



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

**ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS PROVOCADAS PELO USO DE ONDAS
ULTRASSÔNICAS CONTÍNUAS DE 01 MHz NO DISCO EPIFISÁRIO EM TÍBIA
DE CAMUNDONGO**

MACAPÁ
2013

Daniela Pinheiro da Silva

**ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS PROVOCADAS PELAS ONDAS
ULTRASSÔNICAS CONTÍNUAS DE 01 MHz NO DISCO EPIFISÁRIO EM TÍBIA
DE CAMUNDONGO**

“Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Amapá com a finalidade de Obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde”.

Área de concentração: Ensaios Biológicos

Orientador: Prof. Dr. José Wagner Cavalcante Muniz

Coorientadora : Profa. Dra. Ana Rita P. Barcessat

**MACAPÁ
2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá

616.075

S586a Silva, Daniela Pinheiro da

Alterações histológicas provocadas pelo uso de ondas ultrassônicas contínuas de 01 MHz no disco epifisário em tibia de camundongo / Daniela Pinheiro da Silva -- Macapá, 2013.

82 f.

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

Orientador: José Wagner Cavalcante Muniz

Co-orientadora: Ana Rita Pinheiro Barcessat

1. Células ósseas. 2. Tecido ósseo. 3. Ultrassom contínuo. I. Muniz, José Wagner Cavalcante, orient. II. Barcessat, Ana Rita Pinheiro, co-orient. III. Fundação Universidade Federal do Amapá. IV. Título.

Dedico este trabalho a Deus, o autor da minha vida e da minha fé.

A Ele e somente a Ele toda honra.

Ao meu pai, Adalfredo Távora, meu presente. Muito obrigada pelo seu apoio incondicional, obrigada por ser meu amigo, meu grande incentivador.

E a minha mãe, Fátima Pinheiro, guerreira, fonte de amor, mulher presente em toda a minha vida, demonstrando amor.

Ao meu esposo, Marcelo Fiel, incentivador e amigo.

Homem forte, que carrega no seu coração a força para viver e vencer.

Obrigada por estar ao lado sempre e entender a minha ausência durante esta importante etapa da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A professora e amiga Emília Chaves, que muito me estimulou na etapa inicial desta jornada.

Ao Prof. Dr. José Wagner Muniz, orientador e amigo, obrigada pelo apoio constante ao longo desta jornada e pela sua disposição em sempre me ajudar.

A professora e amiga Ana Rita Barcessat, obrigada pelo apoio intenso em toda a pesquisa e por ter, através da Profa. Dra. Luciana Correa, cedido o laboratório de estomatologia da Universidade de São Paulo, onde ocorreu todo o processamento e análise dos resultados.

A Profa. Dra. Jocivania Oliveira que gentilmente cedeu o laboratório de toxicologia da Universidade Federal do Amapá, local onde ocorreu este experimento.

A Profa. Dra. Alessandra Azevedo e ao Prof. Dr. Manoel Gionovaldo Lourenço pelas observações realizadas durante a qualificação que muito contribuíram para o aprimoramento desta pesquisa.

Aos meus amigos Sandra Maria Araújo e Atvaldo Américo Feitosa por apoio e compreensão que vocês me deram nesta importante etapa da minha vida. Recebam de coração o meu agradecimento.

Aos meus irmãos, Daniel Pinheiro e Ludimila Pinheiro que me ajudaram durante este processo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPQ que financiou esta pesquisa.

“Os sonhos não determinam o lugar onde vocês vão chegar, mas produzem a força necessária para tirá-los do lugar em que vocês estão. Sonhem com as estrelas para que vocês possam pisar pelo menos na Lua. Sonhem com a Lua para que vocês possam pisar pelo menos nos altos montes. Sonhem com os altos montes para que vocês possam ter dignidade quando atravessarem os vales das perdas e das frustrações. Bons alunos aprendem a matemática numérica, alunos fascinantes vão além, aprendem a matemática da emoção, que não tem conta exata e que rompe a regra da lógica. Nessa matemática você só aprende a multiplicar quando aprende a dividir, só consegue ganhar quando aprende a perder, só consegue receber, quando aprende a se doar.”

Augusto Cury

RESUMO

SILVA, D.P. Alterações histológicas provocadas pelo uso de ondas ultrassônicas contínuas de 01 MHz no disco epifisário em tibia de camundongo. Dissertação apresentada à Universidade Federal do Amapá para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

O ultrassom é uma modalidade terapêutica amplamente utilizada na prática da fisioterapia, sendo vital a compreensão completa de suas indicações e contra-indicações. Uma das contra-indicações controversas e pouco estudadas é a sua utilização nas epífises de crescimento ósseo, por conter o disco epifisário. O principal objetivo deste trabalho foi verificar as alterações histológicas no disco epifisário da tibia em crescimento de camundongos em exposição a ondas ultrassônicas de frequência de 1MHz. Para tanto, 16 camundongos albinos da linhagem *Swiss Webster*, em fase de crescimento, com idade de aproximadamente 03 semanas e peso variando entre 10-15g foram distribuídos aleatoriamente em 02 grupos de 08 animais, designados Dose 01 (0,1 w/cm²) e Dose 02 (0,5 w/cm²). Os procedimentos ocorreram em uma aplicação/dia, totalizando ao final, dez aplicações sem interrupção. As amostras foram analisadas histologicamente pelas técnicas de hematoxilina-eosina, *alcian blue e von kossa*, visando medir a área da cabeça da tibia versus disco epifisário, além da espessura das zonas proliferativa e hipertrófica. Para análise estatística foi utilizado teste de Friedman com correção de Bonferroni. Conclui-se que, nos parâmetros utilizados, o tecido ósseo foi influenciado pelas ondas ultrassônicas. Do mesmo modo, o disco epifisário, em que foi observado que o grupo de maior parâmetro teve a área total do disco maior do que os demais. A zona calcificada não teve influência das ondas ultrassônicas, porém a zona proliferativa foi sensível a esta terapia, principalmente na menor dose. Não foi encontrada nenhuma alteração anatomopatológica nos grupos controle e tratados.

Palavras-chaves: Epífise de crescimento, ultrassom contínuo, tecido ósseo, células ósseas.

ABSTRACT

SILVA, D.P. Histological changes caused by the use of ultrasonic waves continuous of 01 MHz disk epiphyseal tibial mouse. Dissertation submitted to the Federal University of Amapá to obtain the title of Master of Health Sciences

The ultrasonic wave is a widely used treatment modality in physical therapy practice, is vital to full understanding of its indications and contraindications. One controversial in its application give yourself at little study of its use in the epiphyseal bone growth. The aim of this study was to determine the histological changes occurring in the epiphyseal disk of the tibia in growing mice during exposure to ultrasonic waves of frequency 1MHz. Therefore, 16 albino mice of Swiss strain Webster in growth phase, aged 03 weeks and weighing between 10-15g were randomly divided into 02 groups of 08 animals, designated Dose 01 (0.1 w/cm²) and Dose 02 (0.5 w/cm²), and the control group designated C. Procedures occurred in an application / day, totaling the final ten applications without interruption. The samples were analyzed histologically by hematoxylin-eosin staining techniques, Alcian blue and Von Kossa stains, in order to measure the area of the head versus the tibia epiphysial disc, beyond the thickness of the proliferative and hypertrophic zones. In the statistical analysis we used the Friedman test with Bonferroni correction. It is concluded that the parameters used to positively action of ultrasound occurred in cartilage, bone tissue formation and may not require that level of intensity becomes more significant.

Keywords: Epiphysis growth, continuous ultrasound, bone, bone cells

LISTA DE FIGURAS

Figura 01	- Diagrama esquemático da conversão da corrente doméstica para alta frequência, ultrassom de alta voltagem para propostas terapêuticas	20
Figura 02	- Propriedades físicas do ultrassom de acordo com a impedância acústica dos diferentes tecidos	21
Figura 03	- Processo de cavitação formado pelas ondas ultrassônicas	22
Figura 04	-Zonas constituintes do disco epifisário, mostrando as principais características das células de cada camada	29
Figura 05	- Gráfico de caixas para área do osso segundo o grupo e a medida	43
Figura 06	- Gráfico de caixas dispersão entre as diferentes medidas da área do osso 2 a 2. Correlação = coeficiente de correlação de Spearman	45
Figura 07	- Gráfico de caixas para área do disco segundo o grupo e a medida	45
Figura 08	- Gráfico de caixas dispersão entre as diferentes medidas da área do disco 2 a 2. Correlação = coeficiente de correlação de Spearman	47
Figura 09	- Gráfico de caixas para a razão entre a área do disco e a área do osso segundo o grupo e a medida	47
Figura 10	- Gráfico de caixas de dispersão entre as diferentes medidas da razão entre a área do disco e área do osso 2 a 2. Correlação = coeficiente de correlação de Spearman	49
Figura 11	- Gráfico de caixas para a zona calcificada segundo o grupo e a medida	49
Figura 12	- Gráfico de caixas de dispersão entre as diferentes medidas zona calcificada 2 a 2. Correlação = coeficiente de correlação de Spearman	50
Figura 13	- Gráfico de caixas para a zona calcificada o grupo e a medida	51
Figura 14	- Gráfico de caixas dispersão entre as diferentes medidas da zona proliferativa 2 a 2. Correlação = coeficiente de correlação de Spearman	51
Figura 15	- Fotos ilustrativas demonstrando a cabeça da tíbia e o disco epifisário nas colorações Hematoxilina-Eosina, Von Kossa e Alcian Blue dos grupos controle (A), dose 1 (B) e dose 2 (C), respectivamente. Aumento:5x	55

- Figura 16 - Fotos ilustrativas demonstrando a cabeça da tíbia e o disco epifisário nas colorações Hematoxilina-Eosina, Von Kossa e Alcian Blue dos grupos controle (A), dose 1 (B) e dose 2 (C), respectivamente. Aumento:10x 56
- Figura 17 - Fotos ilustrativas demonstrando a zona proliferativa (A) e a zona hipertrópica (B) do disco epifisário dos grupos controle (a), dose 1 (b) e dose 2 (b), nas colorações Hemotoxilina-Eosina, Alcian Blue e Von Kossa, respectivamente. Aumento:40x 57
- Figura 18 - Fotos ilustrativas demonstrando a zona hipertrópica (A), a zona calcificada (B) e a zona de ossificação (C) do disco epifisário em Hemotoxilina-eosina e em Von Kossa. Aumento:40x 58
- Figura 19 - Fotos ilustrativa demonstrando a zona de repouso (A) e a zona proliferativa (B) do disco epifisário em Hemotoxilina-eosina e em Alcian Blue. Aumento:40x 58

LISTA DE QUADROS

Quadro 01	- Parâmetros físicos do equipamento a ser utilizado	37
Quadro 02	- Parâmetros a serem utilizados nos grupos experimentais	38
Quadro 03	- Características anatomopatológicas procuradas no Grupo D1	54
Quadro 04	- Características anatomopatológicas procuradas no Grupo D2	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 01	-Valores de mediana, média e desvio padrão (DP) para área do osso segundo o grupo e os blocos de medida	44
Tabela 02	- Resultados do teste de Friedman para blocos com replicações comparando os grupos 2 a 2 segundo a área do osso. Valores p corrigidos pelo método de Bonferroni para comparações múltiplas	44
Tabela 03	- Valores de mediana, média e desvio padrão (DP) para área do disco segundo o grupo e os blocos de medida	46
Tabela 04	- Resultados do teste de Friedman para blocos com replicações comparando os grupos 2 a 2 segundo a área do disco. Valores p corrigidos pelo método de Bonferroni para comparações múltiplas	46
Tabela 05	- Valores de mediana, média e desvio padrão (DP) para a razão entre a área do disco e área do osso segundo o grupo e os blocos de medida	48
Tabela 06	- Resultados do teste de Friedman para blocos com replicações comparando os grupos 2 a 2 segundo a razão entre a área do disco e a área do osso. Valores p corrigidos pelo método de Bonferroni para comparações múltiplas	48
Tabela 07	- Valores de mediana, média e desvio padrão (DP) para a zona calcificada segundo o grupo e os blocos de medida	50
Tabela 08	- Valores de mediana, média e desvio padrão (DP) para a zona proliferativa segundo o grupo e os blocos de medida	51
Tabela 09	- Resultado do teste de Friedman para blocos com repetições. Comparação dos 3 grupos (C, D1 e D2), simultaneamente	52
Tabela 10	- Resultado do teste de Friedman para bloco com repetições (valor p). Comparação dos grupos 2 a 2. Valores p corrigidos pelo método de Bonferroni para múltiplas comparações	52

LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS E SÍMBOLOS

ALP – Fosfatase alcalina

BMP - *Bone morphogenetic protein*

BNR - *Beam non uniformity ratio*

°C – Graus Celsius

Ca⁺⁺ - Íons de cálcio

CNPQ – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

Ciclo/s – Ciclo por segundo

DP – Desvio padrão

EDTA - Ácido etileno-diamino-tetracético

ERA - *Effective Radiating Area*

FAK - *Focal Adhesion Kinase*

H⁺ - Íons de hidrogênio

HE - Hematoxilina – eosina

Hz - Hertz

IEC - *International Electrotechnical Commission*

I_{SATA} – Intensidade média temporal e espacial

KHz – Kilo Hertz

LACEN- Laboratório Central de Saúde Pública do Estado do Amapá

LIPUS – Ultrassom pulsátil de baixa intensidade

MAR – Taxa de aposição mineral

ME – Microscopia eletrônica

MO – Microscópio ótico

MHz - Mega Hertz

mw/cm² – Miliwatts por centímetro quadrado

µm - micrometro

µs – microsegundos

n – número de animais

nm – nanômetro

PO₂₋₄ – Íons de fosfato

SW – *Swiss Webster*

TGF – β – Fator de Transformação do crescimento

UNIFAP - Universidade Federal do Amapá

US – Ultrassom

USP - Universidade de São Paulo

VEGF – Fator de crescimento vascular endotelial

w/cm² – Watts por centímetro quadrado

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	19
2.1	ULTRASSOM	19
2.1.1	Aspectos Físicos	19
2.1.1.1	<i>A natureza das ondas sonoras</i>	19
2.1.1.2	<i>Produção do ultrassom terapêutico</i>	19
2.1.1.3	<i>Absorção do feixe de ultrassom</i>	20
2.1.1.4	<i>Atenuação e profundidade de penetração</i>	21
2.1.1.5	<i>Impedância acústica</i>	21
2.1.2	Efeitos do ultrassom no organismo	21
2.2	TECIDO ÓSSEO	23
2.2.1	Composição do osso	24
2.2.1.1	<i>Células osteoprogenitoras</i>	24
2.2.1.2	<i>Osteoblastos</i>	24
2.2.1.3	<i>Osteócitos</i>	24
2.2.1.4	<i>Osteoclastos</i>	25
2.2.1.5	<i>Matriz óssea</i>	25
2.3	CRESCIMENTO ÓSSEO	25
2.3.1	Desenvolvimento endocondral do osso	26
2.3.2	Disco epifisário	27
2.4	ULTRASSOM E TECIDO ÓSSEO	29
3	OBJETIVOS	33
3.1	Geral	33
3.2	Específicos	33
4	JUSTIFICATIVA E PROBLEMATIZAÇÃO	34
5	METODOLOGIA DA PESQUISA	36
5.1	Característica do estudo	36
5.2	População e amostra	36
5.3	Local de realização do estudo	36
5.4	Critérios de inclusão/exclusão	36

