. Nas fotomicrografias digitais obtidas foram mensuradas a espessura vertical da placa de crescimento, e a espessura da zona proliferativa e da zona hipertrófica, em três locais diferentes, e foi calculada a média, para assegurar a precisão do resultado.

Foram utilizados como referências para a mensuração da espessura total da placa de crescimento os pontos proximal e distal de cartilagem intacta, desde a região logo abaixo do osso subcondral até o septo transversal do último condrocito hipertrófico antes da região da invasão vascular. A zona proliferativa foi definida da primeira célula da coluna de células em proliferação até a primeira célula hipertrófica que se apresenta mais arredondada. A zona hipertrófica foi definida como da primeira célula hipertrófica até o septo transversal da última célula hipertrófica, antes do início da invasão vascular (Figura 9).

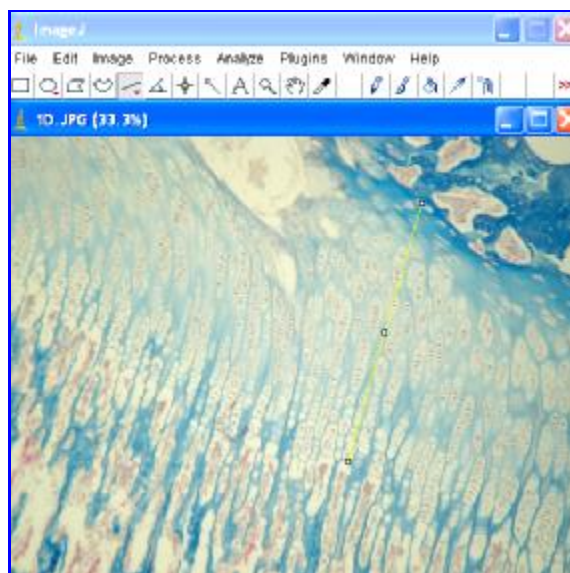


FIGURA 9 – Tela do programa computacional utilizado na avaliação da espessura da placa de crescimento

¹⁰ IMAGEJ – disponível em <http://rsb.info.nih.gov/ij> – Versão 1.37, National Institutes of Health, Bethesda, MA, EUA

3.8. AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA

O processamento do material para imuno-histoquímica foi realizado no laboratório UPGEN de Biologia Molecular da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP.

Para a avaliação imuno-histoquímica para a pesquisa da presença de TGF- β 1, os fragmentos foram fixados em formalina tamponada a 10% e processados de forma habitual com a inclusão em parafina. Para a incubação com o anticorpo monoclonal liofilizado para TGF- β ¹¹, o material foi desparafinado através de banhos sucessivos em xilol e em álcool absoluto em concentrações decrescentes. A recuperação antigênica foi realizada em banho-maria a 96,5°C, em solução tamponada de citrato. A inibição da peroxidase endógena foi procedida com peróxido de hidrogênio e água destilada (1:1). O material foi incubado com BSA (albumina bovina) 5% para redução das reações de fundo. O anticorpo primário foi incubado durante a noite a 4°C. O anticorpo secundário biotilado anti-humano e a estreptavidina peroxidase¹² foram incubados na temperatura ambiente, e diaminobenzidina (DAB)¹³ foi utilizado como cromógeno. A contra-coloração foi feita com hematoxilina de Harris e as lâminas foram montadas em Entellan¹⁴.

As amostras foram analisadas à microscopia óptica, sem o conhecimento prévio dos membros a que pertenciam as lâminas, para avaliação da imunorreatividade, através da observação do padrão de marcação do tecido pelo anticorpo.

3.9. EUTANÁSIA

Ao final do experimento, quatro semanas após a última aplicação das ondas de choque extracorpóreas, quando os animais estavam com 98 dias de vida, foram eutanasiados com barbitúrico, após anestesia com a utilização de

¹¹ NCL-TGFB clone TGFB17, Novocastra, Newcastle, Reino Unido.

¹² Sistema de Detecção Ultra-Estreptavidina – Easy Path, EP, EUA.

¹³ DAB - 3,3' Diaminobenzidine Tetrahydrochloride – Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA.

¹⁴ Entellan – Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA, EUA

xilazina¹⁵ na dose de 5 mg/kg e cetamina¹⁶, na dose de 35 mg/kg em injeção intramuscular, e após entrar em plano anestésico, receberam injeção intracardíaca de tiopental¹⁷ na dose de 100mg/kg, para a colheita de material proveniente das tíbias para a avaliação por histopatologia.

3.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística dos resultados, foram utilizados testes paramétricos, levando-se em consideração a natureza das distribuições dos valores estudados e a variabilidade das medidas efetuadas. Para as amostras quantitativas dependentes foi aplicado o teste t de Student para amostras pareadas. Os dados que foram considerados paramétricos foram os valores obtidos através da avaliação radiográfica, da densitometria, da DXA, e da histomorfometria (Petrie & Watson, 1999; Callegari-Jacques, 2003).

Foi considerada significativa uma diferença ao nível de 5% de probabilidade.

As tabelas dos cálculos estatísticos se encontram disponíveis no Apêndice.

¹⁵ DOPASER 2%, Calier S.A., Barcelona, Espanha

¹⁶ DOPALEN, Vetbrands, Jacaré - SP

¹⁷ THIOPENTAX 1,0g, Cristália, Itapira - SP

4. RESULTADOS

4.1. AVALIAÇÃO CLÍNICA

Não foram observadas alterações clínicas ou claudicação nos animais, baseada na comparação do apoio do membro com o contra-lateral, durante todo o experimento, sendo notado somente um aumento da vascularização cutânea visível à inspeção, no local da aplicação das ondas de choque nos membros tratados.

Devido às características do movimento e apoio dos membros pélvicos dos coelhos, a quantificação exata da claudicação nestes animais não foi possível.

Os animais foram pesados ao início do experimento, a cada aplicação de ondas de choque extracorpóreas e ao final do experimento, como demonstrado na Tabela 1 e Figura 10.

TABELA 1- Idade em dias e média de peso em kg dos animais durante o experimento

Semanas	0	1	3	5	9
idade(dias)	35	42	56	70	98
peso(kg)	0,70	0,82	1,12	1,75	3,05

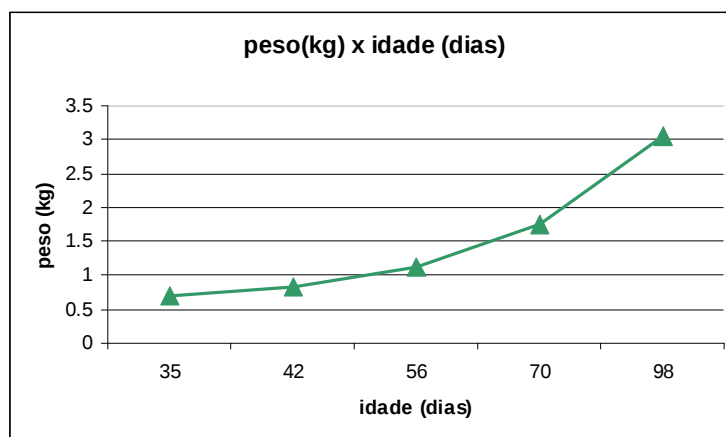


FIGURA 10 - Idade em dias e média de peso em kg dos animais durante o experimento

4.2. AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA

A avaliação radiográfica inicial permitiu a avaliação da uniformidade do grupo experimental, não sendo observada nenhuma alteração que pudesse comprometer o experimento.

Não houve alteração radiográfica entre os membros controle e tratado com a TOC, e não foram observadas evidências radiográficas de deformidade angular das tíbias, nem evidências de diferença no grau de ossificação da placa epifisária proximal das tíbias em ambos os grupos.

Na avaliação radiográfica durante o experimento, foi observada diferença no comprimento das tíbias, através da mensuração das imagens radiográficas, apresentando um comprimento médio em cm, respectivamente para os grupos tratado e controle no início do experimento (semana 0) de $6,1 \pm 0,24$ e $6,1 \pm 0,22$; na primeira aplicação da TOC (semana 1) de $6,7 \pm 0,35$ e $6,7 \pm 0,38$; na segunda aplicação da TOC (semana 3) de $7,5 \pm 0,33$ e $7,6 \pm 0,33$; na terceira aplicação (semana 5) de $8,5 \pm 0,27$ e $8,6 \pm 0,27$; e ao final do experimento (semana 9) de $9,7 \pm 0,39$ e $10,0 \pm 0,36$, conforme a Tabela 02. O percentual médio de inibição do crescimento do grupo tratado em relação ao controle foi de $2,57\% \pm 1,30$, variando de 1,01% até 5,26%, conforme a fórmula descrita por Ross & Zions (1997), descrito na Tabela 18 no Apêndice.

Na avaliação do comprimento em centímetros das tíbias a diferença foi estatisticamente significativa com $P = 0,000259$ ao final do experimento, na nona semana, conforme a Figura 11.

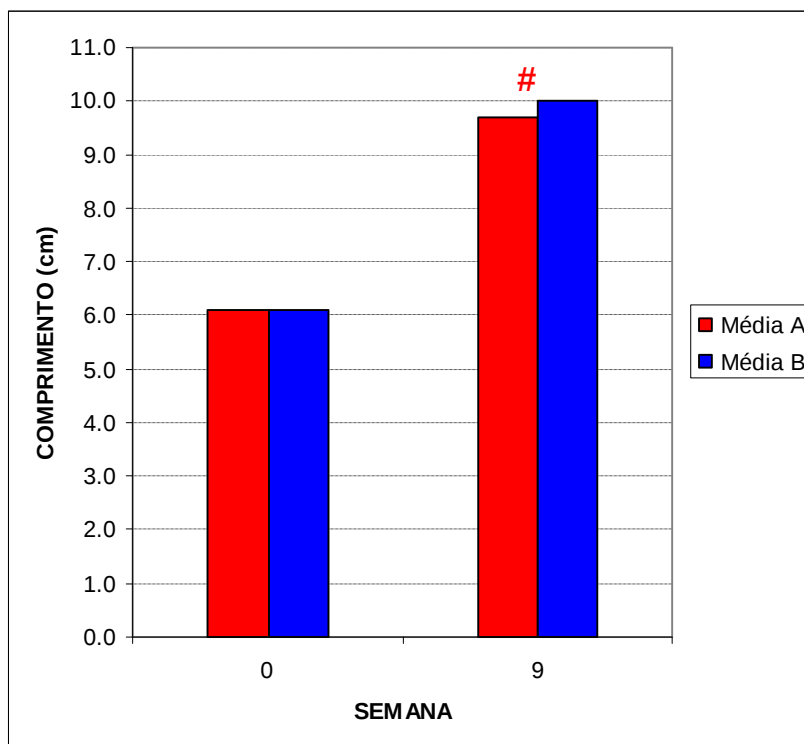
TABELA 2: Valores do comprimento das tíbias nas imagens radiográficas no início do experimento (semana 0), a cada aplicação das ondas de choque extracorpóreas (semanas 1, 3 e 5) e ao final do experimento (semana 9), em cm, nos membros tratados (A) e controle (B):

Semana	0	1	3	5	9
GRUPO TRATADO					
1 A	6,0	6,6	7,4	8,5	9,4
2 A	5,8	6,5	7,3	8,1	9,0
3 A	6,0	6,6	7,4	8,4	9,5
4 A	6,0	6,6	7,3	8,4	9,7
5 A	6,1	6,7	7,7	8,6	10,1
6 A	5,9	6,6	7,5	8,6	9,8
8 A	5,8	6,2	7,1	8,3	9,6
9 A	6,5	7,4	8,1	9,0	10,3
10 A	6,4	7,1	8,0	8,8	10,0
Média A	6,1	6,7	7,5	8,5	9,7 #
Desvio Padrão A	0,24552	0,35000	0,33541	0,26822	0,39511
GRUPO CONTROLE					
1 B	6,0	6,5	7,6	8,5	9,7
2 B	5,9	6,5	7,4	8,2	9,5
3 B	6,0	6,5	7,5	8,4	9,8
4 B	6,0	6,6	7,4	8,5	9,8
5 B	6,1	6,8	7,7	8,6	10,4
6 B	5,9	6,6	7,5	8,7	9,9
8 B	5,9	6,1	7,2	8,3	9,8
9 B	6,5	7,4	8,2	9,1	10,6
10 B	6,4	7,1	8,1	8,8	10,2
Média B	6,1	6,7	7,6	8,6	10,0 #
Desvio Padrão B	0,22236	0,38006	0,33082	0,27386	0,35707

A – grupo tratado TOC

B – grupo controle

- Diferença estatisticamente significativa $P = 0,000259 \leq 0,05$



A – grupo tratado TOC

B – grupo controle

- Diferença estatisticamente significativa $P = 0,000259 \leq 0,05$

FIGURA 11 - Valores do comprimento das tíbias nas imagens radiográficas no início do experimento (semana 0) e ao final do experimento (semana 9), em cm, nos membros tratados (A) e controle (B)

4.3. DENSITOMETRIA ÓPTICA EM IMAGEM RADIOGRÁFICA

Os valores médios da densitometria óptica radiográfica em mmAl mensurados foram, respectivamente para os grupos tratado e controle, no início do experimento (semana 0) $2,03 \pm 0,26$ e $1,79 \pm 0,15$; na primeira aplicação da TOC (semana 1) $2,16 \pm 0,39$ e $2,03 \pm 0,34$; na segunda aplicação da TOC (semana 3) $2,14 \pm 0,20$ e $2,18 \pm 0,09$; na terceira aplicação (semana 5) $2,60 \pm 0,13$ e $2,40 \pm 0,14$; e ao final do experimento (semana 9) de $2,77 \pm 0,17$ e $2,51 \pm 0,09$. Estes dados são detalhados na Tabela 3 e Figura 12.

Na avaliação através da densitometria óptica radiográfica, as diferenças entre os valores em mmAl mensurados foram estatisticamente significativas na

quinta e na nona semana do experimento, com $P = 0,000594$ na quinta semana, e com $P = 0,00214$ na nona semana, com significância de 5%.

TABELA 3: Valores médios e desvio padrão da densitometria óptica em imagem radiográfica no início do experimento (semana 0), a cada aplicação das ondas de choque extracorpóreas (semanas 1, 3 e 5) e ao final do experimento (semana 9), em mmAl, nos membros tratados (A) e controle (B):

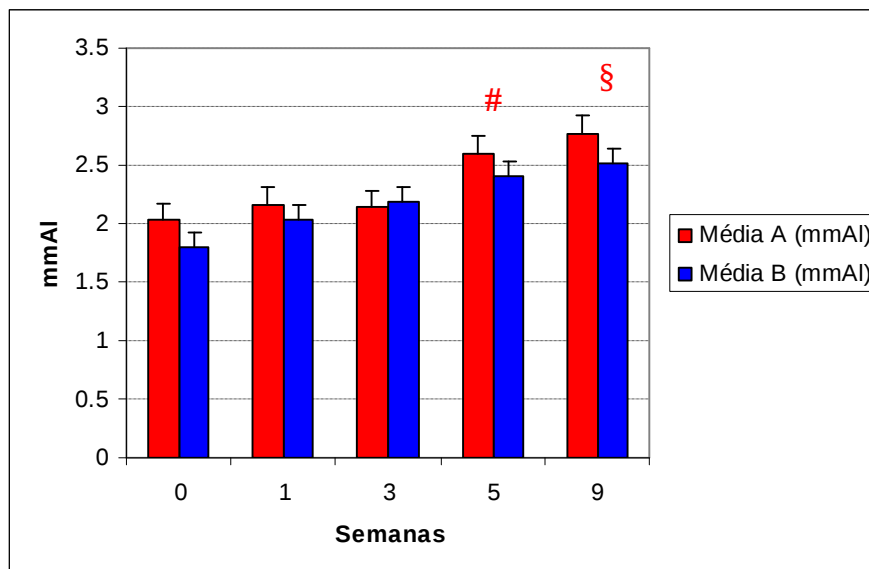
Semana	0	1	3	5	9
1 A	1,75	1,51	1,83	2,46	2,71
2 A	1,98	2,77	2,26	2,60	2,61
3 A	1,95	2,30	2,25	2,70	2,98
4 A	1,77	2,16	1,87	2,51	2,67
5 A	1,93	2,16	2,09	2,68	2,99
6 A	2,64	1,79	2,29	2,39	2,54
8 A	2,12	2,65	2,01	2,54	2,80
9 A	2,09	2,02	2,33	2,78	2,94
10 A	2,02	2,09	2,34	2,71	2,66
Média A	2,03	2,16	2,14	2,60 #	2,77 §
Desvio Padrão A	0,26	0,39	0,20	0,13	0,17
1 B	1,71	2,82	2,18	2,46	2,60
2 B	1,49	1,97	2,06	2,49	2,51
3 B	1,86	2,05	2,15	2,38	2,56
4 B	1,91	2,05	2,23	2,26	2,47
5 B	1,84	2,05	2,20	2,56	2,41
6 B	1,67	1,52	2,16	2,21	2,42
8 B	1,72	1,81	2,07	2,21	2,43
9 B	1,97	2,04	2,16	2,54	2,65
10 B	1,92	1,99	2,38	2,45	2,55
Média B	1,79	2,03	2,18	2,40 #	2,51 §
Desvio Padrão B	0,15	0,34	0,09	0,14	0,09

A – grupo tratado TOC

B – grupo controle

- Diferença estatisticamente significativa $P = 0,000594 \leq 0,05$

§ - Diferença estatisticamente significativa $P = 0,00214 \leq 0,05$



A – grupo tratado TOC

B – grupo controle

[#] - Diferença estatisticamente significativa $P = 0,000594 \leq 0,05$

[§] - Diferença estatisticamente significativa $P = 0,00214 \leq 0,05$

FIGURA 12 - Valores médios e desvio padrão da densitometria óptica em imagem radiográfica no início do experimento (semana 0), a cada aplicação das ondas de choque extracorpóreas (semanas 1, 3 e 5) e ao final do experimento (semana 9), em mmAl, nos membros tratados (A) e controle (B):

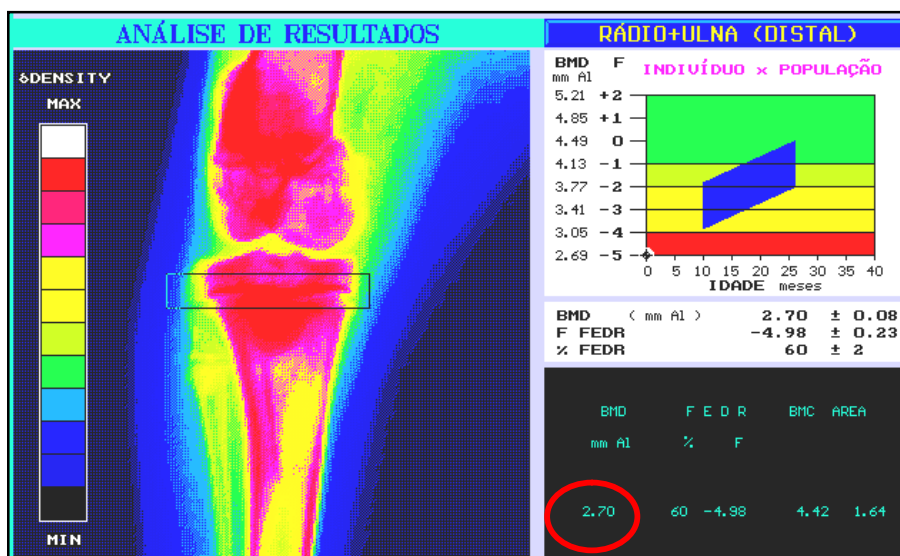


FIGURA 13 - Resultado da densitometria óptica em imagem radiográfica do coelho 1, tíbia tratada, em mmAl (círculo) na última avaliação (semana 9)

4.4. ABSORCIOMETRIA DE ENERGIA DUPLA DE RAIOS-X (DXA)

Os valores obtidos no exame de Absorciometria de energia dupla de Raios-x (DXA) foram de $0,1266 \pm 0,0130$ e de $0,1207 \pm 0,0137$ respectivamente para os membros tratado e controle, e esta diferença não foi estatisticamente significativa para $P \leq 0,05$, com P calculado de 0,333795. Porém este exame mostrou uma tendência a uma maior densidade dos membros tratados, conforme Tabela 4 e a Figura 13.

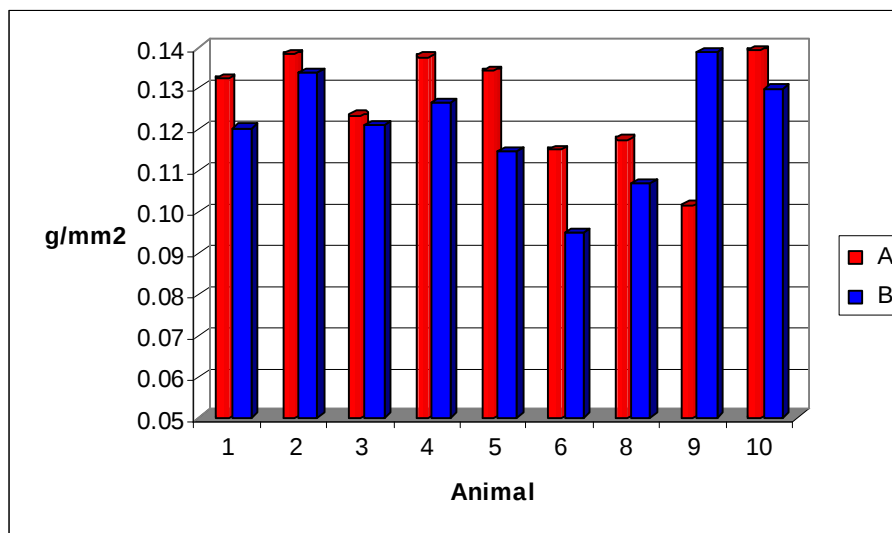
O resultado do exame do animal quatro é demonstrado na Figura 14.

TABELA 4: Valores da DXA ao final do experimento (semana 9), em g/cm², nos membros tratados (A) e controle (B):

DXA Semana 9	A	B
Coelho 1	0,1324	0,1203
Coelho 2	0,1383	0,1338
Coelho 3	0,1234	0,1209
Coelho 4	0,1377	0,1265
Coelho 5	0,1342	0,1146
Coelho 6	0,1150	0,0950
Coelho 8	0,1177	0,1068
Coelho 9	0,1016	0,1387
Coelho 10	0,1392	0,1300
Média	0,126611	0,120733
Desvio Padrão	0,013035	0,013724
Variância	0,00017	0,000188

A – grupo tratado TOC

B – grupo controle



A – grupo tratado TOC
B – grupo controle

FIGURA 14 - Valores da DXA ao final do experimento (semana 9), em g/cm², nos membros tratados TOC (A) e controle (B)

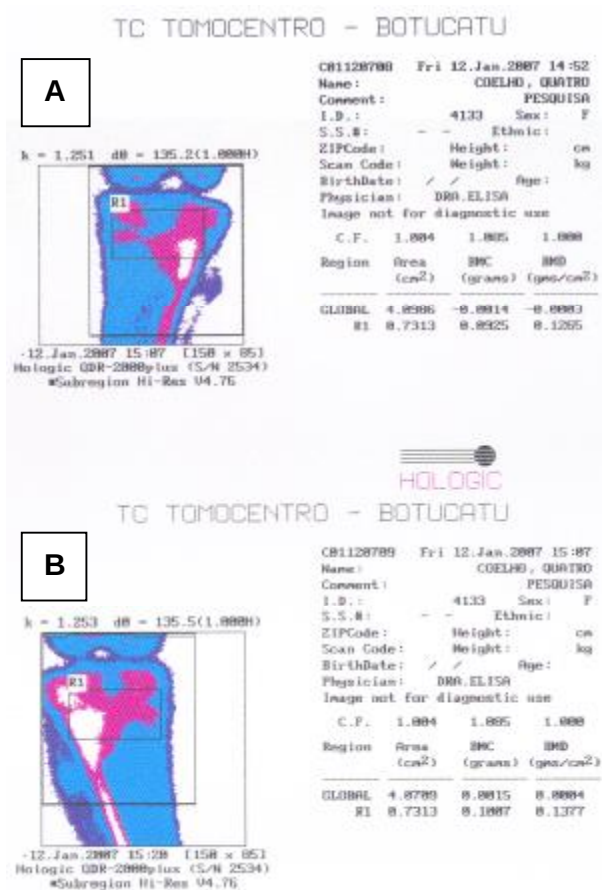


FIGURA 15 – Resultado da avaliação da DXA do animal número 4:
A – Tíbia Controle, B – Tíbia Tratada

4.5. AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

As lâminas provenientes das tíbias dos grupos tratado e controle não apresentaram alterações histológicas relevantes na placa de crescimento epifisária, considerando a quantidade e as características dos condrócitos, a presença de infiltrado inflamatório e neovascularização, e o grau de calcificação da matriz presente, de acordo com a Figura 17.

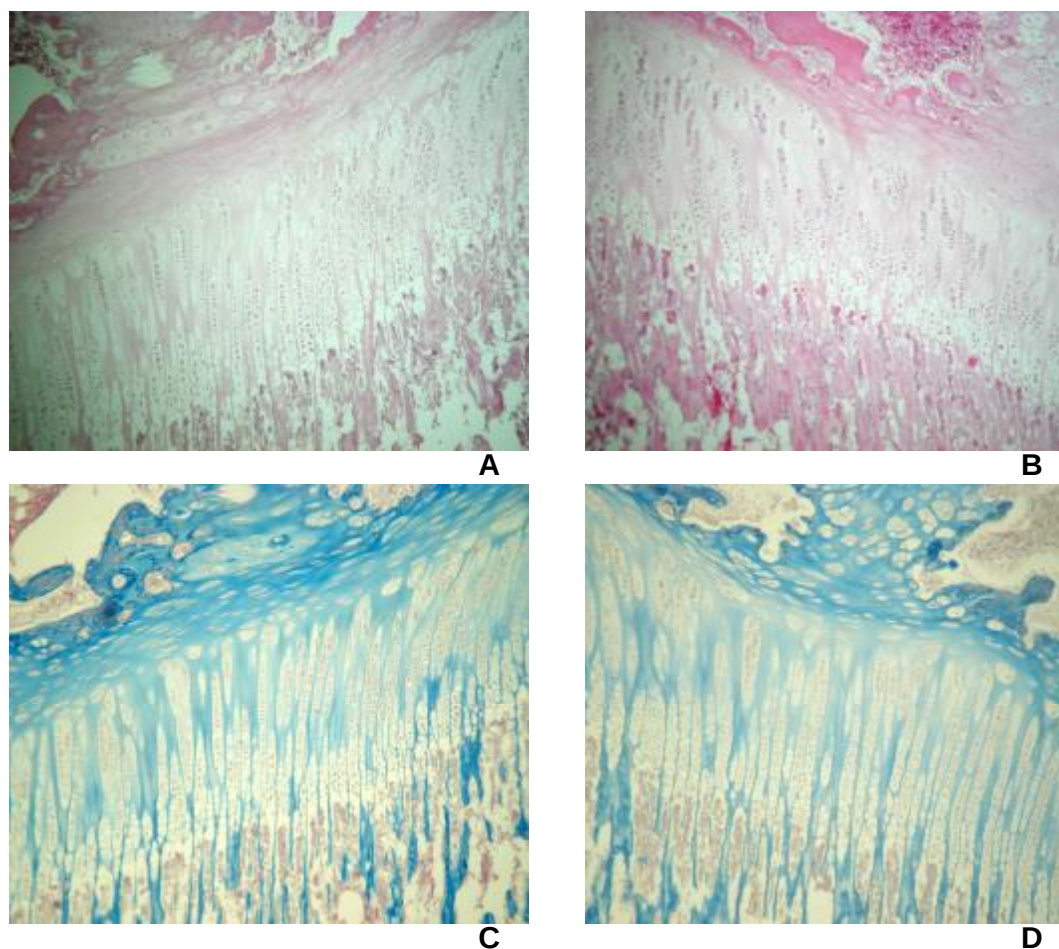
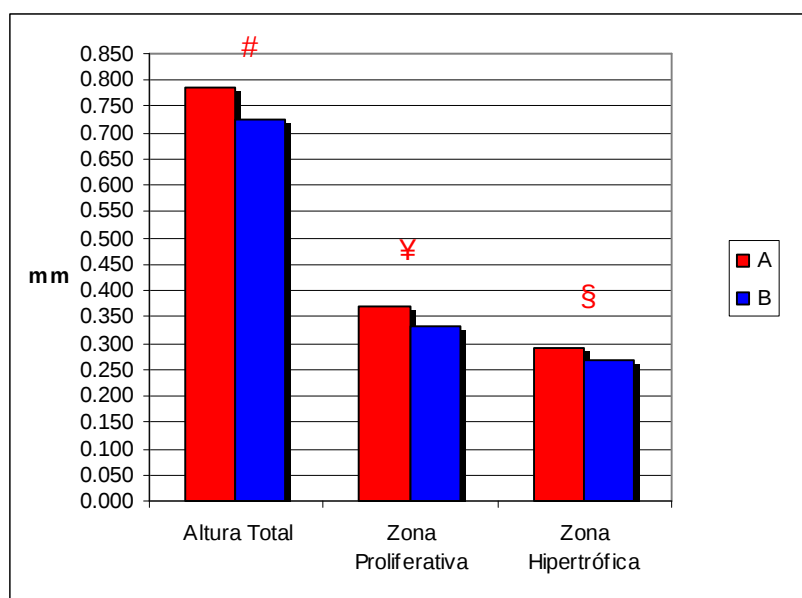


FIGURA 16 – Fotomicrografias de uma secção vertical da placa de crescimento proximal da tíbia, com magnificação de 200x: A – Coloração Hematoxilina-eosina (HE), grupo tratado TOC; B - Coloração Hematoxilina-eosina (HE), grupo controle; C - Coloração Tricrômio de Masson, grupo tratado TOC; D - Coloração Tricrômio de Masson, grupo controle

A espessura vertical média da placa de crescimento em mm mensurada foi respectivamente de $0,784 \pm 0,090$ e de $0,724 \pm 0,079$ para os membros tratados e controle. A espessura em mm da zona proliferativa da placa de crescimento foi de $0,369 \pm 0,037$ e de $0,334 \pm 0,058$, e da zona hipertrófica de $0,292 \pm 0,024$ e $0,268 \pm 0,024$ respectivamente para os membros tratado e controle, como demonstrado na Tabela 5.