5.5	Aparato experimental	37
5.5.1	Preparação das gaiolas	37
5.5.2	Equipamento de ultrassom	37
5.6	Grupos experimentais	37
5.7	Eutanásia dos animais	38
5.8	Análise histológica	38
5.9	Hipóteses	40
5.10	Análise estatística	40
5.11	Avaliação do risco x benefício da pesquisa	40
6	RESULTADOS	43
6.1	Análise morfométrica	43
6.1.1	Área do osso	43
6.1.2	Área do disco	45
6.1.3	Razão da área do disco pela área do osso	47
6.1.4	Zona hipertrófica	49
6.1.5	Zona proliferativa	50
6.2	Análise Interferencial	52
6.3	Análise morfológica	53
7	DISCUSSÃO	59
8	CONCLUSÃO	62
	REFERÊNCIAS	63
	APENDICE	68
	ANEXOS	73

1 INTRODUÇÃO

O ultrassom terapêutico é utilizado em medicina desde o final da década de 40 do século passado e, dependendo da frequência das ondas, passou a ser utilizado para o diagnóstico por imagem, cura terapêutica ou destruição tecidual (STARKEY, 2001; GUIRRO; GUIRRO, 2002). Frequentemente, vários autores sugerem que o ultrassom possui ação proinflamatória, ou seja, acelera a resposta inflamatória do processo de reparação, promovendo a liberação de histamina, macrófagos e monócitos, além de incrementar a síntese de fibroblastos e colágeno (KITCHEN; PATRIDGE, 1990; LOW; REED, 2001; GUIRRO; GUIRRO, 2002).

As ondas ultrassônicas não fazem parte do espectro eletromagnético da mesma forma que as ondas curtas ou micro-ondas. Embora sejam produzidas eletricamente, as ondas ultrassônicas são ondas de compressão (ARNOULD, 1999). Conforme descrito por Rosim (2003), as ondas ultrassônicas para fins terapêuticos são geradas quando um campo elétrico de alta frequência (1 – 3 MHz) é aplicado sobre um cristal piezoelétrico localizado no transdutor do aparelho de ultrassom, que vibra na mesma frequência do campo, produzindo ondas acústicas de alta frequência. As frequências das ondas ultrassônicas variam de 20.000 a 20.000.000 de ciclos por segundo, sendo que, cada ciclo corresponde a uma pressão-rarefação por segundo (onde, 1 ciclo/s = 1 Hz). A frequência para terapia varia de 0,7 a 3 MHz. No Brasil se trabalha com frequência de 1 e 3 MHz (COHEN; ABDALLA, 2005).

A possibilidade de usar diferentes frequências entre 1 e 3 MHz, é importante na medida em que as frequências mais altas, que correspondem a 3 MHz, são absorvidas mais rapidamente, tornando-as específicas para o tratamento de tecidos mais superficiais, enquanto que frequências baixas, correspondente a 1 MHz, penetram profundamente, devendo ser aplicadas para os tecidos mais profundos (ROSIM, 2003; AGNE, 2004; MITRAGOTRI et al, 2003; DOCKER, 1987).

O modo de transmissão das ondas ultrassônicas pode ser contínuo ou pulsado. O contínuo possui características como, ondas sônicas contínuas, sem modulação, efeitos térmicos e micromassagem (diatermia). Sua utilização ocorrerá quando ambos os efeitos, térmicos e não térmicos, forem necessários (COHEN; ABDALLA, 2005).

Já o modo pulsado possui características de ondas sônicas pulsadas, modulação e amplitude com frequência de 16 Hz a 100 Hz, efeitos térmicos minimizados e efeitos não-térmicos. Este modo é bem indicado quando o calor produz dor, quando houver necessidade de redução de velocidade da condução em fibras nervosas, raízes nervosas ou gânglios, quando houver necessidade de regeneração de tecidos, quando a aplicação for feita em processos inflamatórios (na fase aguda e subaguda) e quando houver necessidade de efeitos não térmicos (COHEN; ABDALLA, 2005).

O ultrassom representa uma forma de energia mecânica que pode ser transmitida aos tecidos como ondas de pressão acústica de alta frequência. As tensões extracelulares produzidas por estas ondas podem induzir eventos bioquímicos ao nível celular e uma das suas consequências pode ser a promoção da formação óssea (CLAES; WILLIE, 2007; MALIZOS et al, 2006), este processo é denominado de mecanotransdução, no qual as células ósseas responsáveis por produzir reações bioquímicas a partir de um estímulo mecânico, determinam uma resposta celular, que pode ser produção ou reabsorção óssea (DUCAN; TURNER, 1995).

O sinal mecânico para ser transformado em biológico deve ser amplificado no nível celular pela estrutura histológica do tecido ósseo, gerando tensões em proteínas da membrana celular (integrinas) e alterando a estrutura espacial dessas proteínas. Essa alteração ativa ligações entre elas e o citoesqueleto, originando as adesões focais, locais onde proteínas citoplasmáticas são recrutadas para facilitar as reações bioquímicas. A quinase de adesão focal (FAK) é a principal delas, sendo autoativada após sofrer alteração estrutural pelas integrinas. A FAK ativada incita reações em cascata, resultando na ativação de ERK-1/2 (*extracellular-signal-regulated kinases*) e da Akt, proteínas que, junto com a FAK, regulam a produção da massa óssea (GUSMÃO; BELANGERO, 2009).

Os osteoblastos liberam citocinas em respostas a estimulação do ultrassom e a expressão de transformação do fator de crescimento- β (TGF - β), proteína conhecida por ter um papel no crescimento e reparação óssea é regulada pelo ultrassom (HARLE et al, 2005). Além disto, os clássicos marcadores específicos da diferenciação osteoblásticas, a fosfatase alcalina e a osteocalcina são reguladas pela exposição do ultrassom nas células osteoblásticas (NARUSE et al, 2003).

Estudos confirmam que muitas cascatas sinalizadoras são originadas das membranas celulares - como a BMP (*bone morphogenetic protein*), insulina como fator de crescimento e as trilhas dos hormônios paratireoides, que agem elevando os níveis séricos de cálcio (Ca^{++})

influenciando a formação óssea (TELSER; YOUNG; BALDWIN, 2007; SWARTHOUT et al, 2002; NIU; ROSEN, 2005; WAN; CAO, 2005).

Diversas pesquisas têm sido desenvolvidas relacionando o ultrassom e o tecido ósseo, principalmente na reparação de fraturas deste tecido, uma vez que o processo de reparação óssea envolve uma sequência de eventos biológicos similares aos ocorridos na embriogênese e o crescimento esquelético (DOBLARÉ; GARCÍA; GOMÉZ, 2004).

Os benefícios do ultrassom no tecido ósseo em crescimento são controversos e questionáveis conforme os trabalhos pesquisados o que torna necessário o presente estudo. Para tanto se faz necessário a seguinte pergunta: **as ondas ultrassônicas alteram o crescimento longitudinal normal do disco epifisário da tíbia de camundongos em fase de crescimento?**

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 ULTRASSOM

O som consiste em vibrações mecânicas num meio elástico que podem fazer vibrar a membrana timpânica que neste caso são consideradas vibrações sonoras, cuja frequência está entre 20-20.000 Hz. Quando a frequência está abaixo de 20 Hz, classifica-se como infrassônica ou subsônica e acima de 20.000 Hz como ultrassônica. No campo da fisioterapia, denomina-se ultrassom (US) as oscilações (ondas) cinéticas ou mecânicas produzidas por um transdutor vibratório que se aplica sobre a pele com fins terapêuticos, atravessando-a e penetrando no organismo em diferentes profundidades (AGNE, 2005).

2.1.1 Aspectos Físicos

2.1.1.1 A Natureza das Ondas Sonoras

As ondas são uma série de compressões e rarefações na direção do trajeto da onda, e por isso são chamadas de ondas longitudinais. Elas podem ocorrer em sólidos, líquidos e gases e devem-se à compressão e a separação regular de moléculas (LOW, 2001).

Quando as ondas de som passam através de qualquer material, sua energia é dissipada ou atenuada. Às vezes toda a energia é absorvida de uma vez; outras, a onda de som passa quase sem perda. As moléculas de todas as matérias se encontram em movimento aleatório constante; a quantidade de agitação molecular é o que é medido como calor, sendo este movimento oscilatório. À medida que as moléculas se empurram, vai sendo transferida energia de uma para outra, de modo que algumas oscilarão em altas frequências e com maior amplitude por terem ganhado energia, enquanto outras ficarão com frequências e amplitudes mais baixas, pois sua energia foi transferida por meio da colisão (LOW, 2001).

Quando a vibração sonora é aplicada a um material, essa é sobreposta aos movimentos existentes e soma-se a eles. O resultado final é que a onda de energia sonora regular tende a ficar aleatória à medida que a energia que cede para movimentos moleculares particulares é dissipada em colisões com outras moléculas. Desse modo, a energia sonora é constantemente convertida em energia térmica (LOW, 2001).

2.1.1.2 Produção do Ultrassom Terapêutico

São usados transdutores piezoelétricos para obter energia de ultrassom de alta frequência necessária para a produção de imagens e para terapia. Esses cristais - como quartzo ou outros minerais policristalinos, como zirconato-titanato de chumbo e titanato de bário -

são adequadamente cortados, mudando o seu formato sob a influência de uma carga elétrica (LOW, 2001).

A piezoeletricidade é um fenômeno natural encontrado em certos cristais, onde os mesmos transformam energia mecânica em energia elétrica e seu reverso, elétrica em mecânica. Se um cristal com qualidades piezoelétricas, natural ou sintético, for comprimido ou deformado por meio mecânico, uma pequena carga elétrica pode resultar dentro do cristal, de modo inverso, se uma carga elétrica for imposta ao cristal, uma vibração da deformação mecânica da estrutura molecular do cristal pode se seguir (KAHN, 2001).



Figura 01- Diagrama esquemático da conversão da corrente doméstica para alta frequência, ultrassom de alta voltagem para propostas terapêuticas.

Fonte: Adaptado de KAHN, 2001,p. 50.

O transdutor que emite a onda ultrassônica é geralmente menor que o cabeçote que o contém, sendo a área efetiva de emissão ou ERA (*Effective Radiating Area*) um parâmetro importante que determina a intensidade da onda ultrassônica (AGNE, 2005).

A intensidade de emissão, geralmente não é uniforme em toda a superfície do transdutor. Este comportamento não homogêneo do feixe ultrassônico é expresso pelo coeficiente de não uniformidade do feixe (*Beam non uniformity ratio – BNR*), onde teoricamente, o BNR não deveria ser superior a 4, ou seja, a intensidade de pico não deve ultrapassar 4 vezes o valor ajustado. Entretanto, para transdutores bem fabricados, o valor do BNR é de 5 ou 6 (AGNE, 2005).

2.1.1.3 Absorção do Feixe de Ultrassom

O grau de absorção e a conversão de energia dependem do coeficiente de absorção dos tecidos, das interfaces que os separam além da frequência, dose e tempo de aplicação do US. Pelas suas propriedades físicas, os tecidos ricos em colágeno são os que mais absorvem o feixe de US, ao contrário dos músculos e sangue com elevado índice de água (AGNE, 2005).

2.1.1.4 Atenuação e Profundidade de Penetração

As ondas ultrassônicas penetram de 4 a 6 cm nos tecidos (KAHN, 2001). À medida que o feixe de ultrassom avança nos tecidos, vai perdendo sua intensidade. Isto se dá por diversos fatores, desde a própria absorção do US pelo meio até as diversas reflexões. Também, se produzem dispersões e perdas de direção por refração, podendo torná-los ineficaz como agente terapêutico (AGNE, 2005).

A atenuação é diretamente proporcional à frequência do US utilizado, ocorrendo maior perda da intensidade quanto maior for a sua frequência empregada - 3 MHz superficial (AGNE, 2005).

2.1.1.5 Impedância Acústica

É uma característica do meio que é atravessado pelo US. Relaciona a velocidade que a partícula adquire no momento de sua vibração e a pressão a que está submetida. A impedância dá ideia da facilidade que um determinado meio oferece à passagem do US (AGNE, 2005).

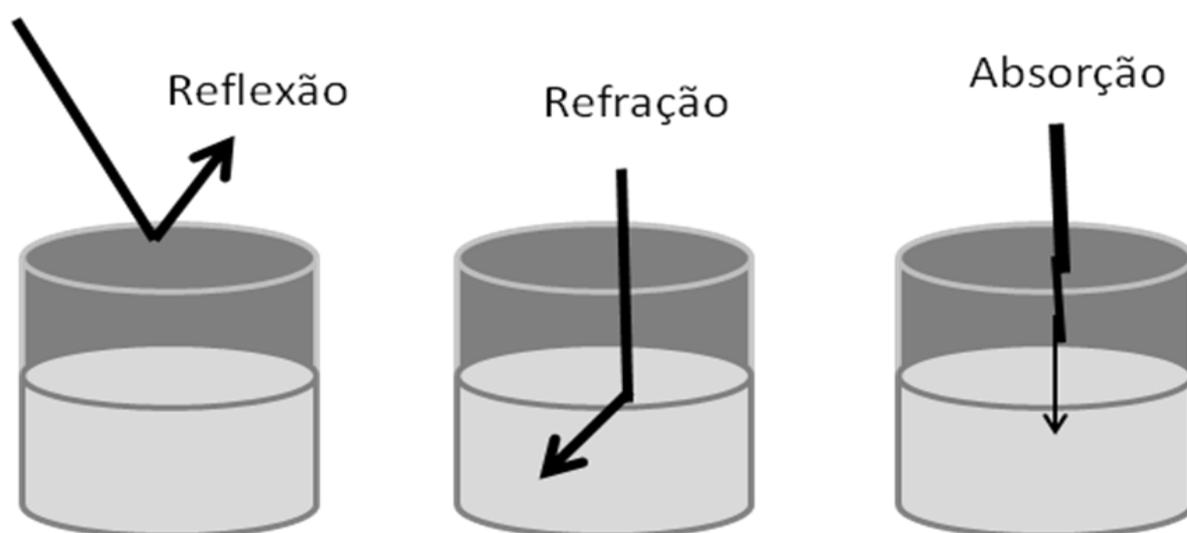


Figura 02 – Propriedades físicas do ultrassom de acordo com a impedância acústica dos diferentes tecidos.

Fonte: Adaptado de AGNE, 2005, p.294.

2.1.2 Efeitos do ultrassom no organismo:

O ultrassom produz quatro efeitos básicos no organismo, que são as reações químicas, respostas biológicas, respostas mecânicas e efeitos térmicos (KAHN, 2001).

Quanto às reações químicas, as vibrações do ultrassom estimulam o tecido a aumentar as reações e os produtos químicos locais resultando em reações químicas, assegurando circulação dos elementos e radicais necessários por recombinação (KAHN, 2001).

No que se refere às respostas biológicas, a permeabilidade das membranas fica aumentada pelo ultrassom, o que acentua a transferência dos fluidos e nutrientes aos tecidos, resultando que uma maior resposta biológica (KAHN, 2001).

Quanto às respostas mecânicas, o ultrassom pode causar a formação de bolhas ou cavidades com dimensões de micrometros em fluidos contendo gases. Dependendo da amplitude de pressão da energia, as bolhas podem ser úteis ou perigosas. Amplitudes de baixa pressão resultam na formação de bolhas que vibram até um grau em que são produzidas alterações reversíveis na permeabilidade das membranas celulares perto do evento cavitacional (MORTIMER; DYSON, 1988).

As pressões negativas no tecido durante a rarefação podem causar gases dissolvidos e formar bolhas. Neste caso, quando há produção de pequenas bolhas de gás ao atravessar um líquido orgânico, é chamado de pseudocavitação. Esta formação de bolhas pode quebrar ligações moleculares entre o gás e o tecido – cavitação transitória. O colapso das bolhas libera energia que pode também quebrar ligações. Radicais livres produzidos durante a quebra de ligações pode levar a reações de oxidação (AGNE, 2005).

Trata-se, portanto, de um efeito destrutivo ou danoso, constituindo na lesão celular provocada por força excessiva de tração e compressão das ondas do US. Estas forças rompem às células provocando a formação de múltiplas cavidades com danos às células circunvizinhas provocando também micro-hemorragia. A cavitação é provocada pela elevada potencia ou pelo excesso de tempo de aplicação sobre uma mesma região. Também pode ser provocada pela formação de ondas estacionárias que se formam quando as ondas do US colidem com a interface entre dois tecidos de diferentes impedâncias acústicas, quando produz um efeito reflexivo de parte destas ondas que interagem com ondas incidentes. O processo de cavitação é explicado também como responsável na resposta terapêutica do ultrassom sobre as pseudo – fibroses (AGNE, 2005).

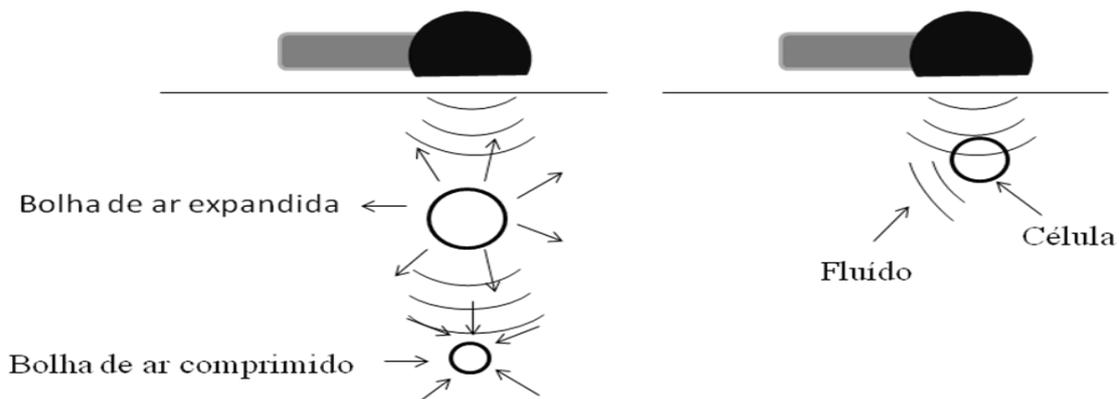


Figura 03 – Processo de cavitação formado pelas ondas ultrassônicas.
Fonte: Adaptado de AGNE, 2005, p. 294.

No que se refere aos efeitos térmicos, quando o ultrassom percorre o tecido, uma porcentagem dele é absorvida, e isso leva à geração de calor dentro daquele tecido. A quantidade de absorção depende da natureza do tecido, seu grau de vascularização e a frequência do ultrassom. Tecidos com alto conteúdo de proteína absorvem o ultrassom mais prontamente do que aqueles com conteúdo de gordura mais alto, e quanto maior a frequência maior a absorção. Um efeito térmico biologicamente significativo pode ser obtido se a temperatura do tecido for elevada para entre 40 e 45°C por pelo menos 5 minutos. O aquecimento controlado pode produzir efeitos desejáveis (LEHMANN; DE LATEUR apud KITCHEN, 2003) que incluem alívio da dor, redução da rigidez articular e aumento do fluxo sanguíneo (KITCHEN, 2003).

Depois de emitido, o calor é dissipado por difusão térmica e pelo fluxo sanguíneo local, o que pode ser um problema ao tratar lesões nas quais o suprimento sanguíneo está restrito devido à natureza da lesão ou natureza relativamente avascular do tecido. Outra complicação pode ocorrer quando o feixe de US atinge o osso ou uma prótese metálica. Devido à grande diferença de impedância acústica entre essas estruturas e os tecidos moles ao redor, haverá uma reflexão de cerca de 30% da energia incidente de volta através do tecido mole. Portanto, o aumento de calor no tecido mole será mais alto quando esse estiver situado na frente de um refletor. Para complicar ainda mais a questão, também ocorre uma interação denominada modo de conversão na interface do tecido mole e o refletor (por ex., o osso), causando aumento de calor e frequentemente dor na interface osso-tecido mole (KITCHEN, 2003).

2.2 TECIDO ÓSSEO

O tecido ósseo é um tecido altamente vascularizado (CORMACK, 2003), sendo considerado um tipo especializado de tecido conjuntivo formado por células e material extracelular calcificado, a matriz óssea. As células são os osteócitos, que se situam em cavidades ou lacunas no interior da matriz e os osteoblastos, produtores da parte orgânica da matriz, assim como os osteoclastos, células gigantes, móveis e multinucleadas, que reabsorvem o tecido ósseo, participando dos processos de remodelagem dos ossos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

Sua principal função é dar forma ao corpo e servir como adesão e sustentação para os músculos esqueléticos, que, por sua vez, permitem a este sistema de alavancas se movimentar. Dois dos mais importantes papéis secundários do osso são: (1) manutenção da concentração plasmática e tecidual de importantes íons de cálcio (Ca^{++}) e de fosfato (PO_{2-4}) e (2) servir

como local primário de produção dos elementos figurados (hemácias, células brancas e plaquetas) do sangue circulante originados do tecido hematopoiético da medula óssea, alocada nas cavidades do osso (TELSER; YOUNG; BALDWIN, 2007).

2.2.1 Composição do Osso

2.2.1.1 Células Osteoprogenitoras (Osteogênicas)

As células osteoprogenitoras (células ósseas ativas e em repouso) são derivadas do mesênquima. Na vida embrionária e fetal, as células osteoprogenitoras são precursoras ativas dos osteoblastos. Na vida adulta, a maioria destas células está em estado de repouso, a menos que sejam estimuladas a proliferar e a se diferenciar em osteoblastos (TELSER; YOUNG; BALDWIN, 2007).

Elas constituem a camada profunda do periósteo que reveste cada osso e também o endósteo que reveste a cavidade medular, canais haversianos e outros espaços de tecido mole. Quando estimuladas, proliferam dando origem a osteoblastos, em regiões que são bem vascularizadas e a condroblastos, em região que não são vascularizadas. A auto - renovação destas células – fonte bipotenciais mantém o suprimento de células osteoprogenitoras para crescimento ósseo adicional e reparo de fraturas (CORMACK, 2003).

2.2.1.2 Osteoblastos

São células especializadas, que não se dividem (CORMACK, 2003), no qual sintetizam e secretam a matriz orgânica do osso, assim como calcificam diretamente a matriz a partir da secreção de pequenas vesículas (50 – 250 nm) de matriz contendo fosfatase alcalina e outros fatores iniciais de ossificação (TELSER; YOUNG; BALDWIN, 2007).

Eles caracterizam superfícies de crescimento e sua ultra- estrutura é típica de células secretoras (CORMACK, 2003).

2.2.1.3 Osteócitos

Quando um osteoblasto se torna completamente envolto pelo tecido ósseo lamelar, é chamado de osteócito. Tem localização ideal para participar da homeostase de Ca^{++} , a qual é amplamente regulada pelo paratormônio e pela calcitonina, além disso, os osteócitos produzem matriz óssea (TELSER; YOUNG; BALDWIN, 2007). Representam o estágio final de maturação da linhagem das células do tecido ósseo (CORMACK, 2003).

2.2.1.4 Osteoclastos

Os osteoclastos se originam dos precursores dos monócitos circulantes. Uma vez recrutados para um local em que o osso será reabsorvido, 10 a 20 destes monócitos precursores se fundem para formar uma célula gigante multinucleada. Esta célula multinucleada forma uma aderência com a superfície do osso através de mediadores específicos de integrinas, uma família de distribuição abrangente entre as moléculas de adesão celular. A adesão se focaliza em uma pequena área da superfície óssea, no qual os osteoclastos elaboram uma margem extensa ondulada e começam a degradar a matriz inorgânica pela secreção de H^+ e da matriz orgânica pela secreção de proteases. Sua principal função é reabsorver osso e, como tal, eles têm papel importante no desenvolvimento ósseo, crescimento e remodelamento (TELSER; YOUNG; BALDWIN, 2007).

2.2.1.5 Matriz óssea

A matriz óssea pode aguentar dobramentos, torções, compressões e distensões. Além de ser dura feito rocha, devido a sais de cálcio insolúveis, ela é altamente resistente a forças tenseis, devido a uma abundância de fibrilas colágenas. O colágeno é principalmente do tipo I, com pequenas quantidades do tipo V. Ele representa mais de 90% do conteúdo orgânico da matriz óssea. Somente 25% da matriz óssea são de água. Outros constituintes orgânicos da matriz são glicosaminoglicanos, glicoproteínas, osteonectina e osteocalcina (uma proteína de ligação a cálcio). Além disso, a reabsorção óssea libera outras proteínas que tem a capacidade de induzir a formação óssea. Finalmente, quase 70% do peso líquido da matriz óssea são de mineral ósseo, principalmente hidroxiapatita cristalina (CORMACK, 2003).

2.3 CRESCIMENTO ÓSSEO

Algumas das células nas superfícies de crescimento de um osso são células osteoprogenitoras. Em seu ambiente vascularizado, a progênie destas células-fonte pode persistir como células osteoprogenitoras, ou elas podem se diferenciar em osteoblastos que depositam uma nova camada de matriz na superfície preexistente. Durante todo o processo, entretanto, as células osteoprogenitoras permanecem na posição superficial necessária para repetir o processo quando a necessidade surge. Referido como mecanismo de crescimento aposicional, este processo simples estabelece o tecido ósseo em uma camada por vez e é o único modo pelo qual o tecido ósseo pode crescer. Cada nova geração de osteoblastos adiciona novos canalículos, de modo que quando estas células se tornam osteócitos, elas estão ligadas à superfície óssea acima e aos osteócitos abaixo (CORMACK, 2003), ou seja, o

crescimento ósseo ocorre apenas na região de desenvolvimento ou remodelamento, e não dentro da massa óssea (TELSER; YOUNG; BALDWIN, 2007).

O crescimento ósseo envolve mais do que deposição de tecido ósseo. Ele depende da íntima coordenação entre dois processos opostos. Os osteoclastos compensam a adição de tecido ósseo novo através da remoção de uma quantidade similar de tecido ósseo velho de locais desnecessários, prevenindo assim a construção excessiva de tecido ósseo. O processo que conduz à mudança no formato de um osso em crescimento como resultado da deposição em certos locais e reabsorção em outros é descrito como remodelação óssea (CORMARK, 2003).

O osso começa seu desenvolvimento no útero entre o final da fase embrionária (oitava semana) e o início da fase fetal (nona semana). Entre outros aspectos, o mesênquima tem a capacidade de diferenciação diretamente no osso ou na cartilagem. Os ossos longos do corpo são os primeiros a aparecer como modelos de cartilagem dos ossos maduros que irão substituí-las. Assim, o crescimento ósseo ocorre por dois mecanismos: o desenvolvimento mesenquimal e o desenvolvimento endocondral (TELSER; YOUNG; BALDWIN, 2007).

2.3.1 Desenvolvimento endocondral do osso

Os ossos longos se desenvolvem pela substituição do molde de cartilagem – em um processo chamado formação endocondral do osso. O primeiro surgimento do osso no desenvolvimento endocondral ocorre seguindo as mudanças nos condrócitos, no meio da diáfise do molde cartilaginoso. Estes condrócitos se tornam hipertróficos, alteram seu programa genético para secretar grandes montantes de colágeno tipo X e atrair vasos sanguíneos através da liberação de fatores de crescimento. Os condrócitos hipertróficos também dirigem as células do pericôndrio adjacente para se diferenciarem em células osteoprogenitoras, as quais se distinguem posteriormente em osteoblastos, que produzem o primeiro osso na forma de um fino colar envolvendo a região da diáfise do molde cartilaginoso. Quando o colar de osso não-lamelar envolve a região de condrócitos hipertróficos completamente, os condrócitos hipertróficos entram em morte celular programada, deixando uma pequena área invadida pelos osteoblastos, brotos de capilares e tecido hematopoiético. A morte dos condrócitos caracteriza o início da mineralização de sua própria matriz, por meio da liberação de vesículas de matriz contendo fosfatase alcalina e outras proteínas. Os precursores monócitos dos osteoclastos são atraídos para a matriz cartilaginosa calcificada (TELSER; YOUNG; BALDWIN, 2007).