As diferenças foram estatisticamente significativas, com P calculados de 0,045876 para a espessura total, de 0,030397 para a zona proliferativa e de 0,049185 para a zona hipertrófica, para um nível de significância de 5%, conforme ilustrado na Figura 17.



A – grupo tratado TOC

B – grupo controle

- diferença estatisticamente significativa, $P = 0,045876 \leq 0,05$

¥ - diferença estatisticamente significativa, $P = 0,030397 \leq 0,05$

§ - diferença estatisticamente significativa, $P = 0,049185 \leq 0,05$

FIGURA 17 – Mensuração média da espessura total da placa de crescimento e das zonas proliferativa e hipertrófica ao final do experimento (semana 9) em mm para os grupos tratado e controle

TABELA 5: Espessura total média, da zona proliferativa e da zona hipertrófica da placa de crescimento em mm no final do experimento (semana 9)

	Espessura Total	Zona Proliferativa	Zona Hipertrófica
Grupo tratado			
1 A	0,669	0,282	0,300
2 A	0,700	0,361	0,276
3 A	0,767	0,364	0,292
4 A	0,763	0,363	0,288
5 A	0,779	0,384	0,296
6 A	0,923	0,403	0,315
8 A	0,706	0,374	0,260
9 A	0,849	0,379	0,265
10 A	0,901	0,414	0,338
Média	0,784 #	0,369 ¥	0,292 §
Desvio Padrão	0,090	0,037	0,024
Grupo controle			
1 B	0,621	0,250	0,270
2 B	0,646	0,281	0,246
3 B	0,751	0,353	0,272
4 B	0,703	0,293	0,236
5 B	0,808	0,382	0,286
6 B	0,844	0,433	0,316
8 B	0,690	0,304	0,276
9 B	0,795	0,373	0,261
10 B	0,654	0,333	0,249
Média	0,724 #	0,334 ¥	0,268 §
Desvio Padrão	0,079	0,058	0,024

A – grupo tratado TOC

B – grupo controle

- diferença estatisticamente significativa, $P = 0,045876 \leq 0,05$

¥ - diferença estatisticamente significativa, $P = 0,030397 \leq 0,05$

§ - diferença estatisticamente significativa, $P = 0,049185 \leq 0,05$

4.6. AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA

Tanto as lâminas provenientes das tíbias do grupo tratado pela TOC como as tíbias do grupo controle apresentaram intensa marcação granular para o TGF- β nos condrócitos da região hipertrófica da placa de crescimento epifisária. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre a imunorreatividade para o TGF- β entre as tíbias tratadas e as tíbias consideradas como controle, como ilustrado na Figura 18.

Foi observada também uma marcação inespecífica na matriz extracelular ao redor das regiões proliferativa e hipertrófica.

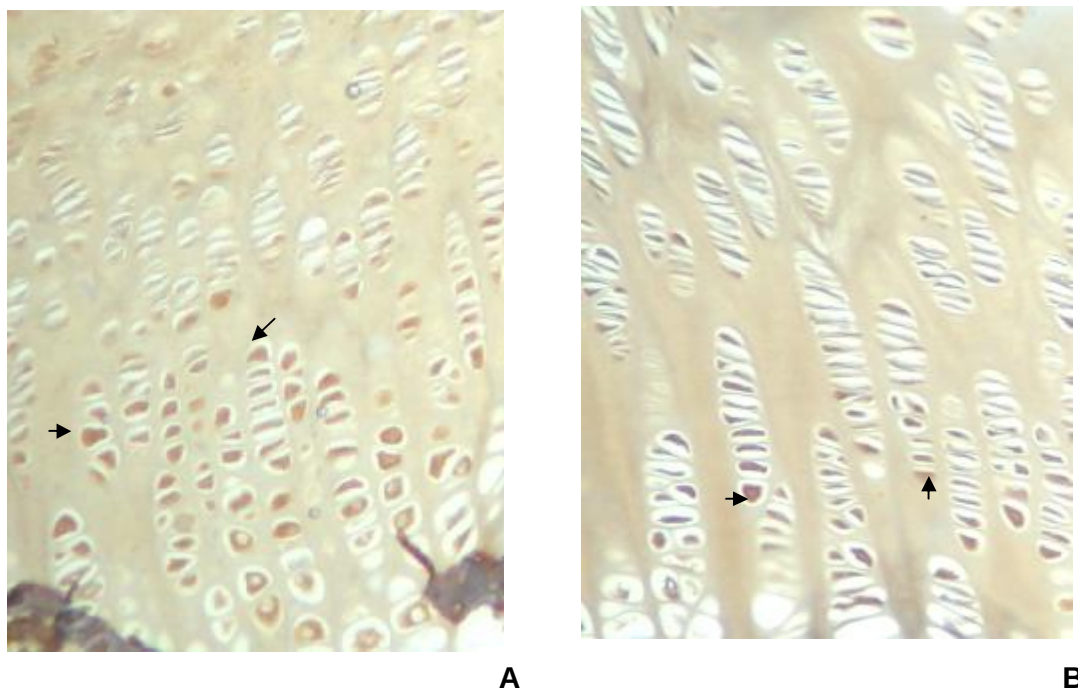


FIGURA 18 – Fotomicrografias do procedimento imuno-histoquímico para TGF- β de uma secção vertical da placa de crescimento proximal da tíbia, com magnificação de 200x: A – Grupo tratado TOC; B - Grupo controle. As setas indicam células marcadas para o TGF- β .

5. DISCUSSÃO

O coelho (*Oryctolagus cuniculus*) tem sido considerado como um modelo experimental adequado para a avaliação do crescimento ósseo, por ser um animal de ciclo de crescimento rápido, com estrutura esquelética adequada. Lerner & Kuhn (1997) e Masoud et al. (1986a, 1986b) estudaram variações do crescimento longitudinal em coelhos imaturos, relacionadas à idade.

Os coelhos da raça Nova Zelândia branca nascem pesando entre 65 e 75g, podendo alcançar um peso adulto de 4,5 a 5 kg, e maturidade esquelética com aproximadamente 24 a 28 semanas de vida (Masoud, 1986b; Lerner & Kuhn, 1997). A curva de peso médio dos animais durante o experimento está de acordo com os dados obtidos por Masoud et al. (1986b) e por Oliveira & Almeida (2002).

A placa epifisária proximal da tíbia tem seu fechamento entre 25 e 32 semanas, porém atinge 94 % do crescimento do adulto com 16 semanas (Masoud et al., 1986a; Masoud et al., 1986b, Kaweblum et al., 1994). Seinsheimer & Sledge (1981) encontraram uma taxa de crescimento da placa epifisária proximal da tíbia de coelhos de entre 34 e 36 dias de idade de 500 a 600 µm por dia, como também foi observado no estudo de Kuhn et al. (1996). Estes relatos subsidiaram a escolha da faixa etária utilizada no experimento, onde os animais permaneceram dos 35 dias de vida até os 98 dias, período que compreende a fase de crescimento rápido. Conforme citado por Hunziker et al. (1987), o processo de transformação celular e remodelamento da matriz na placa de crescimento ocorre rapidamente, com a hipertrofia de uma célula sendo estimado em doze a quinze horas.

Para maior uniformidade e facilidade de manejo do grupo experimental, optamos pela utilização somente de fêmeas, da mesma forma que nos estudos de Ross & Zions (1997), Pessina e Volpon (1999), Väterlein et al. (2000), Maier et al. (2002), Giusti (2003), Mobarakeh et al. (2005) e Castañeda et al. (2006)

O local de aplicação escolhido foi a placa de crescimento proximal da tíbia por ser superficial, de fácil localização, homogênea quanto à espessura, e por apresentar um tamanho relativamente grande, quando comparada ao tamanho

do animal, tendo sido utilizada também por Hunziker et al. (1987), Yeaman et al. (1989), Lussenhop et al. (1997), Pessina e Volpon (1999), Giusti (2003) Lyon et al. (2003) e Nassenstein et al. (2005).

Em nosso experimento, a observação dos efeitos das ondas de choque em apenas um dos lados da placa de crescimento promovendo desvio angular não foi possível, uma vez que a abrangência do foco do equipamento atingiu toda a extensão da placa de crescimento proximal da tíbia dos coelhos. Mobarakeh et al. (2005), Ross & Zions (1997) e Mac Donald et al. (1990) estudaram o efeito de diversos tratamentos na correção de deformidades angulares em modelos experimentais em coelhos. A avaliação clínica seguiu o mesmo padrão utilizado por Pasa et al. (2005), baseada na comparação do apoio do membro tratado com o contra-lateral, considerando as características do movimento e apoio do membro pélvico nos coelhos.

É importante considerar que alguns trabalhos referem somente a voltagem de carga em kV do equipamento utilizado, e atribuem efeitos biológicos, sem especificar a dose utilizada (Haupt et al., 1997; Maier et al., 2002; Martini et al., 2003), pois a voltagem de carga do equipamento não dá idéia da quantidade de energia (dose) mensurável no ponto focal das ondas de choque. Isto posto, achados contraditórios na literatura sobre os efeitos das ondas de choque no tecido ósseo podem ocorrer devido às diferentes metodologias utilizadas.

Existe uma controvérsia entre os diferentes estudos sobre o real efeito das ondas de choque na placa epifisária, além da controvérsia em relação aos protocolos utilizados, seja pela utilização de diferentes formas de mensuração da dose utilizada, pois alguns estudos utilizam como padrão o mJ/mm² e outros utilizam o kV, dificultando a comparação entre eles, seja pela diferença no número de pulsos aplicados ou número e frequência das aplicações. Novos estudos são necessários para esclarecer os efeitos deste tratamento na placa epifisária.

Esta controvérsia científica talvez possa ser atribuída a diferentes modelos experimentais e diferentes doses de ondas de choque em cada estudo, além do variado número de aplicações. Em nosso estudo seguimos a recomendação de um protocolo utilizando três aplicações de ondas de choque com um intervalo de duas semanas entre elas, conforme descrito por vários

autores para o tratamento de enfermidades ortopédicas tanto em medicina como em veterinária (Haupt, 1997; Brems et al., 1999; Krischek et al., 1998; Cosentino et al., 2001; Caminoto et al., 2003). Bathe et al. (2006) em um estudo com potros sugeriram a utilização das ondas de choque extracorpóreas para retardar o crescimento do lado onde ocorreu crescimento ósseo excessivo em potros portadores de deformidades angulares, também com a utilização de mais de uma aplicação das ondas de choque.

A dose utilizada de 0,15 mJ/mm², com 1500 pulsos por aplicação está dentro da faixa referida por outros autores, como nos estudos de Wang et al. (2002), que utilizaram a dose de 0,16 mJ/mm², com variação do número de pulsos entre 250 e 2000, de Martini et al. (2003), que tiveram aumento significativo de TGF- β , óxido nítrico e osteocalcina com 0,15 mJ/mm².

A dose escolhida de 0,15 mJ/mm² foi a máxima disponível pelo equipamento utilizado no presente estudo, considerado como de baixa energia, recomendada para a maioria das enfermidades ortopédicas em animais. Esta dose se encontra em contraste com outros pesquisadores, que utilizaram ondas de choque de alta energia, como nos estudos de Lüssenhop et al. (1997), que utilizaram 2000 e 4000 pulsos com a dose de 1,2 mJ/mm² na placa epifisária de coelhos, promovendo o seu fechamento precoce; e de Väterlein et al. (2000), que utilizaram 2000 pulsos com 1,2 mJ/mm² na articulação fêmur-tíbio-patelar de coelhos imaturos, e de Nassenstein et al. (2005), que utilizaram 0,32 mJ/mm² com 800 pulsos na placa de crescimento epifisária proximal da tíbia de coelhos imaturos. Kurzweil et al. (1988) e Van Arsdalen et al. (1991) utilizaram 1000 pulsos a 18 kV no fêmur de coelhos jovens.

De acordo com o estudo de Masoud et al. (1986b), Mac Donald et al. (1990), Kaweblum et al. (1994) Ross & Zions (1997), de Pessina e Volpon (1999) e de Mobarakeh et al. (2005), a utilização de radiografias padronizadas crânio-caudais são uma técnica adequada para a avaliação da maturidade da placa de crescimento proximal da tíbia em coelhos. Da mesma forma que no estudo de Masoud et al. (1986b) e de Lyon et al. (2003), o comprimento das tíbias foi mensurado da porção mais proximal do planalto da tíbia até seu ponto mais distal, representado pelo maléolo lateral. As mensurações obtidas tanto no grupo tratado como no grupo controle estavam de acordo com os dados de

Masoud et al. (1986b) para o comprimento das tíbias de coelhos de 14 semanas de idade.

No presente estudo, as tíbias tratadas com as ondas de choque extracorpóreas apresentaram menor comprimento em cm do que as tíbias controle, permitindo afirmar que a terapia por ondas de choque extracorpóreas reduziu o crescimento dos membros tratados. Uma avaliação com um maior número de animais, envolvendo um período de observação dos animais até o fechamento da placa epifisária poderá esclarecer se esta diferença é transitória ou definitiva. Na avaliação radiográfica, Yeaman et al. (1989), Van Arsdalen et al. (1991) e Giusti et al. (2005) também consideraram a medida do comprimento das tíbias como um parâmetro adequado para avaliação do efeito das ondas de choque extracorpóreas sobre a placa de crescimento epifisária.

No estudo de Giusti et al. (2003; 2005), houve uma diferença que não foi estatisticamente significativa, no comprimento das tíbias dos membros tratados com as ondas de choque extracorpóreas. A diferença encontrada no crescimento longitudinal das tíbias e na espessura da placa de crescimento contrasta com os resultados de Kurzweil et al. (1988) e de Van Arsdalen et al. (1991).

A interpretação das imagens radiográficas não foi suficiente para detectar diferença no grau de maturação da placa epifisária entre as tíbias dos grupos tratados e controle, conclusão semelhante à de Hernandez-Vaquero et al. (2005), motivando a utilização de métodos apropriados para a avaliação da densidade óssea, como a densitometria óptica em imagem radiográfica e a absorciometria por energia dupla de raios-X (DXA).

Na densitometria óptica em imagem radiográfica, as tíbias tratadas tiveram maior densidade em mmAl, provavelmente refletindo maior mineralização da matriz cartilaginosa, ou maior taxa de ossificação endocondral decorrente da ação das ondas de choque sobre o osso, conforme os estudos de Ogden & Kischkat (2001), Takahashi et al. (2001), Wang et al. (2002) e McClure et al. (2004), que relataram aumento de ossificação dose-dependente. Estes resultados também estão de acordo com os estudos *in vitro* de Martini et al. (2003), no qual as ondas de choque aumentaram a diferenciação de osteoblastos e, conseqüentemente a deposição de matriz óssea, e de Wang et al. (2002), no qual as ondas de choque aumentaram o

crescimento de células estromais da medula óssea e sua diferenciação em osteoprogenitores, presumivelmente pela indução de TGF- β 1.

As diferenças encontradas em nosso estudo estão de acordo com Ogden & Kischkat (2001), Takahashi et al.(2001), Wang et al. (2002) e Mc Clure et al. (2004) e em desacordo com os dados de Hubert et al. (2006), que não encontraram aumento na taxa de deposição mineral após lesões induzidas no osso de eqüinos.

O presente estudo mostrou um aumento da densidade mineral óssea mensurada através da densitometria óptica em imagem radiográfica nas tíbias tratadas, porém não temos como concluir se este aumento foi transitório, devido ao efeito direto das ondas de choque, ou se realmente será uma influência da alteração no tempo de fechamento da placa epifisária, alterando assim o crescimento ósseo, através da maturação dos condrócitos da região hipertrófica da cartilagem de crescimento epifisária, seguida pela deposição de matriz óssea.

A absorciometria de energia dupla de Raios-x (DXA) é considerada como um bom padrão para a avaliação da massa óssea e do conteúdo mineral ósseo em humanos e animais experimentais, e foi utilizada neste experimento para possibilitar a equiparação com a técnica de densitometria óptica em imagem radiográfica, que tem como vantagens o baixo custo e a possibilidade de utilização de equipamento radiográfico comum.

Foi observada na absorciometria de energia dupla de Raios-x (DXA) uma tendência à maior densidade em g/mm² da região da placa epifisária das tíbias tratadas com as ondas de choque extracorpóreas de baixa energia (0,15 mJ/mm²), em relação às tíbias do grupo controle, apesar desta diferença não ter sido estatisticamente significativa. Na análise dos resultados da DXA, o animal de número nove foi o único que não seguiu a tendência ao aumento da densidade mineral óssea (DMO) na placa epifisária proximal das tíbias tratadas pela TOC, influenciando o resultado da análise estatística. A escolha dos parâmetros técnicos utilizados foi baseada na recomendação do manual do fabricante do equipamento para animais experimentais. Estas aquisições de imagem não puderam ser repetidas em outro momento devido à colheita de material para análise histopatológica e à eutanásia dos animais.

Takahashi et al. (2001) utilizaram a DXA para avaliação do efeito das ondas de choque na osteogênese, demonstrando maior conteúdo mineral ósseo (CMO) nos fêmures tratados. Wang et al. (2004) demonstraram um efeito de aumento da densidade mineral óssea (DMO) em coelhos de acordo com a dose aplicada, com significância estatística para a dose mais alta, de 4000 pulsos e 0,47 mJ/mm², e com tendência ao aumento na dose mais baixa, de 2000 pulsos a 0,18 mJ/mm². Estes estudos atestam a necessidade de definição de uma dose e nível energético adequados para cada um dos efeitos biológicos desejados das ondas de choque.

A avaliação histológica seguiu o mesmo padrão relatado por Yeaman et al. (1989), Lyon et al. (2003), e por Seinsheimer & Sledge (1981), utilizando como referências para a mensuração a espessura total da placa de crescimento entre os pontos proximal e distal de cartilagem intacta, da região logo abaixo do osso subcondral até o septo transversal do último condrócito hipertrófico, antes da região da invasão vascular.

A espessura da placa de crescimento epifisária em coelhos tem discreto aumento do nascimento até a terceira semana de vida, quando progressivamente diminui até a maturidade esquelética, conforme relatado por Masoud et al. (1986a), com redução de 25% de 3 a 8 semanas de vida, e 37% de diminuição da placa entre 8 e 16 semanas de idade. As dimensões da epífise, incluindo sua espessura, são então determinadas logo no início do período pós-natal, com o tempo subsequente até a maturidade esquelética utilizado para a maturação tecidual, com a substituição da cartilagem por osso (Masoud et al., 1986a).

A relação destes parâmetros histomorfométricos com o crescimento longitudinal pode ser utilizada para explicar alguns dos efeitos dos tratamentos que tem como alvo a placa de crescimento epifisária. À medida que a taxa de crescimento diminui, a espessura da placa de crescimento também é reduzida, conforme o processo de ossificação endocondral, e conseqüentemente do crescimento longitudinal. Não foi possível contar precisamente o número de células da zona proliferativa, pois poucos cortes histológicos incluíram uma coluna completa de células. Por isso, a espessura da zona proliferativa foi mensurada, corroborando o estudo de Seinsheimer & Sledge (1981), que encontraram excelente relação entre a espessura da região proliferativa e a

taxa de crescimento ósseo. Kuhn et al. (1996) demonstraram a relação entre o volume e espessura da camada de condrócitos hipertróficos e a taxa de crescimento em coelhos. Yeaman et al. (1989) também consideraram a espessura da placa de crescimento como um parâmetro adequado para a avaliação do efeito das ondas de choque na placa de crescimento.

Em nosso estudo, assim como no estudo de Hunziker et al. (1987), a histomorfometria foi realizada a partir de fotomicrografias com magnificação padronizada, e a espessura de cada zona foi estimada também a partir da média de três medidas de cada lâmina, em pontos diferentes no mesmo campo da placa epifisária. A utilização de programas computacionais de análise de imagens para histomorfometria à partir de fotomicrografias digitalizadas foi citada nos dados de Yeaman et al. (1989), Kuhn et al. (1996), Pessina e Volpon (1999), Lyon et al. (2003) e de Giusti (2003).

No presente estudo ocorreu uma diferença estatisticamente significativa entre a espessura de cada uma das regiões da placa de crescimento do grupo tratado em relação ao controle, que apresentaram maior espessura total e das regiões proliferativa e hipertrófica. Este resultado também foi encontrado nos dados de Seinheimer & Sledge, (1981), Kuhn et al. (1996) e de Wilsman et al. (1996), que relacionaram a espessura ou volume das camadas de células da placa de crescimento epifisária com a taxa de crescimento longitudinal dos ossos longos.

A presença em nosso estudo de uma maior espessura da placa de crescimento nos membros tratados pode sugerir um retardo neste processo fisiológico de redução da espessura associada ao crescimento longitudinal da tíbia, o que explicaria também o menor crescimento do grupo tratado. Em nossas condições experimentais, não tivemos como avaliar estes animais até o fechamento da placa de crescimento, o que possibilitaria concluir se este efeito é somente um retardo temporário, que sofreria efeito de crescimento compensatório, conforme descrito por Raab et al. (2001), ou se estas alterações no crescimento seriam permanentes, resultando em diferença no comprimento dos membros no período de maturidade esquelética, o que foi levantado por Ross & Zions (1997) em seu estudo comparando diferentes técnicas de inibição do crescimento epifisário em coelhos.

O fato de encontrarmos diferença no crescimento longitudinal das tíbias e na espessura da placa de crescimento contrasta com os resultados de Kurzweil et al. (1988) e de Van Arsdalen et al. (1991), que não encontraram alterações nos membros imaturos de coelhos após a aplicação de 1000 ondas de choque extracorpóreas com uma dose de 18 kV. Nassenstein et al. (2005) em um estudo histomorfológico também não encontraram diferenças entre as tíbias tratadas e as consideradas como controle de coelhos imaturos, com a aplicação de 800 pulsos e dose de 0,32 mJ/mm², e avaliação histológica em três momentos. Väterlein et al. (2000) não encontraram alterações histológicas e radiográficas após a aplicação de 2000 pulsos na dose de 1,2 mJ/mm² na cartilagem articular do fêmur de coelhos imaturos.

Da mesma forma que no presente estudo, Yeaman et al. (1989) tiveram um menor comprimento dos ossos tratados com as ondas de choque extracorpóreas. As diferenças na espessura da placa de crescimento contrastam com os resultados destes autores, onde a diferença de espessura da placa de crescimento de ratos não foi significativa, porém ocorreram lesões em 44% das tíbias tratadas com 1500 pulsos e dose de 20 kV, e foi considerada como possível maturação precoce da placa de crescimento.

De acordo com os dados de Kuhn et al. (1996) o crescimento ósseo depende de parâmetros diferentes em cada período do desenvolvimento, sendo que no período inicial de crescimento pós-natal o principal fator é a altura das células, e à medida que ocorre a progressão do desenvolvimento, diversas variáveis como a altura, volume e taxa de proliferação celular passam a ser importantes. Além disso, devem ser consideradas as diferenças tanto entre as espécies como entre diferentes placas de crescimento de um mesmo animal.

Devemos também considerar as observações de Mac Donald et al. (1990) que demonstraram a existência de interdependência entre as epífises proximal e distal de um mesmo osso, podendo ocorrer um mecanismo compensatório de alteração da taxa de crescimento da epífise não tratada.

Nosso estudo experimental foi baseado nos resultados de Mac Donald et al. (1990), Lyon et al. (2003) e Mobarakeh et al. (2005), que não acompanharam o grupo experimental até o fechamento da epífise tratada. Novos estudos com um grupo experimental controlado até o fechamento da

placa epifisária são necessários para que estas questões possam ser esclarecidas.

Na imuno-histoquímica para o TGF- β não foram encontradas diferenças significativas de imunorreatividade entre os dois grupos, e a marcação para o TGF- β foi predominante nos condrócitos da região hipertrófica, e no final da região proliferativa, além de uma marcação inespecífica na matriz extracelular ao redor das regiões proliferativa e hipertrófica, fato que difere do padrão descrito por Flanders et al. (1989), e por Jingushi et al. (1995) que demonstraram a expressão do TGF- β na placa de crescimento de ratos, com uma forte marcação intracelular nos condrócitos das regiões proliferativa e hipertrófica, e marcação na matriz extracelular principalmente ao redor dos condrócitos hipertróficos. Estas diferenças no padrão de marcação podem ter ocorrido pela diferença do anticorpo utilizado, pois nos estudos de Flanders et al. (1989) e de Jingushi et al. (1995) foi utilizado um anticorpo experimental desenvolvido pelo grupo, e no presente experimento foi utilizado um anticorpo monoclonal de marcação citoplasmática disponível no mercado.

Os achados do presente estudo indicam que os condrócitos hipertróficos e em proliferação secretam TGF- β na matriz extracelular, ao seu redor, sugerindo o estímulo da proliferação e diferenciação fenotípica dos condrócitos da placa de crescimento, corroborando os dados de Janssens et al. (2005).

Em nosso estudo, embora esperássemos um aumento da marcação do TGF- β no membro tratado, baseado em resultados de experimentos anteriores (Caminoto et al., 2005), não foi observada diferença significativa da expressão do TGF- β entre o grupo tratado e o grupo controle. O TGF- β é um dos principais fatores de crescimento responsáveis pela regulação da placa de crescimento epifisária, e se mostrou presente em ambos os grupos. Esperávamos que as ondas de choque provocassem um aumento no TGF- β , acentuando ainda mais seus efeitos, o que não pôde ser comprovado nas condições experimentais do presente estudo.

O mecanismo pelo qual o TGF- β induz a condrogênese, e a extensão de seus efeitos ainda não são totalmente esclarecidos, porém de acordo com o relato de Ahn et al. (2004) está claro que o TGF- β desempenha um papel

importante na condrogênese e no estímulo da produção de proteoglicanos pelos condrócitos.