Em nível microscópico, as mudanças celulares ocorrem no local do colar ósseo, no qual os capilares invadem a diáfise de crescimento, subdividem-se e se projetam ao longo do eixo longitudinal do modelo de cartilagem. Os osteoblastos depositam osteóide (que são fibras colágenas finas e homogêneas) e, em seguida, o osso não-lamelar alonga as espículas remanescentes de cartilagem calcificada. Os caminhos são, então, gerados por uma ação combinada de osteoclastos e capilares. Os condrócitos direcionados à porção epifisária final do modelo continuam se proliferando e hipertrofiando. A essa altura, um centro secundário de ossificação começa no interior da epífise do modelo cartilaginosa. Alguns condrócitos na metafise assumem uma forma discóide achatada e se assemelham a moedas empilhadas. Estas mudanças resultam em um disco ou uma placa cartilaginosa entre o osso primário esponjoso e o centro secundário de ossificação. Tal arranjo de células é denominado disco epifisário (TELSER; YOUNG; BALDWIN, 2007).

A placa de crescimento é o principal local de alongamento, crescimento e remodelagem do osso até a puberdade. Este é o resultado de um processo que dura muitos anos em que ocorre proliferação e hipertrofia dos condrócitos, calcificação e substituição por osso até que o disco epifisário seja completamente ossificado (ou fechado), o que acontece no final da puberdade (TELSER; YOUNG; BALDWIN, 2007).

2.3.2 Disco epifisário

É geralmente dividido em quatro zonas, embora os nomes delas possam diferir em diversas fontes. Por convenção, as zonas são enumeradas começando pela mais distante da diáfise (TELSER; YOUNG; BALDWIN, 2007), explicadas a seguir:

1) Zona de cartilagem em repouso ou de reserva

A zona de cartilagem que se limita com o tecido ósseo da epífise está em repouso no sentido em que seus condrócitos não estão contribuindo ativamente para o crescimento ósseo. Seu principal papel é ancorar o resto do disco epifisário à epífise óssea. Os capilares interpostos entre ele e a epífise óssea adjacente suprem de oxigênio e nutrientes não somente o tecido ósseo na epífise, mas também todos os condrócitos no disco profundamente até a zona de cartilagem calcificada (CORMACK, 2003).

2) Zona de cartilagem em proliferação

Os condrócitos na zona de cartilagem em proliferação (mais apropriadamente chamada de zona de condrócitos proliferativos) se dividem e fornecem novos condrócitos para substituir aqueles perdidos do lado diafisário do disco. As células em proliferação se dispõem

em colunas longitudinais características semelhantes a pilhas de moedas e estas colunas contêm ocasionais figuras mitóticas (CORMACK, 2003).

3) Zona de cartilagem em manutenção

Também conhecida como zona de cartilagem hipertrófica, os condrócitos em maturação permanecem arrumados em colunas longitudinais, porém hipertrofiaram e estão preenchidos com glicogênio e lipídios acumulados. Consequentemente, eles são grandes e palidamente corados. Acredita-se largamente que a enzima fosfatase alcalina que eles produzem facilita a calcificação da matriz extracelular (CORMACK, 2003).

Quanto mais longe estiver a zona 3 de condrócitos da zona 2, maior será a taxa de depósito de matriz, portanto, a zona 3 é a principal responsável pelo crescimento do disco epifisário. Os condrócitos hipertróficos iniciam a síntese de colágeno tipo X, secretam fatores que estimulam a microvascularização (crescimento capilar) e entram em morte celular programada (TELSER; YOUNG; BALDWIN, 2007).

4) Zona de cartilagem calcificada ou em calcificação

Também conhecida como zona de cartilagem provisória, esta zona é assim chamada porque sais de cálcio insolúveis tornam-se depositados na matriz da cartilagem. Em cortes ao MO, algumas lacunas aparecem vazias e frágeis, e muitas das finas divisões transversais mostram sinais de colapso. Estudos em ME indicam que a maioria dos condrócitos nesta zona estão estruturalmente intactos e viáveis. Entretanto, condrócitos apoptóticos são encontrados na fileira terminal adjacente à frente de invasão celular. Enquanto a típica matriz cartilaginosa contém inibidores angiogênicos. Os capilares com células osteoprogenitoras associadas consequentemente crescem para dentro desta zona a partir da diáfise, fornecendo um ambiente vascular no qual os osteoblastos se diferenciam e depositam a matriz óssea sobre o arcabouço de cartilagem calcificada remanescente (CORMACK, 2003).

A taxa de produção de matriz pelos condrócitos (na interface entre as zonas 3 e 4) é que leva o osso a crescer em comprimento – em taxa considerável durante a fase fetal e em menor taxa durante a vida pós-natal (TELSER; YOUNG; BALDWIN, 2007).

As características moleculares da cartilagem e os variados genes expressos em todas as cartilagens, mas, especialmente, no disco epifisário, são notáveis. Dentre as menores proteínas que compõem a matriz cartilaginosa, podemos citar as endostatinas. Estas inibem o crescimento, a motilidade e as proteases características das células endoteliais (as células epiteliais dos capilares delimitam todos os vasos sanguíneos), quando vascularizam o tecido. Acredita-se que as endostatinas da cartilagem são fatores principais para a manutenção da natureza avascular da cartilagem. Como mencionado anteriormente, os condrócitos

hipertróficos secretam fatores de crescimento específicos (fator de crescimento vascular endotelial - VEGF), que estimulam a vascularização local da matriz cartilaginosa. Entretanto, as profundas mudanças que ocorrem na zona 4 do disco epifisário – depósito de matriz cartilaginosa, cessação da síntese de endostatina e liberação e nova secreção de VEGF por condrócitos hipertróficos – levam a cartilagem a calcificar e se vascularizar nesta zona de ossificação (TELSER; YOUNG; BALDWIN, 2007).

Muitos fatores específicos (moléculas que atuam como vias de sinalização de transcrição que as regulam e vários fatores de crescimento) que são instrumentos que controlam e coordenam as séries de eventos descritos já foram elucidadas, todavia algumas ainda estão para serem descobertas (TELSER; YOUNG; BALDWIN, 2007).

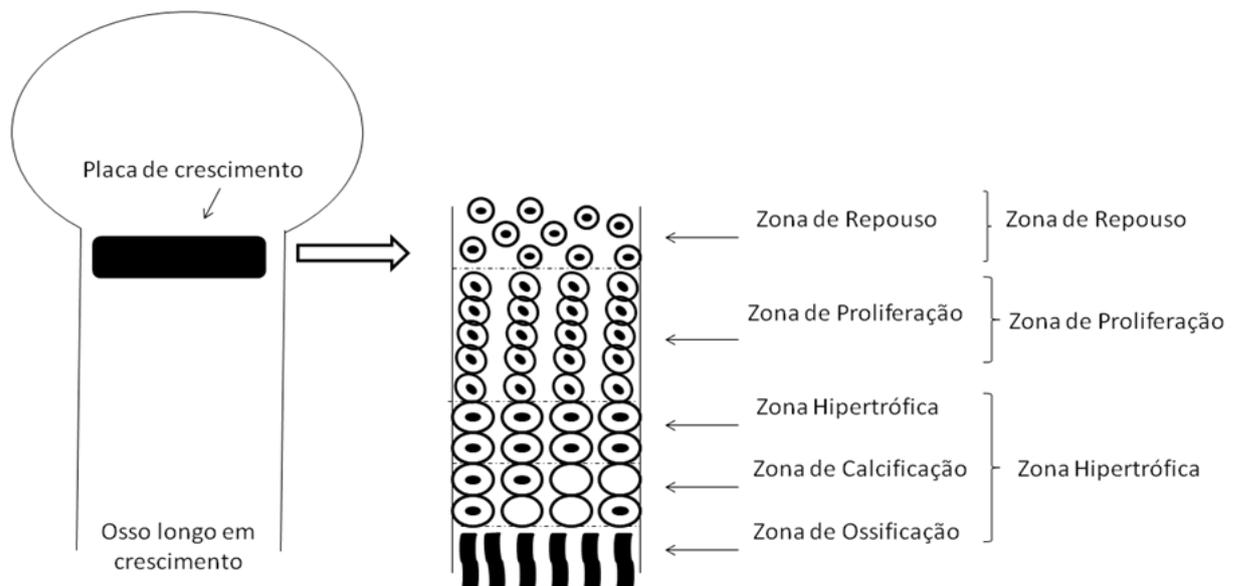


Figura 04– Zonas constituintes do disco epifisário, mostrando as principais características das células de cada camada.

Fonte: Adaptado de CORMACK, 2003, p. 154.

2.4 O ULTRASSOM E O TECIDO ÓSSEO

Estudos demonstram que a energia ultrassônica pode interferir nos processos de reparação de estruturas profundas como o tecido ósseo (POUNDER; HARRISON, 2008; CHEUNG et al, 2010; ANGLE et al, 2010).

A aplicação de um campo acústico pode determinar a ação de um campo elétrico no nível da membrana celular, o que leva a um afastamento da condição de equilíbrio eletroquímico, com o surgimento de uma densidade de corrente iônica para o interior da célula (SILVA, 1977).

Devido às propriedades bioelétricas do osso, a carga mecânica que nele atua por ação de forças hemodinâmicas age como estímulo externo, fazendo com que a matriz extracelular óssea se deforme induzindo campos elétricos intramoleculares. De acordo com este sinal elétrico, o osso operará mudanças materiais de maneira adequada quanto à quantidade, tempo e direções necessárias à regeneração, remodelando o crescimento ósseo segundo o processo de retroalimentação negativa. Isto é, à medida que mais material vai se formando, aumentará a resistência ao estímulo, como um exemplo típico da lei de Wolff (DUARTE, 1983). A lei de Wolff relaciona o crescimento ósseo às tensões e deformações localizadas no osso, isto é, a capacidade do osso de adaptar-se às mudanças de tamanho, forma e estrutura depende das tensões mecânicas aplicadas. Se a tensão diminui, ocorre a reabsorção do osso periosteal e subperiosteal com a conseqüente diminuição em resistência e rigidez. Se o osso é sujeito a altas e consistentes tensões mecânicas, concernentes a um índice fisiológico normal, pode ocorrer uma hipertrofia do osso periosteal e subperiosteal, com um aumento na densidade óssea (GUIRRO; GUIRRO, 2002).

A regeneração e o remodelamento ósseo podem ser explicados em face dos efeitos de transdução de energia elástica em elétrica, associando mesmo um vetor permanente de polarização elétrica na direção do crescimento ósseo (BASSET, 1971).

Em uma experiência que foi designada na hipótese de que o ultrassom exerce uma influencia similar no osso como uma estimulação mecânica a nível fisiológico, cujo objetivo foi de determinar se o ultrassom estimulava o crescimento do osso intacto, não fraturado em modelos animais vivos. 18 ratas adultas da linhagem wistar foram divididas em 03 grupos: no grupo 1 foi aplicado somente o ultrassom, programado para 200 μ s, frequência de 1 MHz, ISATA de 150 mw/cm² e intensidade de 30 mw/cm². No grupo 2, o carregamento mecânico e o ultrassom foram aplicados concomitantemente e no grupo 3, o carregamento mecânico foi aplicado sozinho, em todos os grupos o experimento ocorreu na ulna esquerda. O carregamento mecânico se deu por 40 ciclos de compressão axial a uma magnitude que induziu tensões mecânicas. Ao final do experimento de 14 dias, não houve diferença estatística significativa na taxa de aposição mineral (MAR) entre os grupos. No entanto, os resultados da pesquisa demonstraram que os efeitos da estimulação de baixa intensidade do ultrassom pulsátil imitam as ações de carregamento mecânico fisiológico quando aplicados em ossos intactos. Tanto o carregamento mecânico, quanto o ultrassom foram associados ao aumento significativo de formação óssea *in vivo*. Este estudo mostra claramente que a formação óssea pode ser induzida por estimulação mecânica de baixa intensidade, clareando

assim o uso do ultrassom como intervenção terapêutica de doenças com perdas ósseas (PERRY et al, 2008).

Em outro estudo, avaliou-se a influência da aplicação do ultrassom, em suas formas contínua e pulsada, sobre as epífises de tíbias de coelhos em crescimento, visando identificar doses que provocassem alterações macroscópicas e microscópicas, prejudicando o crescimento ósseo normal. Foram utilizados 32 coelhos com oito semanas de idade, divididos em três grupos, nos quais se aplicou em diferentes áreas e intensidades de radiação; as tíbias esquerdas nos três grupos foram usadas como controle. Fêmures e tíbias de todos os animais foram radiografados dois dias antes da primeira aplicação e ao completarem 16 semanas, realizando-se análise histomorfométrica da placa de crescimento epifisário para avaliação dos campos microscópicos consecutivos nas regiões lateral e medial. No grupo I, que recebeu ultrassom pulsado com intensidade de 3 w/cm^2 por 5 minutos/dia por 10 dias, não houve diferença estatística significativa dos lados esquerdo e direito em todas as análises. Nos grupos II e III, que foram aplicados ultrassom contínuo com intensidade de 1 w/cm^2 e 2 w/cm^2 por 5 e 3 minutos respectivamente, no entanto, ocorreram alterações, prejudicando o crescimento ósseo (SANTOS et al, 2005).