Nossa avaliação imuno-histoquímica para a presença do TGF- β foi realizada em um único momento, quatro semanas após a última aplicação das ondas de choque extracorpóreas, todavia podem ter ocorrido diferenças na distribuição do TGF- β em outros momentos, porém as condições experimentais não possibilitaram esta avaliação. São necessários novos estudos, com um número maior de animais e com avaliações para a localização do TGF- β seriadas, iniciando logo após a aplicação das ondas de choque extracorpóreas, para possibilitar a avaliação da influência deste fator de crescimento nas alterações notadas na placa de crescimento epifisária após o tratamento.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nas condições experimentais do presente estudo permitem concluir que:

1. As ondas de choque extracorpóreas causaram, ao final do experimento, um aumento na espessura da placa de crescimento epifisária, tanto na espessura total, quanto na espessura das zonas proliferativa e hipertrófica.
2. As ondas de choque extracorpóreas proporcionaram ao final do experimento, a diminuição do comprimento das tíbias tratadas, em relação ao controle.
3. As ondas de choque extracorpóreas promovem o aumento de densidade mineral óssea, ao utilizar a avaliação por meio da densitometria óptica em imagem radiográfica.
4. Novos estudos são necessários para a padronização da técnica de utilização da terapia por ondas de choque extracorpóreas na placa epifisária, observando a controvérsia científica existente em relação à mensuração da dose utilizada em cada protocolo, pois alguns estudos utilizam como padrão o mJ/mm^2 e outros utilizam o kV, dificultando a comparação entre eles, seja pela diferença no número de pulsos aplicados ou número e frequência das aplicações

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹⁸

- AHN, J. I. et al. Stem cell repair of physeal cartilage. **J. Orthop. Res.**, v.22, p. 1215-1221, 2004.
- ANDERSON, H. C. Biology of disease: mechanism of mineral formation in bone. **Lab. Invest.**, v.60, n.3, p.320–330, 1989.
- BALLOCK, R. T.; O'KEEFE, R. J. The biology of growth plate. **J. Bone Joint Surg.**, v.85, n.4, p.715–726, 2003.
- BANKS, W. J. **Histologia veterinária aplicada**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1992. 658 p.
- BÄR, K. et al. Extrakorporale stosswellentherapie in der veterinärmedizin. **Tierärztl. Prax.**, v.28-G, p.119–123, 2000.
- BATHE, A. P.; ROWLANDS, D. S.; BOENING, K. J. Treatment of angular limb deformities using radial extracorporeal shockwave therapy: a prospective clinical trial. In: WORLD EQUINE VETERINARY ASSOCIATION CONGRESS, 9., 2006, Marrakech. **Proceedings...** Rabat, 2006. p.167-168.
- BRADEN, T. D. Histophysiology of the growth plate and growth plate injuries. In: BOJRAB, M. J. (ed.). **Disease mechanisms in small animal surgery**. 2. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1993. p. 1027-1041.
- BERTONE, A. L.; TURNER, A. S.; PARK, R. D. Periosteal transection and stripping for treatment of angular limb deformities in foals: clinical observations. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.187, n.2, p.145-152, 1985.
- BREMS, R.; CARTANJEN, B.; KAMINSKI, M. Shockwave therapy: a promising and gentle therapy method for the treatment of orthopedic disorders. In: WORLD EQUINE VETERINARY ASSOCIATION CONGRESS, 6., 1999, Paris. **Proceedings...** Paris, 1999. 1 CD-ROM.
- BONEWALD, L. F.; MUNDY, G. R. Role of transforming growth factor beta in bone remodelling: a review. **Connect. Tiss. Res.**, v.23, n.3, p.201-208, 1989.
- BORDER, W. A.; RUOSLAHTI, E. Transforming growth factor- β in disease: the dark side of tissue repair. **J. Clin. Invest.**, v. 90, p. 1-7, 1992
- CALLEGARI-JACQUES, S. M. **Bioestatística: Princípios e aplicações**. 1.ed. Porto Alegre: Artmed, 2003. 255p.

¹⁸ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação – Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2002, 24p.
BIOSIS. **Serial sources for the BIOSIS preview database**. Philadelphia, 1996. 468 p.

CAMINOTO, E. H. et al. Ultrastructural and immunocytochemical evaluation of the effects of extracorporeal shock wave treatment in the hind limbs of horses with experimentally induced suspensory ligament desmitis. **Am. J. Vet. Res.**, v.68, n.5, p.892-896, 2005.

CAMINOTO, E. H. et al. Estudo retrospectivo da terapia de ondas de choque radiais extracorpóreas (RSWT) no tratamento de condições ortopédicas em 103 eqüinos no Brasil. In: CICADE - CONFERENCIA INTERNACIONAL DE CABALLOS DE DEPORTE, 3., 2003, Curitiba. **Proceedings...** Essen, 2003. 1 CD-ROM.

CASTAÑEDA, S. et al. Bone mineral measurements of subchondral and trabecular bone in healthy and osteoporotic rabbits. **Skelet. Radiol.**, v.35, p.34-41, 2006.

CHEN, J. Y. J. et al. Extracorporeal shockwave promotion of osteogenic cells proliferation and bone related proteins expression. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR MUSCULOSKELETAL SHOCKWAVE THERAPY, 4., 2001, Berlin. **Proceedings** ... Berlin, 2001. 1 CD-ROM.

COSENTINO, R. et al. Efficacy of extracorporeal shockwave treatment in calcaneal enthesophytosis. **Ann. Rheum. Dis.**, v.60, p.1064-1067, 2001.

DELIUS, M. et al. Biological effects of shock waves: in vivo effect of high energy pulses on rabbit bone. **Ultrasound Med. Biol.**, v.21, p.1219-1225, 1995.

DOROTKA, R.; et al. Effects of extracorporeal shock waves on human articular chondrocytes and ovine bone marrow stromal cells in vitro. **Arch. Orthop. Trauma Surg.** V.123, p.345-348, 2003.

EINGARTNER, C. et al. Growth factors in distraction osteogenesis: imuno-histological pattern of TGF- β 1 and IGF-I in human callus induced by distraction osteogenesis. **Int. J. Orthop.**, v.23, n.5, p.253-259, 1999.

FLANDERS, K. C. et al. Transforming growth factor- β 1: histochemical localization with antibodies to different epitopes. **J. Cell Biol**, v.108, n.2, p.653-660, 1989. Disponível em: <<http://jcb.org>> Acesso em: 15 dez. 2006.

GHARARY, A. et al. Cell proliferating effect of latent transforming rowth factor- β 1 is cell membrane dependent. **Wound Repair Regen.**, v.10, n.5, p.328-335, 2002.

GIMENO, E. J.; MASSONE, A. R.; PORTIANSKY, E. L. Introducción a las técnicas de inmunohistoquímica y aplicaciones en patología veterinaria. In: CURSO INTERNACIONAL DE POSGRADO EM TECNICAS DE INMUNOHISTOQUIMICA, LECTINHISTOQUIMICA Y MICROSCOPIA ELECTRONICA, 14., 2002, La Plata. **Proceedings...** La Plata, 2002. 1 CD-ROM.

GIUSTI, G. et al. Efeito de ondas de choque na placa de crescimento de coelhos. **Acta Ortop. Bras.**, v.13, n.1, p.31–34, 2005.

GIUSTI, G. **Efeito de ondas de choque na placa de crescimento de coelhos**. São Paulo, 2003 55p. Dissertação (Mestrado). Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo.

GODOY, C. L. B, et al., Valores normais da densidade mineral óssea do osso acessório do carpo em eqüinos da raça Brasileiro de Hipismo (BH) determinada por meio da densitometria óptica em imagem radiográfica. **Cienc. Rural**, v.35, n.3, p.607-610, 2005.

GREET, T. R. C. Managing angular and flexural deformities: the newmarket perspective. In: AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS ANNUAL CONVENTION, 46., 2000, San Antonio. **Proceedings...**Lexington, 2000. p. 130 - 136.

GRIER, S. J.; TURNER, A. S.; ALVIS, M. R. The use of dual-energy X-ray absorptiometry in animals. **Invest. Radiol.**, v.31, n.1, p.50–62, 1996.

HAMANISHI, C. et al. Bone mineral density of lengthened rabbit tibia is enhanced by transplantation of fresh autologus bone marrow cells. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, v.303, p.250-255, 1994.

HAUPT, G. Use of extracorporeal shock waves in the treatment of pseudarthrosis, tendinopathy and other orthopedic diseases. **J. Urol.**, v.158, p.4–11, 1997.

HERNANDEZ-VAQUERO, D. et al. Measurement of bone mineral density is possible with standard radiographs: a study involving total knee replacement. **Acta Orthop. Scand.**, v. 76, n. 6, p. 791-795, 2005.

HUBERT, J. D. et al. Effect of extra-corporeal shock wave energy on mineral apposition rate in healing equine third metacarpal bone. . In: WORLD EQUINE VETERINARY ASSOCIATION CONGRESS, 9., 2006, Marrakech. **Proceedings...** Rabat, 2006. p.169-170.

HUNZIKER, E. B., et al. Quantitation of chondrocyte performance in growth-plate cartilage during longitudinal bone growth. **J Bone Joint Surg.**, v.69-A, n.2, p.162-173, 1987.

IKEDA, K.; KATSURO, T.; TAKAYAMA, K. Application of extracorporeal shock wave on bones: preliminary report. **J. Trauma**, v.47, p.946, 1999.

JANSSENS, K.; et al. Transforming growth factor- β 1 to the bone. **Endocrine Rev.**, v.26, n.6, p.743-774, 2005.

JINGUSHI, S. et al. Transforming growth factor- β 1 and fibroblast growth factor in rat growth plate. **J. Orthop. Res.**, v.13, n.5, p.761-768, 1995.

KAULESAR SUKUL, D. M. K. S. et al. The effect of high energy shock waves focused on cortical bone: an *in Vitro* study. **J. Surg. Res.**, v.54, p.46-51, 1993.

KAWEBLUM, M. et al. Histological and radiographic determination of the age of physeal closure of the distal fêmur, proximal tibia and proximal fibula of the New Zealand white rabbit. **J Orthop. Res.**, v.12, n.5, p.747-749, 1994.

KRISCHEK, et al. Symptomatische niedrig-energetische stoßwellentherapie bei fersenschmerzen und radiologisch nachweisbarem plantaren fersensporn, **Z. Orthop.**, v.136, p.169-174, 1998.

KUHN, J. L.; DELACEY, J. H.; LEENELLETT, E. E. Relation between bone growth rate and hypertrophic chondrocyte volume in New Zealand white rabbits of varying ages. **J. Orthop. Res.**, v.14, n.5, p.706-711, 1996.

KURZWEIL, S. J.; SMITH, J. E.; VAN ARSDALEN, K. Effect of extracorporeal shock waves on skeletal and renal growth in the infant rabbit. **J. Urol.** v.325, p.649, 1988.

LERNER, A. L.; KUHN, J. L. Characterization of regional and age-related variations in the growth of the rabbit distal fêmur. **J. Orthop. Res.**, v.15, n.3, p.353-361, 1997

LEPAGE, O.M.; CARSTANJEN, B.; UEBELHART, D. Non-invasive assessment of equine bone: an update. **Vet. J.**, v.161, p.10-23, 2001.

LÜSSENHOP, S. et al. The influence of shock-waves on epiphyseal growth plates: first results of an in-vivo study with rabbits. In: SIEBERT, W.; BUCH, M.(eds.). **Extracorporeal shockwaves in orthopedics**. Berlin: Springer, 1997. p.109-118.

LYON, R.; LIU, X. C.; MEIER, J. The effects of therapeutic vs. High-intensity ultrasound on the rabbit growth plate. **J. Orthop. Res.**, v.21, p. 865-871, 2003.

MAC DONALD, J. W. et al. The relationship between periosteal division and compression or distraction of the growth plate. **J. Bone Joint Surg.**, v.72-B, n.2, p.303-308, 1990.

MAIER, M. et al. Influence of extracorporeal shock-wave application on normal bone in an animal model *in vivo*: scintigraphy, MRI and histopathology. **J. Bone Joint Surg.**, v.84-B, n.4, p.592-599, 2002.

MARTINI, L. et al. Effect of extracorporeal shock wave therapy on osteoblastlike cells. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, v.413, p.269-280, 2003.

MASOUD I. et al. Tibial epiphyseal development: a cross-sectional histologic and histomorphometric study in the New Zealand white rabbit. **J Orthop Res.**, v.4, n.2, p. 212-220, 1986a.

- MASOUD I. et al. A longitudinal study of the growth of the New Zealand white rabbit: cumulative and biweekly incremental growth rates for body length, body weight, femoral length, and tibial length. **J Orthop Res.**, v.4, n.2, p.221-231, 1986b.
- MC CLURE, S. R.; VAN SICKLE, D.; WHITE, M. R. Effects of extracorporeal shock wave therapy on bone. **Vet. Surg.**, v.33, p.40-48, 2004.
- MC CLURE, S. R. et al. Evaluation of dual energy x-ray absorptiometry for *in situ* measurement of bone mineral density of equine metacarpal, **Am. J. Vet. Res.**, v.62, n.5, p.752-756, 2001.
- MITTEN, L. A.; BERTONE, A. L. Angular limb deformities in foals. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.204, n.5, p. 717–720, 1994.
- MOBARAKEH, M. K. et al. A new reversible method of epiphyseodesis – An experimental study in rabbits. **Am. J. Applied Sci.** v.2, n.6, p.1082-1085, 2005.
- NASSENSTEIN, K.; NASSENSTEIN, I. SCHLEBERGER, R. Wirkung hochenergetischer extrakorporaler stoßwellen auf wachstumsfungen – eine histomorphologische studie. **Z. Orthop.**, v.143, p.652-655, 2005.
- OGDEN, J. A.; KISCHKAT, A. T. Principles of shock wave therapy. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, v.387, p.8-17, 2001.
- OLIVEIRA, M. C.; ALMEIDA, C. V. desempenho de coelhos em crescimento criados em diferentes densidades populacionais. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v.54, n.5, 2002. Disponível em: <<http://www.scielo.br/scielo.php...>> Acesso em 24 out. 2006.
- PANIAGUA, J. G. et al. Bone mass assessment in rats by dual energy X-ray absorptiometry. **Br. J. Radiology**, v.71, p.754-758, 1998.
- PASA, L. et al. Experimental meniscal allografts in the rabbit. **Acta Vet. Brno**, v.74, p. 87-95, 2005.
- PESSINA, A. L.; VOLPON, J. B. Aplicação de ultra-som terapêutico na cartilagem de crescimento do coelho. **Rev. Bras. Ortop.**, v.34, n.5, p.347-354, 1999.
- PETRIE, A.; WATSON, P. **Statistics for veterinary and animal science.** Oxford: Blackwell, 1999, 242 p.
- PRADO FILHO, J. R. C.; STERMAN, F. A. Avaliação da densidade mineral óssea em potros da raça Puro Sangue Inglês em início de treinamento. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v.41, n.6, p.384-388, 2004.
- RAAB, P. et al.. Correction of length discrepancies and angular deformities of the leg by blount's epiphyseal stapling. **Eur. J. Pediatric.**, v.160, p.668–674., 2001.

RAHAL, S.C. et al. Densitometria óptica radiográfica na avaliação do hiperparatireoidismo secundário nutricional induzido em gatos jovens. **Cienc. Rural**, v.32, n.3, p.421–425, 2002.

READ, E. K. et al. Effect of hemi-circumferential periosteal transection and elevation in foals with experimentally induced angular limb deformities. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.221, n.4, p.536-540, 2002.

ROBERTSON Jr., W. W. Newest knowledge of the growth plate. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, v.253, p.270-278, 1990.

ROMPE, J. D. et al. Dose-related effects of shock waves on rabbit tendo Achillis. **J. Bone Joint Surg.**, v.80-B, n.3, p.546-552, 1998.

ROMPE, J. D. et al. Extrakorporale stosswellentherapie in der orthopädie. **Fortschr. Med.**, v.18, p.26–33, 1997.

ROSS, T. K.; ZIONTS, L. E. Comparison of different methods used to inhibit physeal growth in a rabbit model. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, v.340, p.236-243, 1997.

SCHADEN, W.; FISCHER, A.; SAILLER, A. Extracorporeal shock wave therapy of nonunion or delayed osseous union. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, v.387, p.90-94, 2001.

SEINSHEIMER, F.; SLEDGE, C. B. Parameters of longitudinal growth rate in rabbit epiphyseal growth plates. **J. Bone Joint Surg.**, v.63-A, n.4, p.627-630, 1981.

SIEBERT, W.; BUCH, M. **Extracorporeal shock waves in orthopaedics**. Berlin: Springer-Verlag, 1997. 245p.

SLONE, D. E.; ROBERTS, C. T.; HUGHES, F. E. Restricted exercise and transphyseal bridging for correction of angular limb deformities. In: AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS ANNUAL CONVENTION, 46., 2000, San Antonio. **Proceedings...**Lexington, 2000. p.126-127.

SPEER, D. P. The growth plate: Structure and function. In: DEE, R.; MANGO, E.; HURST, L. C.(eds.). **Principles of orthopedic practice**. New York: Mc Graw Hill, 1989. p. 96-109.

STASHAK, T.S. **Adam's Lameness in horses**. 5.ed. Philadelphia: Williams & Wilkins, 2001. 1174p.

STOKES, I. A. F. et al. Endochondral growth in growth plates of three species at two anatomical locations modulated by mechanical compression and tension. **J. Orthop. Res.**, 2006. Disponível em: <<http://www.interscience.wiley.com>> Acesso em: 15 nov. 2006.

TAKAHASHI, K. et al. Gene expression of extracellular matrix protein in shockwaves-induced osteogenesis in rats. In: ANNUAL MEETING FOR ORTHOPAEDIC RESEARCH SOCIETY, 47., 2001, San Francisco. **Proceedings...**San Francisco, 2001. p.532.

THOMPSON, N. L. et al. Expression of transforming growth factor- β 1 in specific cells and tissues of adult and neonatal mice. **J. Cell. Biol.** v.108, n., p.661-669, 1989.

VALCHANOU, V. D.; MICHAÏLOV, P. High energy shock wave in the treatment of delayed and nonunion of fractures. **Int. Orthop.**, v.15, p. 181-184, 1991.

VAN ARSDALEN, K. N. et al. Effect of lithotripsy on immature rabbit bone and kidney development. **J. Urol.**, v.146, p.213-216, 1991.

VAN DER EERDEN, B. C. J.; KARPERIEN, M.; WIT, J. M. Systemic and local regulation of the growth plate. **Endocr. Rev.**, v.24, n.6, p.782–801, 2003.

VÄTERLEIN, N. et al. The effect of extracorporeal shock waves on joint cartilage – an in vivo study in rabbits. **Arch. Orthop. Trauma Surg.**, v.120, p.403–406, 2000.

VULCANO, L. C. et al. Padronização da densidade mineral óssea (BMD) do acessório do carpo em equinos atletas da raça Quarto de Milha. **Cienc. Rural**, v.36, n.2, p.520-524, 2006.

VULCANO, L. C.; SANTOS, F. A. M, Determination and padronization of normal values of bone mineral density (BMD) of the acessory carpus bone in young Thorouhbred horse using optical densitometry in radiographic image. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v.40, supl.1, p.54-61, 2003.

VULCANO, L.C. et al. Valores normais da densidade óssea do carpo ulnar em potros em crescimento da raça Quarto de Milha através da densitometria óptica radiográfica. **A Hora Vet.**, v. 100, p.52–54, 1997.

WANG, C. J. Shock wave treatment shows dose-dependent enhancement of bone mass and bone strenght after fracture of the fêmur. **Bone**, v.34, p.225-230, 2004.

WANG, C. J. et al. Treatment of nonunions in long bone fractures with shock waves. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, v.387, p.95–101, 2001.

WANG F. S. et al. Extracorporeal shock wave promotes growth and differentiation of bone-marrow stromal cells towards osteoprogenitors associated with induction of TGF-[beta]1. **J Bone Joint Surg.**, v.84-B, n.3, p.457–461, 2002.

WANG, F. S.; KEUNDER, K. D.; WANG, C. J. Transforming growth factor beta 1 involved in extracorporeal shock wave promotion of bone marrow mesenchymal osteoprogenitors growth. In: CONGRESS OF THE

INTERNATIONAL SOCIETY FOR MUSCULOSKELETAL SHOCK WAVE THERAPY, 3., 2000, Naples. **Proceedings...** Naples, 2000. p.99.

WILSMAN, N. J.; et al. Cell cycle analysis of proliferative zone chondrocytes in growth plates elongating at different rates. **J. Orthop. Res.**, v.14, n.4, p.562-572, 1996.

YEAMAN, L. D.; JEROME, C. P.; MC CULLOUGH. Effects of shock waves on the structure and growth of immature rat epiphysis. **J. Urol.**, v.141, n.3, p.670-674, 1989.

8. TRABALHO CIENTÍFICO

Trabalho enviado para a revista **American Journal of Veterinary Research:**

EFFECT OF EXTRACORPOREAL SHOCK WAVE THERAPY ON TIBIAL EPYPHISEAL GROWTH PLATE IN RABBITS

Elisa H. Caminoto, M.V., PhD ^{1*}

Ana L. G. Alves, M.V., PhD ¹

Luis C. Vulcano, M.V., PhD ¹

Vânia M. V. Machado, M.V., PhD ¹

Debora, A. P. C. Zuccari, M.V., PhD ²

Altamir Santos, M.D., MSc ³

1. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ –UNESP – Botucatu – SP,
Brazil

2. Faculdade de Medicina – FAMERP – São José do Rio Preto – SP, Brazil

3. Faculdade de Medicina – FMB –UNESP – Botucatu – SP, Brazil

* Corresponding author. E-mail: caminoto@uol.com.br , Address: R Orlando Barbato,
720 São José do Rio Preto – SP CEP 15061-718, Brazil

This manuscript represents a portion of a thesis submitted by the first author to the
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu, Brazil, as a partial
fulfillment of the requirements for PhD degree.

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to evaluate the effects of the extracorporeal shock wave therapy on the tibial proximal epiphyseal growth plate in young rabbits.

Animals: Ten rabbits.

Procedure: Rabbits were submitted to extracorporeal shock wave therapy in the right tibial proximal epiphyseal growth plate, three treatments, with interval of two weeks. The left hind limb was untreated as control. The evaluations were done through x-rays and optical densitometry, and at the end of the study dual energy x-ray absorptiometry evaluation and histopathology were done.

Results: Extracorporeal shock wave therapy caused increased height of the epiphyseal growth plate, reduction on tibial total length and increased bone mineral density evaluated through optical radiographic densitometry in mmAl.

Conclusions and Clinical Relevance: The results obtained in the experimental conditions of this study allowed concluding that the extracorporeal shock waves have effects on the rabbit growth plate, as the increase in height of the growth plate, the increase in bone mineral density in mmAl and the decreased length of the treated tibias, when compared to control. These results indicate that extracorporeal shock wave therapy may be useful in the treatment of condition involving the growth plate, like angular deformities.

Key words: Growth plate; Rabbit; ESWT; Shock waves; Densitometry.

INTRODUCTION:

Long bone growth occurs at the epiphyseal growth plate, and is the result of a series of biological processes precisely orchestrated and rigorously regulated, named

osteochondral ossification, involving chondrocyte proliferation and differentiation that culminates in the formation of a calcified cartilaginous matrix subsequently resorbed and substituted for lamellar bone ¹.

As the skeleton matures, the longitudinal growth and chondrocyte proliferation rates diminishes, associated with structural alterations of the growth plate that includes a gradual decline in height of proliferative and hypertrophic zones, as reduction in size and density of hypertrophic cell columns. At puberty, in humans and other mammals, growth plate is completely resorbed, resulting in fusion of epiphysis to metaphysis.¹

Angular deformities are medial or lateral deviation of the long axis of the limb, which occurs frequently in equine and other mammals, including humans.^{2, 3, 4}

Under a clinical perspective, the goal of the treatment of an angular deformity must be the alteration of the growth rate in a single side of the growth plate.⁵

Extracorporeal shock wave therapy (ESWT) is an emerging technology that has been used for orthopedic treatments in human and veterinary ^{6, 7} medicine, and may represent an option as a new treatment for angular deformities.⁸ There are only few studies reporting the effects of extracorporeal shock waves on growth plate, with controversial results.^{8, 9, 10, 11, 12, 13, 14,}

The aim of this study was to evaluate the possible alterations in long bone growth induced by the extracorporeal shock wave treatment, considering the positive results found by some researchers in bone.

MATERIALS AND METHODS

This study was approved by the Ethics in Animal Experimentation Committee of UNESP- Botucatu under protocol number 132/2006. Nine 35 days old female New Zealand White rabbits were included in the study. They were housed in a well ventilated

room, with water and commercial rabbit food *ad libitum*, changed every day, with natural illumination.

The right tibial proximal epiphyseal growth plate was submitted to 1500 pulses of extracorporeal shock wave therapy ^a (ESWT) with energy density of 0.15 mJ/mm² in three applications, two weeks apart. The left tibias remained untreated as a control. The probe used was the R05, with a focal zone represented by an ellipsoid with 25 mm diameter in the direction of wave propagation, targeting the growth plate area.

For each application, rabbits were anesthetized with xylazine ^b (5 mg/kg IM) and ketamine ^c (35 mg/kg IM). The dorsal proximal tibia area was shaved and contact gel was used to warrant perfect contact between the probe and the skin.

In each rabbit radiographic examination of both hind limbs was performed in the first week of the study, before each shock wave treatment and four weeks after the last treatment. Radiographic optical densitometry was measured in each X-Ray, allowing the comparison of the structures submitted to treatment or control group.

The tibial length was measured in the radiographic images, in the beginning and at the end of the study, at the ninth week, using as reference points the most proximal part of tibial plateau and the most distal point. These results were inserted in the formula described elsewhere ³, for the calculation of the percentage of growth inhibition:

$$\% \text{ growth inhibition} = \frac{\text{control length (cm)} - \text{treated length (cm)}}{\text{control length (cm)}} \times 100$$

The radiographic optical densitometry was obtained with an aluminum phantom used as a densitometric reference constituted of 20 degrees step wedge with 1 mm ± 0.03 mm between each step, placed in a wood frame in which the radiographic cassette was inserted to obtain the X-ray images, at 40 kVp and 1.6 mAs. The images were digitalized in a scanner ^d, transmissive mode, in 256 gray scale, and 86 ppp, and they

were analyzed by a software^e that compares the density of the phantom and the density of the tissue in mmAl, serving as a reference for the bone mineral density (BMD).

The Dual X-Ray Absorptiometry (DXA) was done in a multi-element detector^f with fan beam geometry equipment, with the regional high resolution small animal settings, which selects a small X-Ray source collimator and employs a high resolution scanning protocol, with the rabbits anesthetized with xylazine^b (5 mg/kg IM) and ketamine^c (35 mg/kg IM). The region of interest chosen was the proximal growth plate of the tibias.

At the end of the study, four weeks after the last extracorporeal shock wave treatment, when the rabbits were 98 days old, they were anesthetized with xylazine^b (5 mg/kg IM) and ketamine^c (35 mg/kg IM), and were euthanatized with thiopental^g (100mg/kg intracardiac), for the collection of histopathology samples.

For histomorphometric evaluation, samples were stained with Hematoxilin-Eosine (HE) and Masson's Trichromium. Images were digitalized with a digital camera^h coupled to an optical microscope, and the height of the growth plate and of the proliferative and hypertrophic zones was measured using the software ImageJⁱ. Measurements were done in three different places, in two slides from each limb, and the mean was calculated to ensure precision of the results.

For statistical analysis a Student t test for paired samples was performed. Values of $P \leq 0.05$ were considered significant, when comparing treated and control limbs. Data are reported as mean values $\pm$ standard deviation.

RESULTS

No clinical lameness was observed during the experiment. Treated limbs presented only a transient increase in skin vascularization.

There were no radiographic signs of angular deformities or difference in the degree of ossification of the proximal growth plates between treated and control tibias.

The mean length of treated tibias were respectively 6.1 ± 0.24 cm and 6.1 ± 0.22 cm for treated and control tibias at the beginning of the experiment (week 0), and respectively 9.7 ± 0.39 cm and 10.0 ± 0.36 cm at the end of the study (week 9), with $P = 0.000259$. The mean percentage of inhibition of growth was $2.57\% \pm 1.30$, in a range from 1.01% until 5.26%.

The mean values for the optical radiographic densitometry in mmAl were respectively for treated and control group 2.16 ± 0.39 e 2.03 ± 0.34 at the beginning of the study (week 1); 2.14 ± 0.20 e 2.18 ± 0.09 at second ESWT (week 3); 2.60 ± 0.13 e 2.40 ± 0.14 at third ESWT (week 5), with $P = 0.000594$; and 2.77 ± 0.17 e 2.51 ± 0.09 at the end of the study (week 9), with $P = 0.00214$.

The DXA values obtained at the end of the study were 0.1207 ± 0.0137 respectively for treated and control tibias, and this difference was not statistically significant with $P = 0.333795$, but showed a tendency toward greater density of treated limbs, compared to control.