Na nesta linha de pesquisa, foi desenvolvido um experimento com o objetivo de se investigar se intensidades abaixo de 30 mw/cm^2 provocam respostas fenóticas em células da medula óssea de ratos. Para isso, as células foram colocadas em cultura e expostas a intensidades de 2, 15 e 30 mW/cm^2 com ultrassom pulsátil por 20 minutos, sendo acompanhadas nas fases aguda, intermediária e tardia da diferenciação osteogênica. Depois de 5 dias com tratamento diário nas referidas intensidades, a fosfatase alcalina, que é um indicador de diferenciação osteoblástica, aumentou em 79%, 147% e 209%, respectivamente, indicando que as várias intensidades foram capazes de iniciar a diferenciação óssea. Enquanto todos os tratamentos com ultrassom mostraram mineralização alta, de forma interessante, houve um aumento maior de 225% de mineralização em células tratadas com 2 mW/cm^2 , com intensidade de 15 e 30 mW/cm^2 o aumento foi de 120% e 82%, respectivamente. Este estudo mostrou que intensidades de ultrassom abaixo do padrão clínico têm efeito positivo na diferenciação osteogênica, sugerindo que, se confirmado o aumento da mineralização óssea *in vivo*, poderá ser o primeiro passo para se redefinir as intensidades usadas na clínica (ANGLE et al, 2010).

Em concordância com este estudo, foi realizada uma pesquisa que sugestionou que o ultrassom de 1.5 MHz, com 30 mW/cm^2 , aplicados por 20 minutos em células estromais da medula óssea de ratos *in vitro* aumentam a atividade da fosfatase alcalina e apresentam um

importante papel na abertura da comunicação da fenda juncional intercelular destas referidas células. A fosfatase alcalina (ALP) está presente quando as células passam de pré – osteoblásticas para osteoblásticas. Para isso, é bem aceito que a atividade específica da ALP em uma população de células osteoprogenitoras aumente quando há troca correspondente para estágios de diferenciação. O nível de ALP tem sido usado em experiências *in vivo* como marcador de diferenciação osteoblástica. No referido estudo, as células foram tratadas por 07 dias e a partir daí colheu-se a ALP (SENA et al, 2010).

Em uma vasta revisão de literatura, pesquisadores afirmaram que estudos histológicos sugestionam que o ultrassom pulsátil de baixa intensidade – LIPUS influencia as principais células envolvidas na reparação óssea, incluindo osteoblastos, osteoclastos, condrócitos e a medula óssea mesenquimal. Afirmam que há evidências que o LIPUS tem efeito positivo na regeneração óssea, com aceleração e estimulação na fase da formação do calo ósseo macio e não durante a fase de remodelagem. Embora a energia usada pelo LIPUS seja extremamente baixa, os efeitos em células *in vivo* e *in vitro* tem sido demonstrados. Mas o processo biofísico pelo qual o LIPUS estimula a regeneração óssea ainda permanece desconhecido (CLAES; WILLIE, 2007).

O propósito de outro estudo foi de testar se o comprimento do osso longo em crescimento de ratos poderia ser afetado por uma aplicação breve e repetida de ultrassom. Para isso foram selecionados ratos machos da raça *sprague-dawley* de 04 semanas de idade que foram tratados por 20 minutos/dia com ultrassom de frequência de 1.5 MHz, 200 μ s de pulso modulado a 1 KHz, com intensidades de 30 mw/cm^2 e 53 mw/cm^2 . Duas experiências foram executadas. No experimento 01, foram usados 03 grupos. No grupo A (n=6) foi aplicado ultrassom; o grupo B (n=6) recebeu também tratamento com ultrassom e o grupo C (n=4) foi o controle não recebeu tratamento algum. No experimento 02 o objetivo foi observar qualquer combinação de efeitos entre o ultrassom e o trauma periosteal. Todos os animais do experimento 02 receberam abrasão cirúrgica do perióstio do fêmur somente na perna tratada, antes do início das aplicações do ultrassom com o objetivo de estimular o crescimento ósseo, 02 grupos foram usados. O grupo A (n=6) com tratamento de ultrassom e o grupo B (n=6) com tratamento imitado. Os resultados foram analisados através de densitometria óssea e medidas ósseas, onde o osso em crescimento se mostrou relativamente insensível ao ultrassom (SPADARO; ALBASENE, 1998).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Verificar as alterações histológicas no disco epifisário da tíbia em crescimento de camundongos em exposição a ondas ultrassônicas com frequência de 1MHz.

3.2 ESPECÍFICOS

1. Identificar as alterações na morfometria da área da cabeça da tíbia versus a área do disco epifisário.
2. Verificar o comprimento das zonas do disco epifisário, quais sejam hipertrófica mais calcificada e a zona proliferativa.
3. Identificar as alterações histológicas no disco epifisário decorrentes das doses de 0,1 w/cm² e 0,5 w/cm² de ondas ultrassônicas aplicadas sobre a tíbia em crescimento de camundongos.

4 JUSTIFICATIVA E PROBLEMATIZAÇÃO

O ultrassom é uma modalidade terapêutica amplamente utilizada na prática fisioterapêutica, sendo vital a compreensão completa de seus efeitos físicos e biológicos e mecanismos de ação nos tecidos de modo a usá-la efetivamente e, o mais importante, com segurança (KITCHEN, 2003).

Embora utilizado na área médica a mais de 70 anos muitos dos efeitos biológicos da terapia ultrassonora não foram comprovados, nem tampouco suas contra indicações. Uma dessas contra indicações controversas e pouco estudadas é a sua utilização nas epífises de crescimento ósseo, por conter o disco epifisário. Portanto muitas crianças deixam de ser tratadas por esse recurso pela dúvida do fisioterapeuta em relação aos efeitos adversos nessa região. (SANTOS et al, 2005; SPADARO; ALBANESE,1998).

A formação e a regeneração óssea são resultados de inúmeras interações bioquímicas, biomecânicas, celulares e hormonais (BOLANDER, 1992), assim o ultrassom pode ser usado como um estimulador mecânico responsável por produzir reações bioquímicas determinando uma resposta celular, desde que usado nos parâmetros adequados (DUCAN; TURNER, 1995; HUGHES-FULFORD, 2004).

A célula óssea pode, rapidamente, identificar as características do estímulo mecânico e responder eletrofisicamente em modos diferentes, com maior ou menor ativação dos canais iônicos, resultando em hiperpolarização ou despolarização da membrana plasmática. O que determina a intensidade da ativação dos canais iônicos não está claro, mas sabe-se que a intensidade e a frequência do estímulo mecânico, bem como a velocidade do fluxo do fluido, regulam a ativação desses canais. Sabe-se que a hiperpolarização está associada à osteogênese, enquanto a despolarização, com a reabsorção óssea (SOOTT et al, 2008).

Normalmente na prática clínica na aplicação do ultrassom terapêutico, são empregados dois regimes de emissão de ultrassom, o contínuo e o pulsado. O modo contínuo se caracteriza por ondas sônicas contínuas, sem modulação e com efeito térmico, enquanto o modo pulsado apresenta ondas sônicas pulsadas, com modulação em amplitude e efeitos térmicos minimizados (AGNE, 2005).

Neste sentido, só ocorrerá diferença de temperatura entre os dois regimes de pulso caso a energia depositada no modo contínuo for maior. A alteração da temperatura está relacionada com o aumento do tempo de aplicação ou da intensidade utilizada. A área a ser aplicada, determinará o tempo de aplicação, isto é, uma área lesionada maior, implica em um maior tempo gasto para a terapia ultrassônica (AGNE, 2005).

Diversos autores contra indicam o uso do ultrassom absolutamente em epífises de crescimento ósseo (KITCHEN, 2003; KAHN, 2001; AGNE, 2005), há autor que indica com cautela (LOW, 2001) e existem autores que após realizarem a sua pesquisa, verificaram que o tecido ósseo foi insensível ao ultrassom, não tendo, portanto, nenhuma contra indicação (SPADARO; ALBANESE, 1998). Por fim, há ainda autor que afirma que o ultrassom terapêutico produz alterações histológicas significativas na espessura da cartilagem no lado tratado, sugerindo uma aceleração no metabolismo da placa (FRÉZ et al, 2006).

Diante da controvérsia científica quanto à indicação ou contraindicação do uso das ondas ultrassônicas nas epífises de crescimento ósseo. Justifica-se o presente estudo, pois o mesmo poderá esclarecer o comportamento do tecido ósseo à exposição ultrassônica, mais precisamente no disco epifisário, além de contribuir para a prática da fisioterapia no sentido de se buscar as melhores respostas fisiológicas do tecido ósseo, o que vem a somar no enriquecimento da discussão científica sobre o assunto.

5 MATERIAL E MÉTODO

5.1 CARACTERÍSTICA DO ESTUDO

O estudo foi experimental de natureza quali-quantitativa e randomizado. A pesquisa foi submetida à comissão de ética em pesquisa de animais da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP), sendo aprovado através do certificado n°. 454515/2011 (Anexo 1), conforme normas o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), em concordância com a Lei Federal n° 6.638, de 08 de maio de 1979, que estabelece normas práticas didático-científica de conduta de pesquisa experimental em animais (ZIMMERMANN, 1983).

Teve aporte financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPQ, aprovado através da chamada universal n°. 14/2011 (Anexo 2).

5.2 POPULAÇÃO E AMOSTRA

A pesquisa foi realizada com 16 camundongos albinos da linhagem *Swiss Webster* (SW), em fase de crescimento, com idade de aproximadamente 03 semanas, machos, com peso entre 10-15g, provenientes do Biotério do Laboratório Central de Saúde Pública do Estado do Amapá – LACEN. Os animais foram mantidos em condições ambientais controladas ($22^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$; Umidade Relativa de 40-60%). Sendo mantidos com comida e água *ad libitum*, com ciclos de luz alternados de 12 em 12 horas.

5.3 LOCAL DE REALIZAÇÃO DO ESTUDO

O estudo foi realizado no laboratório de toxicologia do curso de ciências farmacêuticas da Universidade Federal do Amapá - UNIFAP e no laboratório de patologia cirúrgica do departamento de estomatologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo - USP.

5.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Como critério de exclusão, foram eliminados da pesquisa animais que tivessem mais de 03 semanas de vida, uma vez que a taxa de crescimento do camundongo ocorre por um período de 39 dias que vai desde o desmame (21 dias) até a maturidade sexual (60 dias) (CARVALHO et al, 2009).

As fêmeas também foram excluídas, pois as células das placas de crescimento sofrem fortemente influencia em seu metabolismo de fatores hormonais (DECHIARA et al, 2000).

5.5 APARATO EXPERIMENTAL

5.5.1 Preparação das gaiolas

Todos os animais foram mantidos em gaiolas de polietileno (*steel house*) identificadas segundo cada grupo de pesquisa com dimensões padronizadas de 20 x 20 x 30 cm com fundo recoberto com palha de arroz e tela aramada.

5.5.2 Equipamento de ultrassom

Os grupos receberam tratamento veiculado com o ultrassom terapêutico, modelo *Sonacel expert* da marca Bioset - Indústria de Tecnologia Eletrônica Ltda. Parâmetros físicos utilizados foram: frequência de 01 MHz, cabeçote reduzido especialmente desenvolvido para experimento animal com área de irradiação efetiva (ERA) de 0,8 cm²; modo de corrente contínuo; intensidade variando de 0,1 a 2 w/cm²; durante um minuto e meio, em movimento circular, conforme quadro 01.

Quadro 01 – Parâmetros físicos do equipamento utilizado.

Frequência	ERA	Modo de aplicação	Intensidade
1 MHz	0,8 cm ²	Contínuo	0,1 a 2 w/cm ²

Este equipamento atende os requisitos da norma de segurança para equipamentos eletromédicos IEC 601 (norma geral) e IEC 601-2-5 (norma particular para equipamentos de ultrassom).

O transdutor foi acoplado através de gel condutor diretamente com uma pequena pressão disposta na face lateral do joelho direito do animal, permanecendo nessa posição durante toda a sessão de aplicação do ultrassom conforme técnica adaptada de Barreto (2009).

Foi escolhida a articulação do joelho por ela ser a região responsável pela maior porcentagem de crescimento dos membros inferiores (OGDEN, 1990) e as placas de crescimento foram utilizadas as tíbia, devido ao fácil acesso (PACHECO, 2003) e pelo fato de ser mais regular e de fácil medição.

5.6 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 02 grupos de 08 animais, no qual os mesmos não sofreram nenhum tipo de lesão óssea. Os procedimentos ocorreram em uma aplicação/dia, totalizando ao final, dez aplicações sem interrupção. O membro elegível foi o

direito, ficando o membro esquerdo como controle. Foram propostos dois grupos de tratamento designados Dose 01 e Dose 02 e um grupo Controle, com os seguintes parâmetros:

- Dose 01 (Grupo D1): frequência = 1MHz; intensidade = 0,1 w/cm²; contínuo e tempo = 1,5 minutos.
- Dose 02 (Grupo D2): frequência = 1 MHz, intensidade = 0,5 w/cm², contínuo e tempo = 1,5 minutos.
- Controle (Grupo C): não receberá tratamento algum (conduta expectante).

Estes parâmetros foram definidos a partir de um ensaio clínico com 20 animais (apêndice A), e em concordância com a sugestão deixada pela pesquisa de Santos et al (2005) que concluiu que estudos adicionais deveriam ser realizados utilizando ultrassom contínuo em epífises de crescimento ósseo em doses menores que 1w/cm².

Quadro 02 – Parâmetros utilizados nos grupos experimentais.

GRUPOS	FREQUENCIA	INTENSIDADE	MODO DE APLICAÇÃO	TEMPO DE APLICAÇÃO
D 1	1 MHz	0,1 w/cm ²	Contínuo	1,5 minutos
D 2	1 MHz	0,5 w/cm ²	Contínuo	1,5 minutos
C	-	-	-	-

5.7 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS

Ao término de cada experimento os animais foram sacrificados em câmara de CO₂. As carcaças foram descartadas juntamente com os resíduos biológicos do laboratório de toxicologia e foram recolhidos por uma empresa especializada, a fim de que fosse realizada a incineração dos mesmos.

5.8 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Após a eutanásia dos animais, ocorreu à biópsia óssea da tíbia direita e esquerda dos animais. Os membros inferiores direito dos grupos D1 e D2, juntamente com o membro esquerdo do grupo controle foram amputados e dissecados.

As peças obtidas foram identificadas (número do animal e grupo), fixadas em paraformol 10% e enviadas para o laboratório de patologia cirúrgica do departamento de estomatologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo - USP para processamento e análise histológica, segundo protocolo de Histologia da USP.