The slides from treated group did not present any relevant histological alterations considering amount and characteristics of chondrocytes in growth plate.

The mean height of the growth plate in mm were respectively 0.784 ± 0.090 and 0.724 ± 0.079 with $P = 0.045876$ for treated and control limbs. The height in mm of the proliferative zone were 0.369 ± 0.037 and 0.334 ± 0.058 , with $P = 0.030397$, and for hypertrophic zone 0.292 ± 0.024 and 0.268 ± 0.024 , with $P = 0.049185$, respectively for treated and control tibias in mm.

DISCUSSION

The proximal tibial growth plate was chosen because it is easy to localize, has a homogenous height, and is relatively large when compared to the size of the animal.^{10, 12, 13, 14}

The energy density of 0.15 mJ/mm² with 1500 pulses per application is in concordance with the doses used by other authors^{16, 17, 18}, and is within the range of the recommended dose for orthopedic ESWT treatment in veterinary medicine. This energy level is in contrast with other researchers that used high energy shock waves.^{9, 11, 12, 14, 19}

Some researchers^{18, 20, 21, 22, 23} proposed that the biological effects of shock waves are proportional to the total amount of energy that is absorbed by the tissue, but there are some controversial information when different studies that specify only the number of pulses or charge voltage in kV are compared, without specifying the energy density.^{7, 18, 23, 24} As a result, we can find in the literature contradictory data about the effects of ESWT on bone.⁷

In our study, treated tibias presented reduced length when compared to control, corroborating data from other study¹⁰, and in contrast to other researchers^{9, 11} that did not found any difference.

Radiographic optical densitometry was considered to measure bone mineral density with precision and accuracy^{25, 26}, and in the present study, treated tibias had a greater bone mineral density (BMD) in mmAl at the place of application, probably reflecting a greater rate of endochondral ossification or deposition of mineral matrix due to the action of shock waves on bone.^{7, 16, 18, 22, 27}

Dual X-Ray Absorptiometry (DXA) showed a tendency toward greater density in g/mm² of growth plate of tibias treated with low energy shock waves (0.15 mJ/mm²), when compared to control. Other researchers found greater bone mineral content (BMC)²⁷ or bone mineral density (BMD)²⁸ after ESWT treatment.

Histological evaluation followed the same pattern used in other studies^{10, 15, 29}, and the height of the growth plate was considered as an adequate parameter for the evaluation of the effects of the shock waves on growth plate.

In rabbits, the height of the growth plate suffers a slight increase from birth until third week of life, when it starts to progressively decline until skeletal maturity.³⁰ This histomorphometric relation with longitudinal growth can be used to explain some of the effects of the shock waves on growth plates. As the growth rate decreases, the width of growth plate is also reduced.

The difference in the height of the growth plate and of the proliferative and hypertrophic zones between the treated and control^{29, 31, 32} may suggest a retardation in this physiological process of reduction of the height of the growth plate associated with the longitudinal growth of tibia, explaining also the reduced length of the tibias at that point.

In our experimental conditions we were not able to follow these animals until closure of the epiphysis, precluding the conclusion if this is only a temporary retardation that would suffer a compensatory growth as described elsewhere⁴, or if these alterations in growth are permanent and should result in difference in length of tibias at the skeletal maturity.³ We also should consider the interdependence relationship between proximal and distal epiphysis³³ of the same bone, where a compensatory mechanism of altering the growth rate of non treated epiphysis may occur.

New studies that follow these animals until closure of epiphysis are necessary to answer these questions.

CONCLUSION

The results obtained in the experimental conditions of this study allowed concluding that the extracorporeal shock waves have effects on the rabbit growth plate, as the increase in height of the growth plate, the increase in bone mineral density in mmAl and the decreased length of the treated tibias, when compared to control. These results indicate that extracorporeal shock wave therapy may be useful in the treatment of condition involving the growth plate, like angular deformities.

ACQUISITION SOURCES:

- a. Versatron , HMT. High Medical Technologies AG, Lengwil, Switzerland.
- b. Dopaser 2%, Calier S.A., Barcelona, Spain.
- c. Dopalen, Vetbrands, Jacareí, SP, Brazil.
- d. Power Look III Umax. Techville Inc., Dallas, TX, USA.
- e. ATHENA-SAI. Sistema de Inteligência Avançada, Com. Imp. Exp. Ltda, São José dos Campos, SP, Brazil.
- f. QDR 2000 plus. Hologic. Bedford, MA, USA.
- g. Thiopentax 1,0g, Cristália, Itapira, SP, Brazil.
- h. Cyber Shot DSC-W70, Sony Corp., China
- i. IMAGEJ – available at <http://rsb.info.nih.gov/ij> – Version 1.37, National Institutes of Health, Bethesda, MA, EUA

REFERENCES

1. Ballock, RT, O’Keefe RJ. The biology of growth plate. *J Bone Joint Surg.* 2003;85:715-726.
2. Mitten LA, Bertone AL. Angular limb deformities in foals. *J Am Vet Med Assoc.* 1994;204:717-720.
3. Ross TK, Zionts LE. Comparison of different methods used to inhibit physeal growth in a rabbit model. *Clin Orthop Relat Res.* 1997;340:236-243.
4. Raab P, Wild A, Seller K et al.. Correction of length discrepancies and angular deformities of the leg by blount’s epiphyseal stapling. *Eur J Pediatric.* 2001;160:668-674.
5. Lerner AL, Kuhn JL. Characterization of regional and age-related variations in the growth of the rabbit distal fêmur. *J Orthop Res.* 1997;15:353-361.
6. Caminoto EH, Alves ALG, Amorim RL et al. Ultrastructural and immunocytochemical evaluation of the effects of extracorporeal shock wave treatment in the hind limbs of horses with experimentally induced suspensory ligament desmitis. *Am J Vet Res.* 2005;68:892-896.
7. McClure SR, Van Sickle D, White MR. Effects of extracorporeal shock wave therapy on bone. *Vet Surg.* 2004;33:40-48.

8. Bathe AP, Rowlands DS, Boening KJ. Treatment of angular limb deformities using radial extracorporeal shockwave therapy: a prospective clinical trial, in *Proceedings*. 9th World Equine Vet Assoc Congress 2006;167-168.
9. Kurzweil SJ, Smith JE, Van Arsdalen K. Effect of extracorporeal shock waves on skeletal and renal growth in the infant rabbit. *J Urol*. 1988;325:649.
10. Yeaman LD, Jerome CP, McCullough. Effects of shock waves on the structure and growth of immature rat epiphysis. *J Urol*. 1989;141:670-674.
11. Van Arsdalen KN, Kurzweil S, Smith J et al. Effect of lithotripsy on immature rabbit bone and kidney development. *J Urol*. 1991;146:213-216.
12. Lüssenhop S, Seemann D, Hahn M et al. The influence of shock-waves on epiphyseal growth plates: first results of an in-vivo study with rabbits. In: Siebert W, Buch M eds. *Extracorporeal shockwaves in orthopedics*. Berlin: Springer, 1997;109-118.
13. Giusti G, Penteado FT, Santos JBG et al. Efeito de ondas de choque na placa de crescimento de coelhos. *Acta Ortop Bras*. 2005;13:31-34.
14. Nassenstein K, Nassenstein I, Schleberger R. Wirkung hochenergetischer extrakorporaler stoßwellen auf wachstumsfungen – eine histomorphologische studie. *Z Orthop*. 2005;143:652-655.
15. Lyon R, Liu XC, Meier J. The effects of therapeutic vs. High-intensity ultrasound on the rabbit growth plate. *J Orthop Res*. 2003;21:865-871.
16. Wang FS, Yang KD, Chen RF et al. Extracorporeal shock wave promotes growth and differentiation of bone-marrow stromal cells towards osteoprogenitors associated with induction of TGF- β 1. *J Bone Joint Surg*. 2002;84-B:457-461.
17. Dorotka R, Kubista B, Schatz KD et al. Effects of extracorporeal shock waves on human articular chondrocytes and ovine bone marrow stromal cells in vitro. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2003;123:345-348.
18. Martini L, Giavaresi G, Fini M et al. Effect of extracorporeal shock wave therapy on osteoblastlike cells. *Clin Orthop Relat Res*. 2003;413:269-280.
19. Väterlein N, Lüssenhop S, Hahn M et al. The effect of extracorporeal shock waves on joint cartilage – an in vivo study in rabbits. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2000;120:403-406.
20. Kaulesar-Sukul DMKS, Johannes EJ, Pierik EGJM et al. The effect of high energy shock waves focused on cortical bone: an *in vitro* study. *J Surg Res*. 1993;54:46-51.
21. Rompe JD, Eysel P, Hopf C et al. Extrakorporale stosswellentherapie in der orthopädie. *Fortschr Med*. 1997;18:26–33.
22. Ogden JA, Kischkat AT. Principles of shock wave therapy. *Clin Orthop Relat Res*. 2001;387:8-17.
23. Maier M, Hausdorf J, Tischer T et al. Influence of extracorporeal shock-wave application on normal bone in an animal model *in vivo*: scintigraphy, MRI and histopathology. *J Bone Joint Surg*. 2002;84-B:592-599.
24. Haupt G. Use of extracorporeal shock waves in the treatment of pseudarthrosis, tendinopathy and other orthopedic diseases. *J Urol*. 1997;158:4–11.
25. Vulcano LC, Mendes RG, Godoy CLB et al. Padronização da densidade mineral óssea (BMD) do acessório do carpo em equinos atletas da raça Quarto de Milha. *Cienc Rural*. 2006;36:520-524.
26. Yang SO, Hagiwara S, Engelke K et al. Radiographic absorptiometry for bone mineral measurement of the phalanges: precision and accuracy study. *Radiol*. 1994;192:857-659.

27. Takahashi K, Saisu T, Wada Y et al. Gene expression of extracellular matrix protein in shockwaves-induced osteogenesis in rats, in *Proceedings. 47th Annu Meet Orthop Res Soc* 2001;532.
28. Wang CJ. Shock wave treatment shows dose-dependent enhancement of bone mass and bone strenght after fracture of the fêmur. *Bone*. 2004;34:225-230.
29. Seinsheimer F, Sledge CB. Parameters of longitudinal growth rate in rabbit epiphyseal growth plates. *J Bone Joint Surg*. 1981;63-A:627-630.
30. Masoud I, Shapiro F, Moses A. Tibial epiphyseal development: a cross-sectional histologic and histomorphometric study in the New Zealand white rabbit. *J Orthop Res*. 1986;4:212-220.
31. Kuhn JL, Delacey JH, Leenellett EE. Relation between bone growth rate and hypertrophic chondrocyte volume in New Zealand white rabbits of varying ages. *J Orthop Res*. 1996;14:706-711.
32. Wilsman NJ, Farnum CE, Green EM et al. Cell cycle analysis of proliferative zone chondrocytes in growth plates elongating at different rates. *J Orthop Res*. 1996;14:562-572.
33. MacDonald JW, Houghton GR, Bradley J et al. The relationship between periosteal division and compression or distraction of the growth plate. *J Bone Joint Surg*. 1990;72-B:303-308.

APÊNDICE

TABELA 6 - Valores médios e desvio padrão da densitometria óptica em imagem radiográfica no início do experimento (semana 0), a cada aplicação das ondas de choque extracorpóreas (semanas 1, 3 e 5) e ao final do experimento (semana 9), em mmAl, nos membros tratados (A) e controle (B)

Semana	0		1		3		5		9	
	MÉDIA	Desvio	MÉDIA	Desvio	MÉDIA	Desvio	MÉDIA	Desvio	MÉDIA	Desvio
1 A	1,75	0,04	1,51	0,05	1,83	0,06	2,46	0,03	2,71	0,08
2 A	1,98	0,02	2,77	0,03	2,26	0,06	2,60	0,07	2,61	0,12
3 A	1,95	0,03	2,30	0,25	2,25	0,07	2,70	0,08	2,98	0,04
4 A	1,77	0,13	2,16	0,03	1,87	0,10	2,51	0,03	2,67	0,01
5 A	1,93	0,08	2,16	0,05	2,09	0,06	2,68	0,10	2,99	0,04
6 A	2,64	0,20	1,79	0,09	2,29	0,04	2,39	0,07	2,54	0,05
8 A	2,12	0,07	2,65	0,16	2,01	0,08	2,54	0,08	2,80	0,02
9 A	2,09	0,05	2,02	0,03	2,33	0,03	2,78	0,14	2,94	0,07
10 A	2,02	0,11	2,09	0,06	2,34	0,04	2,71	0,04	2,66	0,02
Grupo Tratado	2,03	0,26	2,16	0,39	2,14	0,20	2,60	0,13	2,77	0,17
1 B	1,71	0,03	2,82	0,11	2,18	0,14	2,46	0,10	2,60	0,06
2 B	1,49	0,14	1,97	0,08	2,06	0,06	2,49	0,06	2,51	0,08
3 B	1,86	0,16	2,05	0,13	2,15	0,04	2,38	0,02	2,56	0,12
4 B	1,91	0,09	2,05	0,13	2,23	0,05	2,26	0,06	2,47	0,02
5 B	1,84	0,10	2,05	0,07	2,20	0,06	2,56	0,10	2,41	0,11
6 B	1,67	0,15	1,52	0,09	2,16	0,06	2,21	0,09	2,42	0,11
8 B	1,72	0,12	1,81	0,08	2,07	0,03	2,21	0,09	2,43	0,05
9 B	1,97	0,10	2,04	0,03	2,16	0,05	2,54	0,04	2,65	0,07
10 B	1,92	0,05	1,99	0,02	2,38	0,07	2,45	0,08	2,55	0,09
Grupo Controle	1,79	0,15	2,03	0,34	2,18	0,09	2,40	0,14	2,51	0,09

A – grupo tratado TOC

B – grupo controle

Desvio – desvio padrão

TABELA 7 - Cálculos do teste t de Student para amostras pareadas - Valores médios da densitometria óptica em imagem radiográfica no início do experimento (semana 0)

Teste-t: duas amostras em par para médias		
Semana 0		
	A	B
Média	2,028148	1,789259
Variância	0,069673	0,023049
Observações	9	9
Correlação de Pearson	-0,23741	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	8	
Stat t	2,143845	
P(T<=t) uni-caudal	0,032195	
t crítico uni-caudal	1,859548	
P(T<=t) bi-caudal	0,06439	
t crítico bi-caudal	2,306004	

A – grupo tratado TOC

B – grupo controle

TABELA 8 - Cálculos do teste t de Student para amostras pareadas - Valores médios da densitometria óptica em imagem radiográfica antes da primeira aplicação de ondas de choque extracorpóreas na primeira semana do experimento (Semana 1)

Teste-t: duas amostras em par para médias		
Semana 1		
	A	B
Média	2,161481	2,033704
Variância	0,153195	0,118057
Observações	9	9
Correlação de Pearson	-0,43702	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	8	
Stat t	0,614776	
P(T<=t) uni-caudal	0,277891	
t crítico uni-caudal	1,859548	
P(T<=t) bi-caudal	0,555781	
t crítico bi-caudal	2,306004	

A – grupo tratado TOC

B – grupo controle

TABELA 9 - Cálculos do teste t de Student para amostras pareadas - Valores médios da densitometria óptica em imagem radiográfica antes da segunda aplicação de ondas de choque extracorpóreas na terceira semana do experimento (Semana 3)

Teste-t: duas amostras em par para médias		
Semana 3		
	A	B
Média	2,141852	2,176667
Variância	0,038945	0,008767
Observações	9	9
Correlação de Pearson	0,113201	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	8	
Stat t	-0,50061	
P(T<=t) uni-caudal	0,315062	
t crítico uni-caudal	1,859548	
P(T<=t) bi-caudal	0,630125	
t crítico bi-caudal	2,306004	

A – grupo tratado TOC

B – grupo controle

TABELA 10 - Cálculos do teste t de Student para amostras pareadas - Valores médios da densitometria óptica em imagem radiográfica antes da terceira aplicação de ondas de choque extracorpóreas na quinta semana do experimento (Semana 5),

Teste-t: duas amostras em par para médias		
Semana 5		
	A	B
Média	2,597037	2,395926
Variância	0,016621	0,019091
Observações	9	9
Correlação de Pearson	0,66097	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	8	
Stat t	5,470425	
P(T<=t) uni-caudal	0,000297	
t crítico uni-caudal	1,859548	
P(T<=t) bi-caudal	0,000594	
t crítico bi-caudal	2,306004	

Diferença estatisticamente significativa para $p \leq 0,05$

A – grupo tratado TOC

B – grupo controle

TABELA 11 - Cálculos do teste t de Student para amostras pareadas - Valores médios da densitometria óptica em imagem radiográfica ao final do experimento, na nona semana (Semana 9)

Teste-t: duas amostras em par para médias		
Semana 9		
	A	B
Média	2,767778	2,50963
Variância	0,028806	0,007504
Observações	9	9
Correlação de Pearson	0,204648	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	8	
Stat t	4,449656	
P(T<=t) uni-caudal	0,00107	
t crítico uni-caudal	1,859548	
P(T<=t) bi-caudal	0,00214	
t crítico bi-caudal	2,306004	

Diferença estatisticamente significativa para $p \leq 0,05$

A – grupo tratado TOC

B – grupo controle

TABELA 12 - Cálculos do teste t de Student para amostras pareadas - Valores médios da DXA ao final do experimento, na nona semana (Semana 9)

Teste-t: duas amostras em par para médias		
DXA		
	A	B
Média	0,126611	0,120733
Variância	0,00017	0,000188
Observações	9	9
Correlação de Pearson	0,179811	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	8	
Stat t	1,02852	
P(T<=t) uni-caudal	0,166898	
t crítico uni-caudal	1,859548	
P(T<=t) bi-caudal	0,333795	
t crítico bi-caudal	2,306004	

A – grupo tratado TOC

B – grupo controle

TABELA 13 - Cálculos do teste t de Student para amostras pareadas – Valores do comprimento em centímetros das tíbias nas imagens radiográficas no início do experimento (semana 0)

Teste-t: duas amostras em par para médias		
Comprimento Semana 0		
	A	B
Média	6,055556	6,077778
Variância	0,060278	0,049444
Observações	9	9
Correlação de Pearson	0,987102	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	8	
Stat t	-1,51186	
P(T<=t) uni-caudal	0,08451	
t crítico uni-caudal	1,859548	
P(T<=t) bi-caudal	0,16902	
t crítico bi-caudal	2,306004	

A – grupo tratado TOC

B – grupo controle

TABELA 14 - Cálculos do teste t de Student para amostras pareadas – Valores do comprimento em centímetros das tíbias nas imagens radiográficas antes da primeira aplicação de ondas de choque extracorpóreas na primeira semana do experimento (Semana 1)

Teste-t: duas amostras em par para médias		
Comprimento Semana 1		
	A	B
Média	6,7	6,677778
Variância	0,1225	0,144444
Observações	9	9
Correlação de Pearson	0,98669	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	8	
Stat t	1	
P(T<=t) uni-caudal	0,173297	
t crítico uni-caudal	1,859548	
P(T<=t) bi-caudal	0,346594	
t crítico bi-caudal	2,306004	

A – grupo tratado TOC

B – grupo controle

TABELA 15 - Cálculos do teste t de Student para amostras pareadas – Valores do comprimento em centímetros das tíbias nas imagens radiográficas antes da segunda aplicação de ondas de choque extracorpóreas na terceira semana do experimento (Semana 3)

Teste-t: duas amostras em par para médias		
Comprimento Semana 3		
	A	B
Média	7,533333	7,622222
Variância	0,1125	0,109444
Observações	9	9
Correlação de Pearson	0,983823	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	8	
Stat t	-4,4376	
P(T<=t) uni-caudal	0,001087	
t crítico uni-caudal	1,859548	
P(T<=t) bi-caudal	0,002175	
t crítico bi-caudal	2,306004	

A – grupo tratado TOC

B – grupo controle

TABELA 16 - Cálculos do teste t de Student para amostras pareadas – Valores do comprimento em centímetros das tíbias nas imagens radiográficas antes da terceira aplicação de ondas de choque extracorpóreas na quinta semana do experimento (Semana 5)

Teste-t: duas amostras em par para médias		
Comprimento Semana 5		
	A	B
Média	8,522222	8,566667
Variância	0,071944	0,075
Observações	9	9
Correlação de Pearson	0,981309	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	8	
Stat t	-2,52982	
P(T<=t) uni-caudal	0,017633	
t crítico uni-caudal	1,859548	
P(T<=t) bi-caudal	0,035265	
t crítico bi-caudal	2,306004	

A – grupo tratado TOC

B – grupo controle

TABELA 17 - Cálculos do teste t de Student para amostras pareadas – Valores do comprimento em centímetros das tíbias nas imagens radiográficas ao final do experimento, na nona semana (Semana 9)

Teste-t: duas amostras em par para médias		
Comprimento Semana 9		
	A	B
Média	9,711111	9,966667
Variância	0,156111	0,1275
Observações	9	9
Correlação de Pearson	0,950983	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	8	
Stat t	-6,20264	
P(T<=t) uni-caudal	0,000129	
t crítico uni-caudal	1,859548	
P(T<=t) bi-caudal	0,000259	
t crítico bi-caudal	2,306004	

A – grupo tratado TOC

B – grupo controle

TABELA 18 – Cálculo do percentual de inibição do crescimento no final do experimento (semana 9), pela fórmula descrita por Ross & Zions (1997):

$$\% \text{inibição do crescimento} = \frac{\text{comprimento controle (cm)} - \text{comprimento tratado (cm)}}{\text{comprimento controle (cm)}} \times 100$$

Porcentagem de Inibição do Crescimento (Semana 9)			
Animal	A (cm)	B (cm)	Percentual (%)
1	9,4	9,7	3,09
2	9,0	9,5	5,26
3	9,5	9,8	3,06
4	9,7	9,8	1,02
5	10,1	10,4	2,88
6	9,8	9,9	1,01
8	9,6	9,8	2,04
9	10,3	10,6	2,83
10	10,0	10,2	1,96
Média	9,7	10,0	2,57
Desvio Padrão	0,40	0,36	1,30

A – grupo tratado TOC

B – grupo controle

TABELA 19 - Cálculos do teste t de Student para amostras pareadas – Valores da espessura total média da placa de crescimento em mm no final do experimento (semana 9)

Teste-t: duas amostras em par para médias		
Espessura placa crescimento		
	A	B
Média	784,1667	723,5
Variância	8071,689	6303,745
Observações	9	9
Correlação de Pearson	0,591179	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	8	
Stat t	2,36115	
P(T<=t) uni-caudal	0,022938	
t crítico uni-caudal	1,859548	
P(T<=t) bi-caudal	0,045876	
t crítico bi-caudal	2,306004	

A – grupo tratado TOC

B – grupo controle

TABELA 20 - Cálculos do teste t de Student para amostras pareadas – Valores da espessura da zona proliferativa da placa de crescimento em mm no final do experimento (semana 9)

Teste-t: duas amostras em par para médias		
Zona Proliferativa		
	A	B
Média	369,3426	333,5278
Variância	1399,318	3312,148
Observações	9	9
Correlação de Pearson	0,705238	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	8	
Stat t	2,625343	
P(T<=t) uni-caudal	0,015199	
t crítico uni-caudal	1,859548	
P(T<=t) bi-caudal	0,030397	
t crítico bi-caudal	2,306004	

A – grupo tratado TOC

B – grupo controle

TABELA 21 - Cálculos do teste t de Student para amostras pareadas – Valores da espessura da zona hipertrófica da placa de crescimento em mm no final do experimento (semana 9)

Teste-t: duas amostras em par para médias		
Zona Hipertrófica		
	A	B
Média	292,2287	267,9352
Variância	597,6911	577,3989
Observações	9	9
Correlação de Pearson	0,157703	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	8	
Stat t	2,316527	
P(T<=t) uni-caudal	0,024593	
t crítico uni-caudal	1,859548	
P(T<=t) bi-caudal	0,049185	
t crítico bi-caudal	2,306004	

A – grupo tratado TOC
B – grupo controle

TABELA 22 – Valores da espessura total média, da zona proliferativa e da zona hipertrófica da placa de crescimento em mm no final do experimento (semana 9)

	Espessura Total							Zona Proliferativa							Zona Hipertrófica						
	1	2	3	4	5	6	média	1	2	3	4	5	6	média	1	2	3	4	5	6	média
Tratado																					
1 A	0,725	0,757	0,818	0,609	0,583	0,526	0,669	0,396	0,297	0,288	0,241	0,256	0,215	0,282	0,346	0,390	0,349	0,249	0,226	0,239	0,300
2 A	0,716	0,680	0,671	0,674	0,743	0,716	0,700	0,388	0,394	0,371	0,343	0,367	0,305	0,361	0,256	0,316	0,276	0,296	0,272	0,242	0,276
3 A	0,763	0,663	0,754	0,781	0,795	0,849	0,767	0,335	0,413	0,362	0,354	0,394	0,329	0,364	0,247	0,299	0,347	0,281	0,286	0,293	0,292
4 A	0,751	0,772	0,728	0,813	0,733	0,781	0,763	0,321	0,364	0,397	0,385	0,366	0,348	0,363	0,294	0,303	0,291	0,265	0,291	0,284	0,288
5 A	0,742	0,736	0,775	0,796	0,831	0,795	0,779	0,373	0,352	0,429	0,446	0,340	0,366	0,384	0,255	0,298	0,289	0,342	0,299	0,294	0,296
6 A	0,964	0,899	0,991	0,810	0,988	0,890	0,923	0,388	0,411	0,361	0,434	0,448	0,376	0,403	0,326	0,310	0,312	0,335	0,345	0,265	0,315
8 A	0,710	0,627	0,733	0,680	0,784	0,701	0,706	0,417	0,384	0,373	0,340	0,385	0,346	0,374	0,254	0,204	0,248	0,305	0,308	0,243	0,260
9 A	0,952	0,872	0,893	0,719	0,834	0,825	0,849	0,402	0,378	0,313	0,448	0,354	0,382	0,379	0,284	0,248	0,273	0,240	0,274	0,272	0,265
10 A	0,938	0,881	0,961	0,940	0,899	0,790	0,901	0,484	0,523	0,434	0,507	0,472	0,500	0,414	0,312	0,368	0,387	0,366	0,333	0,267	0,338
Média							0,784							0,369							0,292
Desvio padrão							0,090							0,037							0,024
Controle																					
1 B	0,609	0,672	0,674	0,639	0,544	0,591	0,621	0,244	0,253	0,280	0,230	0,248	0,247	0,250	0,267	0,267	0,293	0,267	0,251	0,275	0,270
2 B	0,775	0,657	0,600	0,592	0,633	0,621	0,646	0,328	0,282	0,251	0,284	0,275	0,266	0,281	0,190	0,211	0,270	0,283	0,272	0,254	0,246
3 B	0,795	0,698	0,698	0,737	0,798	0,778	0,751	0,363	0,312	0,308	0,345	0,409	0,380	0,353	0,287	0,287	0,289	0,282	0,253	0,232	0,272
4 B	0,671	0,674	0,716	0,731	0,689	0,736	0,703	0,266	0,328	0,251	0,302	0,308	0,302	0,293	0,219	0,260	0,216	0,245	0,259	0,218	0,236
5 B	0,852	0,822	0,704	0,704	0,887	0,881	0,808	0,355	0,392	0,322	0,435	0,366	0,425	0,382	0,267	0,280	0,296	0,313	0,300	0,258	0,286
6 B	0,801	0,819	0,895	0,795	0,881	0,876	0,844	0,514	0,538	0,425	0,337	0,423	0,361	0,433	0,301	0,269	0,359	0,311	0,296	0,364	0,316
8 B	0,739	0,621	0,698	0,639	0,740	0,704	0,690	0,284	0,299	0,299	0,328	0,296	0,317	0,304	0,299	0,257	0,225	0,306	0,260	0,309	0,276
9 B	0,802	0,795	0,795	0,805	0,804	0,769	0,795	0,305	0,337	0,394	0,350	0,432	0,425	0,373	0,329	0,242	0,248	0,251	0,272	0,227	0,261
10 B	0,710	0,781	0,766	0,565	0,544	0,559	0,654	0,350	0,347	0,434	0,281	0,300	0,291	0,333	0,253	0,317	0,272	0,199	0,206	0,249	0,249
Média							0,724							0,334							0,268
Desvio padrão							0,079							0,058							0,024

A – grupo tratado TOC

B – grupo controle