O material foi descalcificado em solução contendo ácido etileno-diamino-tetracético - EDTA a 5%, este processo durou 03 dias. Após a descalcificação, o material foi seccionado no plano coronal e processado para inclusão em parafina. A seguir, foram introduzidas em processador histológico automático (Leica 1010, Alemanha) em cadeia crescente de banhos de etanol 70% até o etanol absoluto. Foi realizado então banho com etanol/xilol 50%, dois banhos em xilol e, por fim, imersão em parafina com ponto de fusão em 60°C, confeccionando-se os blocos de tecido. Três cortes de 3µm foram obtidos em micrótomo e as laminas foram coradas automaticamente em hematoxilina e eosina por intermédio de máquina de coloração (Sakura Finetek, USA Inc.), sendo então analisadas em microscopia de luz convencional, os outros dois cortes foram submetidos a colorações especiais descritas a seguir.

A técnica de *alcian blue* teve por objetivo determinar variações da matriz cartilaginosa. Os blocos foram desparafinizados em banhos sucessivos de xilol e hidratados em banhos sucessivos de álcool decrescentes e água, após a hidratação as laminas foram mergulhadas em *alcian blue* 1% acético, depois lavadas em água corrente, sendo finalmente desidratadas e montadas em resina.

Já o método de *von kossa* teve por objetivo identificar possíveis focos de calcificação fora da placa epifisária. Os blocos foram desparafinados em banhos sucessivos de xilol e hidratados em banhos sucessivos de álcool decrescentes e água, após a hidratação, as laminas foram mergulhadas em nitrato de prata 5% e reveladas com revelador fotográfico. Em seguida lavadas em água destiladas e em tiosulfato de sódio 5% para então serem desidratadas e montadas em resina, obtendo-se no final deste processo sais de cálcio de cor negra.

Depois de realizadas as devidas técnicas de coloração, procedeu-se com a mensuração histológica realizada através do sistema de análise digital de imagem, que consiste em um microcomputador *infoway* ST 4255 com placa digitalizadora que contem o *software* especializado Lasv 4.1, em plataforma Windows, conectado a uma camara Leica DFC 295 acoplada ao microscópico ótico Leica DM 2500, lentes objetivas plan-acromáticas.

Com o aumento de 5x, mediu-se a área total da cabeça da tíbia e da área total do disco epifisário, para identificação de possíveis alterações da espessura do disco epifisário por cálculo de área expressas em micrômetros. Com o aumento de 10x, foram tiradas 03 medidas de três áreas diferentes e de forma linear expressas em micrômetros das zonas proliferativa e hipertrófica. Não foram medidas as espessuras separadamente das zonas hipertrófica e a calcificada, pois as colorações utilizadas nas laminas, impunham dificuldade em separar com precisão estas duas zonas, conforme relatou Pacheco (2003). Ideia esta ratificada por diversos

autores que dividem a placa de crescimento em somente três zonas segundo a sua morfologia e suas características funcionais, que são a zona de repouso, a proliferativa e a hipertrófica (BASHEY et al,1991; BYERS et al, 1997; WEISE et al, 2001; ABAD et al, 2002 apud PACHECO,2003). Não se mediram de forma separada as zonas de repouso e de ossificação, pois não estas zonas são o foco desta pesquisa. Desta maneira, a medida da espessura das zonas se deu em relação à zona proliferativa e a hipertrófica, pelo seu grau de importância no crescimento ósseo.

A análise morfométrica foi realizada por uma patologista experiente, que recebia as lâminas sem o grupo ou o número do animal. Nas mesmas foram colocados códigos correspondentes aos grupos e o número de cada animal no grupo para que as análises descritivas da epífise de crescimento fossem cegas.

5.9 HIPÓTESES

Hipótese nula: As ondas ultrassônicas não tem efeito sobre a epífise óssea em relação à espessura da placa de crescimento.

Hipótese 1: As ondas ultrassônicas afetam a epífise óssea em relação à espessura da placa de crescimento, diminuindo o crescimento ósseo.

Hipótese 2: As ondas ultrassônicas afetam a epífise óssea em relação à espessura da placa de crescimento, aumentando o crescimento ósseo.

5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística foi utilizado teste de Friedman com correção de Bonferroni.

Foi previamente fixado o nível de significância $\alpha = 0.05$ para rejeição da hipótese nula. Os testes de hipótese foram realizados sob o suporte computacional do *software* R versão 2.15.2 R Core Team (2012).

5.11 AVALIAÇÃO DO RISCO X BENEFÍCIO DA PESQUISA:

Conforme o Artigo III dos Princípios Éticos de Experimentação Animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) que diz:

“Procedimentos que envolvam animais, devem prever e se desenvolver considerando sua relevância para a saúde humana e animal, a aquisição de conhecimentos ou bem estar da sociedade”.

Podemos delinear alguns aspectos específicos em relação aos riscos e benefícios do experimento em questão, levando em conta suas contrapartidas para os pesquisadores, para os animais envolvidos na pesquisa e para a ciência como um todo.

Os animais configuram elemento de fundamental importância no experimento, e por isso teve-se consciência que o animal é dotado de sensibilidade, de memória e que sofre sem poder escapar à dor.

Os possíveis riscos associados aos animais envolvidos no experimento foram os seguintes:

- Dor ou angústia intensa ou crônica durante a exposição do ultrassom nas epífises de crescimento da tíbia;
- Os animais poderiam morrer em consequência do sofrimento.
- Edemas ou queimaduras no membro tratado.

O pesquisador também possuiu risco associado aos procedimentos da pesquisa, entre eles:

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

Os benefícios para a ciência foram consequentes aos resultados gerados pela pesquisa, sendo eles:

- Padronização de normas de dissecação animal em vigor, respaldando o trabalho e o pesquisador;
- Respostas para o problema da pesquisa;
- Base científica para futuros estudos em humanos;

Para o pesquisador os benefícios da pesquisa foram de natureza técnica:

- Qualificação técnica nos procedimentos experimentais com o uso de equipamentos elétricos e tecido ósseo;
- Estimulo à produção científica;
- Aprimoramento e atualização técnica.

É preciso tomar providências para que haja o controle dos riscos inerentes à pesquisa, ou mesmo prevenção destes. Para tanto, os animais foram tratados com equipamento adequado. Além disso, os animais vieram provenientes de uma instituição idônea, a fim de assegurar sua integridade de saúde, proporcionando maior segurança ao pesquisador, pois se trata de um biotério com normas rígidas de padrão internacional no trato com os animais de pesquisa.

As medidas adotadas durante a realização dos procedimentos concorreram para a segurança dos procedimentos e garantias do sucesso da pesquisa.

6 RESULTADOS

6.1 Análise morfométrica

Todas as análises foram realizadas utilizando o *software* estatístico R versão 2.15.2 R Core Team (2012). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, através do site URL <http://www.R-project.org>.

6.1.1. Área do osso

A Figura 5 apresenta o gráfico de caixas para a área do osso segundo os grupos (C, D1 e D2) e segundo os blocos de medidas (medida 1, medida 2 e medida 3). A partir da Figura 5 é possível observar que as medidas feitas para o grupo D2 apresentaram maior variação quando comparadas às medidas realizadas nos demais grupos. Os grupos D1 e D2 apresentam medianas menores do que as medianas observadas para o grupo C.

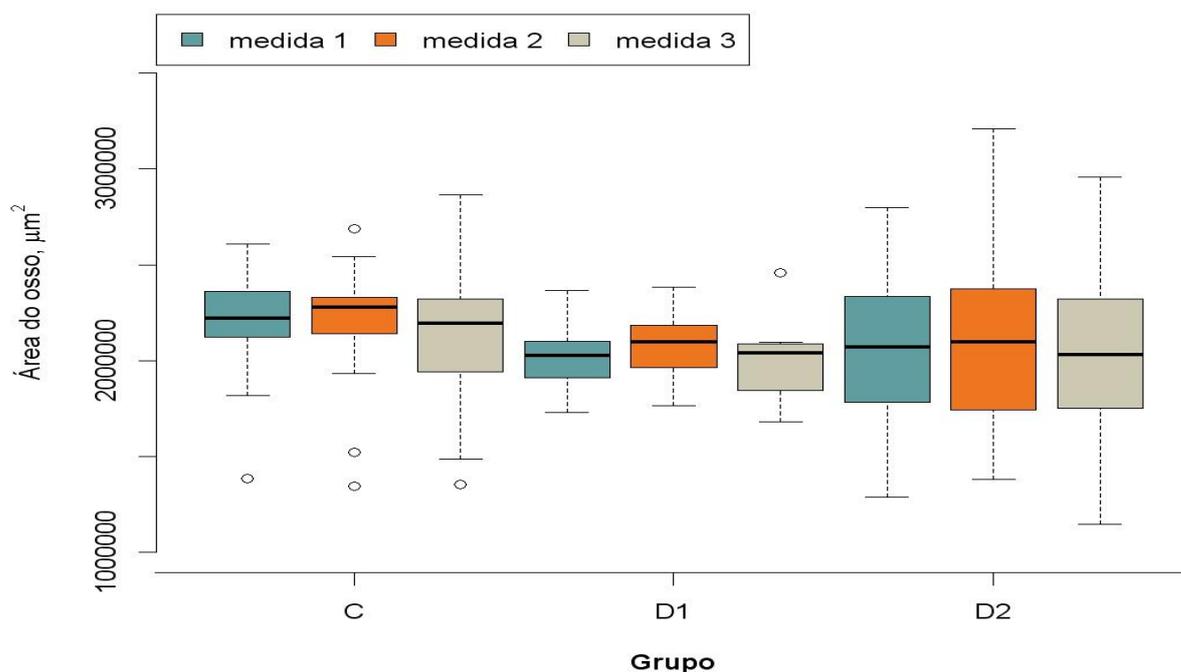


Figura 5 – Gráfico de caixas para área do osso segundo o grupo e a medida.

Em complemento a Figura 5 é apresentada a Tabela 1 com os valores de média, mediana e desvio padrão (DP) para cada combinação de grupo e medida.

Tabela 1 – Valores de mediana, média e desvio padrão (DP) para área do osso segundo o grupo e os blocos de medida.

Medida	Grupo C			Grupo D1			Grupo D2		
	Mediana	Média	DP	Mediana	Média	DP	Mediana	Média	DP
1	2220335	2193834	305681	2026463	2020551	189085	2070495	2057984	469601
2	2277382	2188487	359411	2095888	2078595	193968	2095467	2126176	559048
3	2193265	2136261	388497	2037028	2008808	241937	2030079	2039119	541304

Para testar se há diferença significativa entre os grupos com relação à área do osso foi aplicado o teste de Friedman para blocos com replicações (medidas repetidas). Este teste é equivalente ao teste de Kruskal-Wallis quando não há medidas repetidas. O valor p apresentado pelo teste foi igual a 0,036, dando evidências de que há diferença significativa, ao nível de 5%, entre os grupos.

Para identificar entre quais grupos houve diferença significativa, o teste de Friedman foi aplicado comparando os grupos 2 a 2 e utilizado a correção de Bonferroni para múltiplas comparações. Os valores p dos testes são apresentados na Tabela 2. Observou-se diferença significativa, ao nível de 5%, apenas entre o grupo C e grupo D1 (valor p = 0,017).

Tabela 2 – Resultados do teste de Friedman para blocos com replicações comparando os grupos 2 a 2 segundo a área do osso. Valores p corrigidos pelo método de Bonferroni para comparações múltiplas.

Análise feita retirando da amostra os pontos discrepantes.

Comparação	Valor p
Grupo C vs Grupo D1	0,017
Grupo C vs Grupo D2	0,615
Grupo D1 vs Grupo D2	1,000

A Figura 6 apresenta o gráfico de dispersão entre as diferentes medidas da área do osso (medida 1, medida 2 e medida 3) duas a duas. Observou-se forte correlação entre as medidas (correlação de Spearman > 0.78).

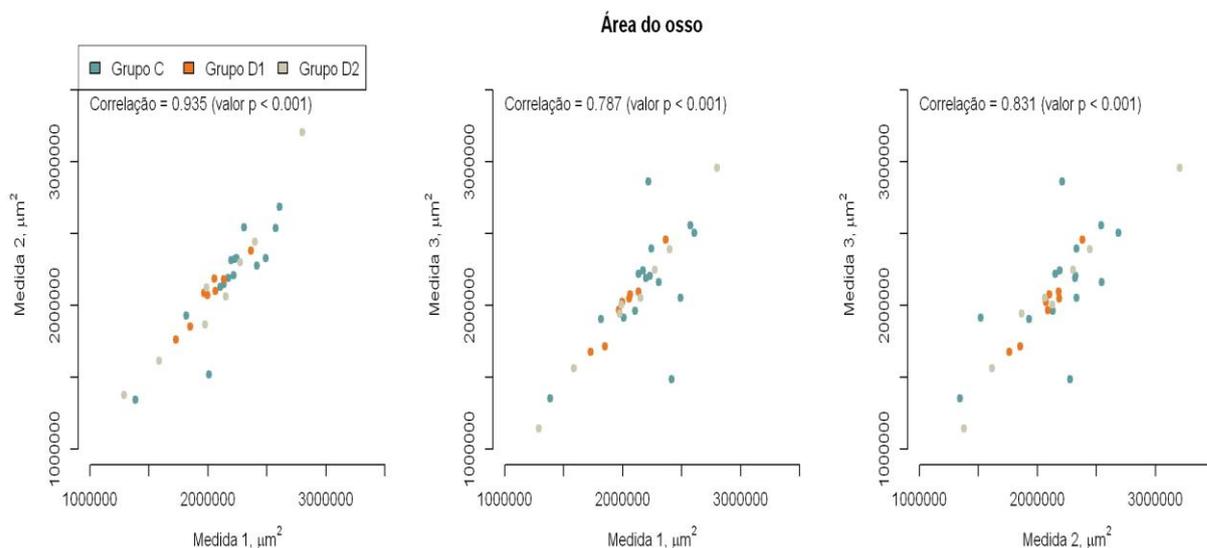


Figura 6 – Gráfico de caixas dispersão entre as diferentes medidas da área do osso 2 a 2. Correlação = coeficiente de correlação de Spearman.

6.1.2. Área do disco

A Figura 7 apresenta o gráfico de caixas para a área do disco segundo os grupos (C, D1 e D2) e segundo os blocos de medidas (medida 1, medida 2 e medida 3). Observa-se que os grupos D1 e D2 apresentaram valores maiores de mediana. Além disso, o grupo D1 apresenta menor variação.

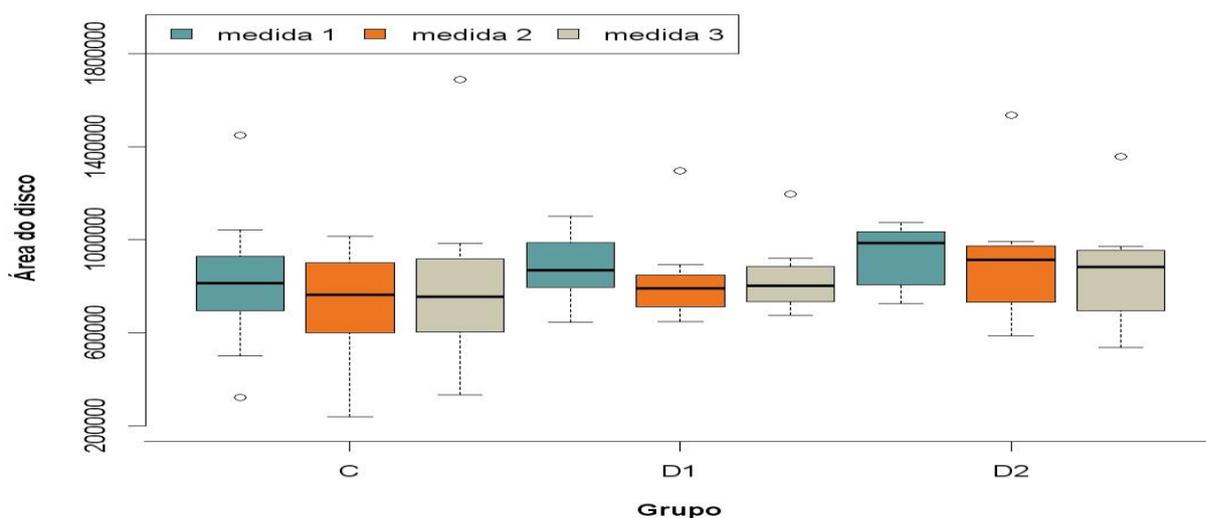


Figura 7 – Gráfico de caixas para área do disco segundo o grupo e a medida.

Em complemento, a Tabela 3 mostra os valores de média, mediana e desvio padrão para área do disco.

Tabela 3 – Valores de mediana, média e desvio padrão (DP) para área do disco segundo o grupo e os blocos de medida.

Medida	Grupo C			Grupo D1			Grupo D2		
	Mediana	Média	DP	Mediana	Média	DP	Mediana	Média	DP
1	812173	822244	250379	866536	880945	142930	984413	931587	133748
2	761080	723046	225547	789637	830961	204178	912502	919468	284836
3	752489	779003	306030	801553	839413	163866	880567	869676	246885

Para testar se há diferença significativa entre os grupos com relação à área do disco foi aplicado o teste de Friedman para blocos com replicações (medidas repetidas). O valor p apresentado pelo teste foi igual a 0,047 dando evidências de que há diferença estatisticamente significativa, ao nível de 5%, entre os grupos. Para identificar entre quais grupos houve diferença significativa, o teste de Friedman foi aplicado comparando os grupos 2 a 2 e utilizado a correção de Bonferroni para múltiplas comparações. Os valores p dos testes são apresentados na Tabela 4. Observou-se diferença significativa, ao nível de 5%, apenas entre o grupo C e grupo D2 (valor p = 0,049).

Tabela 4 – Resultados do teste de Friedman para blocos com replicações comparando os grupos 2 a 2 segundo a área do disco. Valores p corrigidos pelo método de Bonferroni para comparações múltiplas.

Comparação	Valor p
Grupo C vs Grupo D1	0,688
Grupo C vs Grupo D2	0,049
Grupo D1 vs Grupo D2	0,825

A Figura 8 apresenta o gráfico de dispersão entre as diferentes medidas da área do disco (medida 1, medida 2 e medida 3) duas a duas. Observa-se forte correlação entre as medidas 1 e 2 e as medidas 2 e 3 (correlação de Spearman > 0.7) e uma correlação moderada entre as medidas 1 e 3 (correlação de Spearman ≈ 0.4).

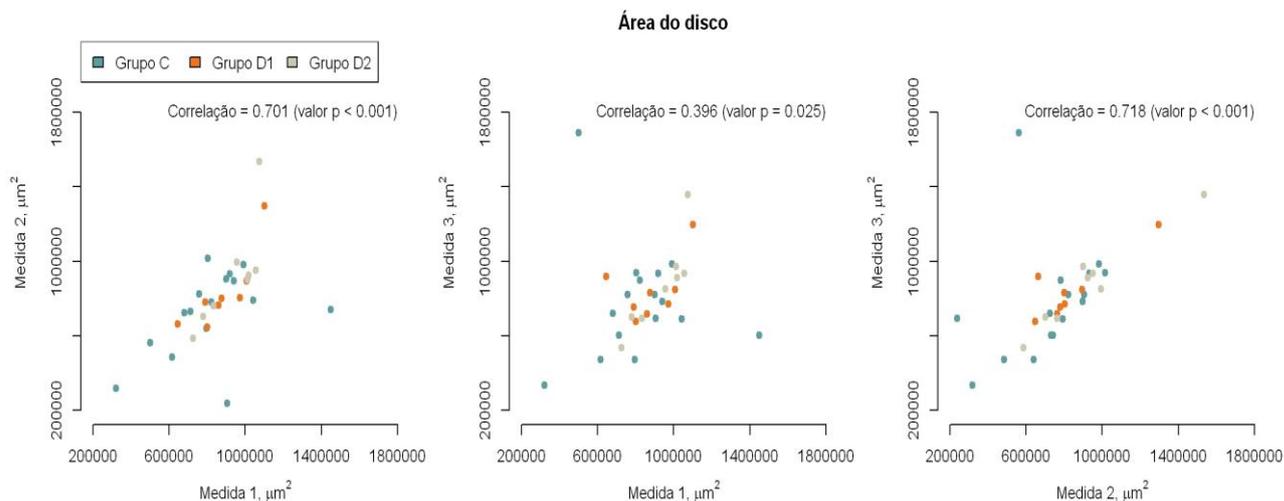


Figura 8 – Gráfico de caixas dispersão entre as diferentes medidas da área do disco 2 a 2. Correlação = coeficiente de correlação de Spearman.

6.1.3 Razão entre a área do disco e a área do osso

A Figura 9 apresenta o gráfico de caixas para razão entre a área do disco e área do osso segundo os grupos (C, D1 e D2) e segundo os blocos de medidas (medida 1, medida 2 e medida 3). Nota-se a presença de alguns pontos discrepantes nas medidas feitas no grupo D2. O animal 2 do grupo D2 apresentou nas 3 medidas razão entre a área do disco e área do osso superior a 60%.

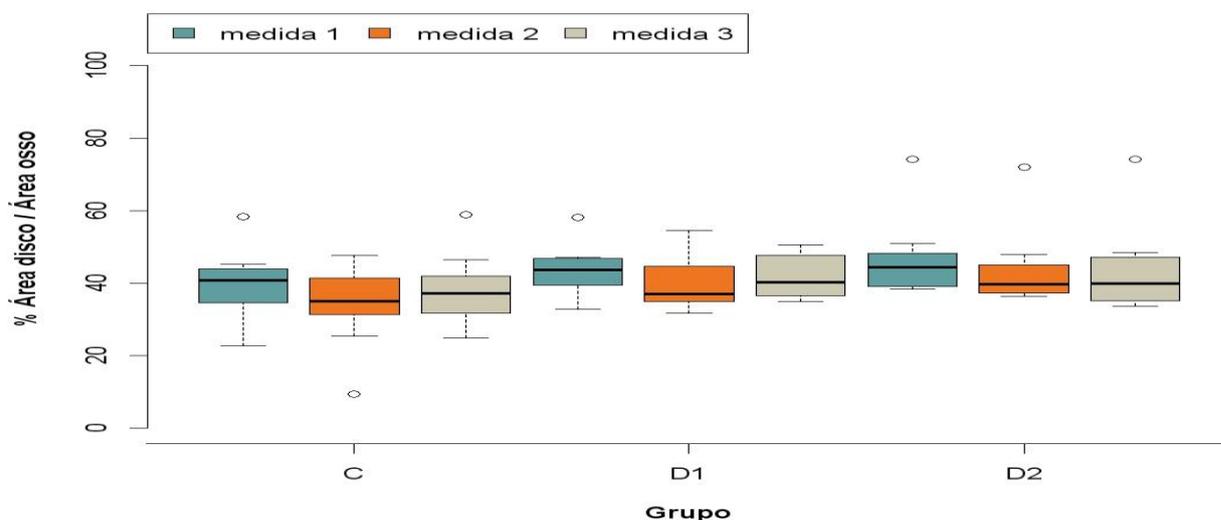


Figura 9 – Gráfico de caixas para a razão entre a área do disco e a área do osso segundo o grupo e a medida.

Em complemento, a Tabela 5 mostra os valores de média, mediana e desvio padrão entre a área do disco e a área do osso.

Tabela 5 – Valores de mediana, média e desvio padrão (DP) para a razão entre a área do disco e área do osso segundo o grupo e os blocos de medida.

Medida	Grupo C			Grupo D1			Grupo D2		
	Mediana	Média	DP	Mediana	Média	DP	Mediana	Média	DP
1	40.7	39.2	8.1	43.5	43.8	7.5	44.3	47.0	11.8
2	35.0	34.9	8.9	37.0	39.9	8.2	39.5	44.0	11.9
3	37.0	37.6	8.4	40.2	41.8	6.1	39.8	44.0	13.3

Para testar se há diferença significativa entre os grupos com relação a razão entre a área do disco e a área do osso foi aplicado o teste de Friedman para blocos com replicações (medidas repetidas). O valor p apresentado pelo teste foi igual a 0,007 dando evidências de que há diferença estatisticamente significativa, ao nível de 5%, entre os grupos. Para identificar entre quais grupos houve diferença significativa, o teste de Friedman foi aplicado comparando os grupos 2 a 2 e utilizado a correção de Bonferroni para múltiplas comparações. Os valores p dos testes são apresentados na Tabela 6. Observou-se diferença significativa, ao nível de 5%, apenas entre o grupo C e grupo D2 (valor p = 0,016). Resultado análogo foi obtido quando repetido a análise, mas removendo da amostra os pontos discrepantes observados na Figura 9.

Tabela 6 – Resultados do teste de Friedman para blocos com replicações comparando os grupos 2 a 2 segundo a razão entre a área do disco e a área do osso. Valores p corrigidos pelo método de Bonferroni para comparações múltiplas.

Comparação	Valor p
Grupo C vs Grupo D1	0.085
Grupo C vs Grupo D2	0.016
Grupo D1 vs Grupo D2	1.000

A Figura 10 apresenta o gráfico de dispersão entre as diferentes medidas da razão entre a área do disco e a área do osso (medida 1, medida 2 e medida 3) duas a duas. Observou-se correlação moderada entre as medidas 1 e 2 e as medidas 2 e 3 (correlação de Spearman ≈ 0.46) e uma fraca correlação entre as medidas 1 e 3 (correlação de Spearman ≈ 0.17).

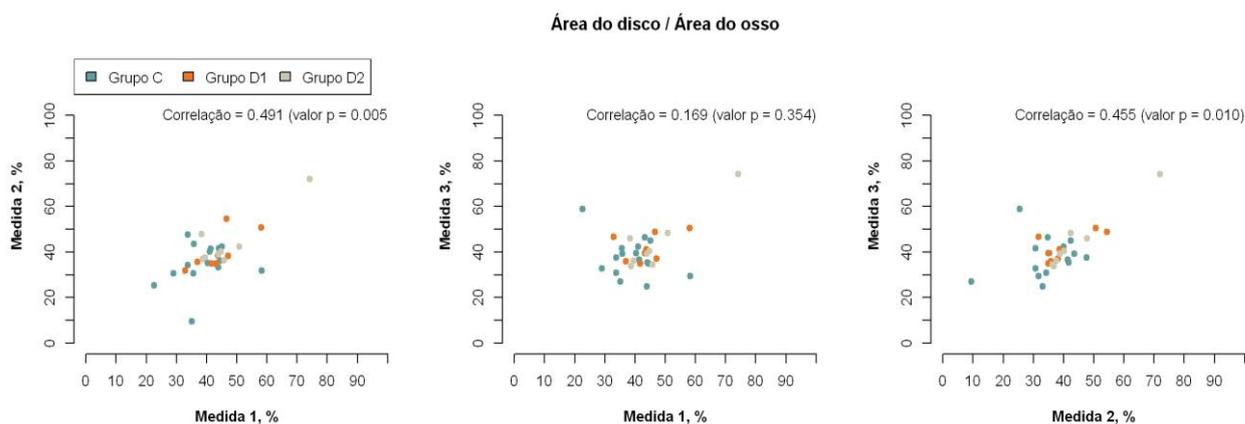


Figura 10 – Gráfico de caixas de dispersão entre as diferentes medidas da razão entre a área do disco e área do osso 2 a 2. Correlação = coeficiente de correlação de Spearman.

6.1.4. Zona hipertrófica

A Figura 11 apresenta os gráficos de caixa e a Tabela 7 os valores de mediana, média e desvio padrão para os valores da zona hipertrófica mensuradas por grupo e por bloco de medidas. Nota-se uma menor variação para o grupo D1 comparados aos grupos C e D2. Além disso, os valores de mediana do grupo D1 são superiores as medianas observadas nos outros grupos.

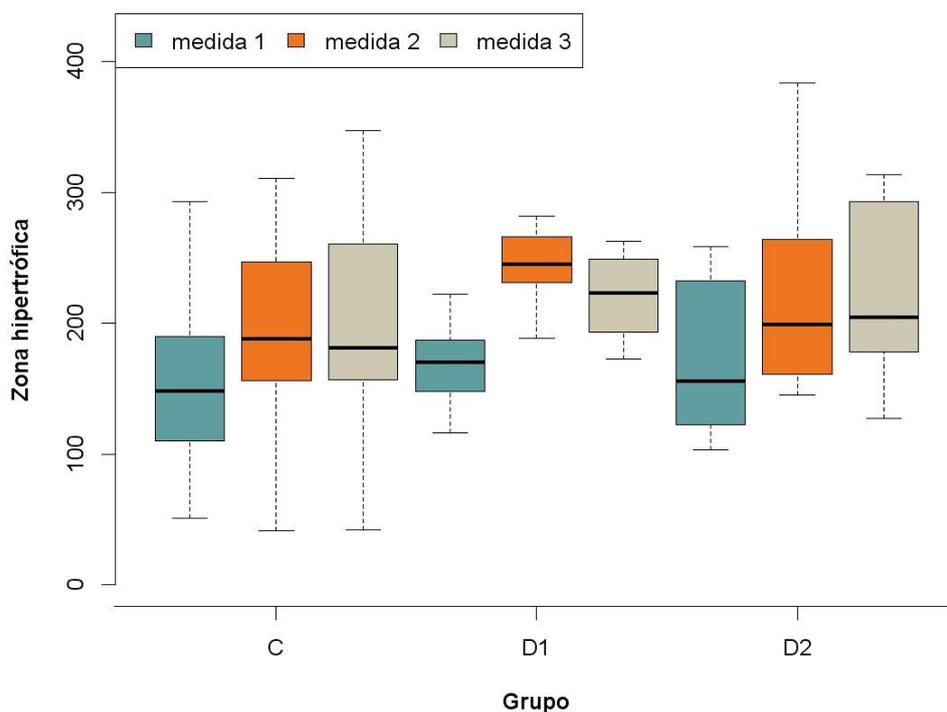


Figura 11 – Gráfico de caixas para a zona hipertrófica segundo o grupo e a medida.

Tabela 7– Valores de mediana, média e desvio padrão (DP) para a zona hipertrófica segundo o grupo e os blocos de medida.

Medida	Grupo C			Grupo D1			Grupo D2		
	Mediana	Média	DP	Mediana	Média	DP	Mediana	Média	DP
1	148.1	157.1	66.4	170.0	168.5	32.6	155.5	172.9	61.1
2	187.4	193.3	71.5	244.6	244.1	29.2	198.9	221.9	82.2
3	181.0	199.4	78.1	223.0	220.6	33.1	203.9	223.8	68.2

A Figura 12 mostra os gráficos de dispersão da zona hipertrófica para as medidas 2 a 2. Observa-se uma moderada correlação entre as medidas (coeficiente de Spearman entre $\approx 0,4$ e $\approx 0,6$).

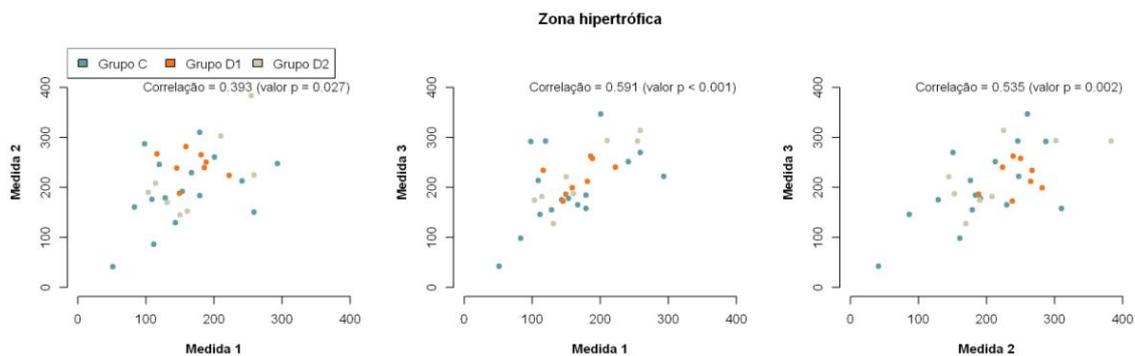


Figura 12 – Gráfico de caixas de dispersão entre as diferentes medidas zona hipertrófica 2 a 2. Correlação = coeficiente de correlação de Spearman.

6.1.5. Zona Proliferativa

A Figura 13 apresenta os gráficos de caixa e a Tabela 8 os valores de mediana, média e desvio padrão para os valores de zona proliferativa, mensuradas por grupo e por bloco de medidas. Observa-se que as segundas medidas (medida 2) realizadas para o grupo D1 apresentaram variação muito menor (ver os desvios padrão na Tabela 8) comparados as demais combinações de grupos e medidas.

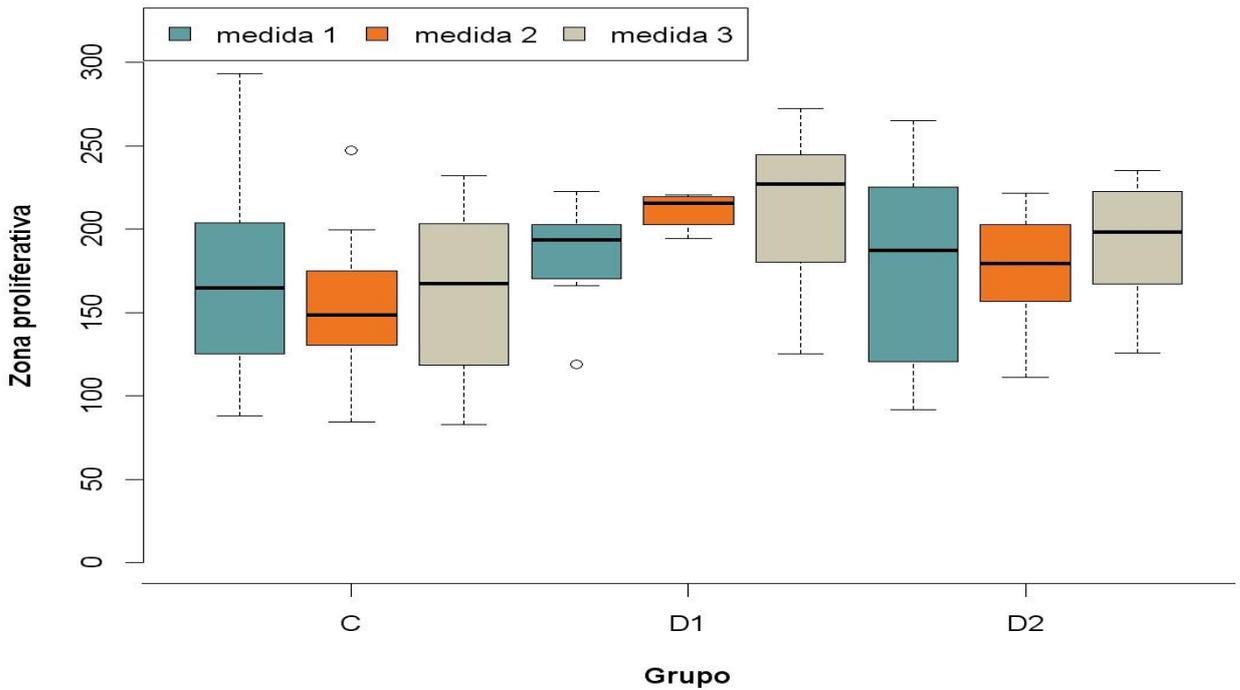


Figura 13 – Gráfico de caixas para a zona proliferativa segundo o grupo e a medida.

Tabela 8 – Valores de mediana, média e desvio padrão (DP) para a zona proliferativa segundo o grupo e os blocos de medida.

Medida	Grupo C			Grupo D1			Grupo D2		
	Mediana	Média	DP	Mediana	Média	DP	Mediana	Média	DP
1	164.6	168.0	55.5	193.4	184.2	31.8	186.8	177.7	62.7
2	148.0	155.6	37.1	215.3	211.1	9.9	179.4	176.3	35.7
3	166.9	161.9	51.2	227.0	212.7	51.2	197.8	191.9	38.5

A Figura 14 mostra os gráficos de dispersão da zona proliferativa para as medidas 2 a 3. Observa-se uma moderada correlação entre as medidas (coeficiente de Spearman entre $\approx 0,34$ e $\approx 0,56$).

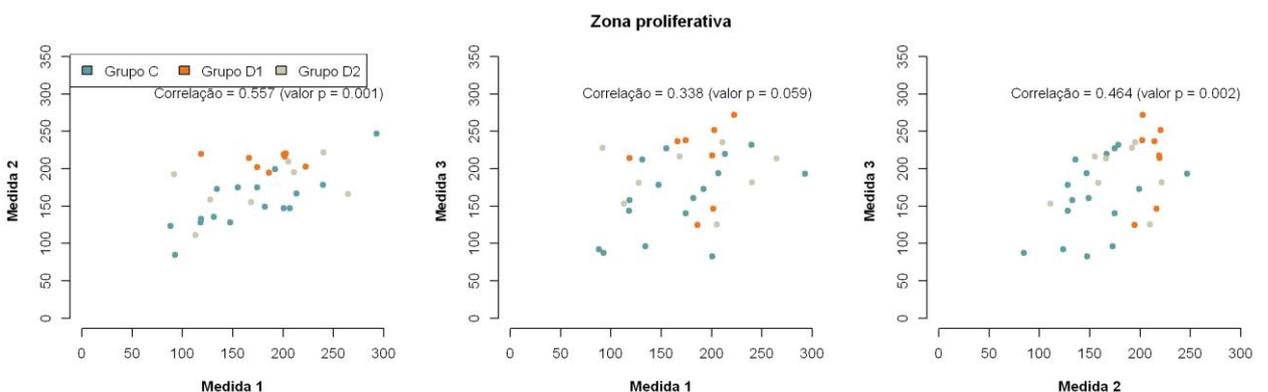


Figura 14 – Gráfico de caixas dispersão entre as diferentes medidas da zona proliferativa 2 a 3. Correlação = coeficiente de correlação de Spearman.

6.2 Análise Interferencial

Para a comparação dos 3 grupos simultaneamente foi aplicado o teste de Friedman para blocos com repetições (medidas repetidas). Os resultados dos testes para cada uma das 5 características estudadas são apresentados na Tabela 9. Apenas as mensurações das zonas hipertróficas não apresentaram diferença estatística entre os grupos (valor $p > 0.05$).

Tabela 9 – Resultado do teste de Friedman para blocos com repetições. Comparação dos 3 grupos (C, D1 e D2), simultaneamente.

Característica	valor p
Área do Osso	0,036 *
Área do Disco	0,048 *
Área do Disco / Área do Osso	0,007 *
Zona Hipertrófica	0,093
Zona Proliferativa	0,001 *

** Diferença significativa ao nível de 5%.*

Para as características que apresentaram diferença significativa entre os grupos no teste apresentados na Tabela 9 foi aplicado o teste de Friedman novamente, agora comparando os grupos 2 a 2. Os resultados dos testes comparando os grupos 2 a 2 são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 – Resultado do teste de Friedman para bloco com repetições (valor p). Comparação dos grupos 2 a 2. Valores p corrigidos pelo método de Bonferroni para múltiplas comparações.

Comparação	Área osso	Área disco	Razão	Zona Prolif.
Grupo C vs Grupo D1	0.017 *	0.688	0.085	< 0.001 *
Grupo C vs Grupo D2	0.615	0.049 *	0.016 *	0.214
Grupo D1 vs Grupo D2	1.000	0.825	1.000	0.180

** Diferença significativa ao nível de 5%.*

Razão = Área do disco / Área do osso.

Resumo dos resultados:

1. Área do osso: houve diferença estatística significativa, ao nível de 5%, apenas entre os grupos C e D1 (os valores médios do grupo C foram superiores aos valores médios do grupo D1 – ver Tabela 2);
2. Área do disco: houve diferença estatística significativa, ao nível de 5%, apenas entre os grupos C e D2 (os valores médios do grupo C foram inferiores aos valores médios do grupo D2 – ver Tabela 4);

3. Área do disco / Área do osso: houve diferença estatística significativa, ao nível de 5%, apenas entre os grupos C e D2 (os valores médios do grupo C foram inferiores aos valores médios do grupo D2 – ver Tabela 6);
4. Zona hipertrófica: não houve diferença significativa, ao nível de 5%, entre os grupos;
5. Zona proliferativa: houve diferença estatística significativa, ao nível de 5%, apenas entre os grupos C e D1 (os valores médios do grupo C foram inferiores aos valores médios do grupo D1 – ver Tabela 10).

6.3 Análise morfológica

Foi realizada a análise morfológica descritiva das laminas por uma patologista de forma cega, que realizou a leitura de todas as laminas do experimento, considerando as técnicas de coloração histológica de hematoxilina-eosina, *von kossa* e *alcian blue*.

Os cortes histológicos revelaram fragmentos de ossos em formação compatíveis com tibia e fêmur, as amostras do grupo controle revelaram disco epifisário cartilaginoso dividido em zonas, quais sejam, de repouso, proliferativa, hipertrófica, calcificada e zona de ossificação. A zona de repouso exibia condrócitos espalhados, formando uma camada faixa estreita e desordenada. A zona proliferativa apresentava grupos isógenos, isto é, condrócitos emparelhados e agrupados em colunas, dispostos paralelamente ao longo do eixo axial do osso em formação com o clássico aspecto de “moedas em pilha” dentro da matriz cartilaginosa. Condrócitos aumentados de volume, com condensação de elementos citoplasmáticos e início de perda de núcleo celular eram visualizados longitudinalmente formando a zona hipertrófica, associada a grande perda de matriz extracelular, logo abaixo podia-se identificar uma faixa estreita de células em apoptose com extenso depósito mineral, a zona calcificada. Na subsequente zona de ossificação observou-se material osteóide associado a trabéculas ósseas, com matriz cartilaginosa mineralizada basofílica (azulada) na parte central.

No grupo D1, a zona de repouso apresentava aspectos de maior organização celular, a zona de proliferação apresentava grupos isógenos de aspecto achatado com maior deposição de matriz extracelular, foi observada uma discreta basofilia dos núcleos na zona hipertrófica e não havendo porém aparente aumento na deposição de cálcio.

No grupo D2, a característica mais marcante foi a o aumento aparente da zona proliferativa em algumas laminas examinadas em relação a zona hipertrófica e a

desorganização desta última que se apresentava em boa parte dos cortes examinados como uma faixa irregular .

Não foi identificada nenhuma das características anatomopatológicas pré-definidas descritas no quadro abaixo :

Quadro 3 - Características anatomopatológicas procuradas no Grupo D1

Características procuradas	Presente	Ausente
Condrócitos hipertróficos fora da zona hipertrófica		X
Presença de necrose		X
Irregularidades na zona proliferativa		X
Lacunas na zona proliferativa		X
Focos de calcificação fora da zona calcificada		X

Quadro 4 - Características anatomopatológicas procuradas no Grupo D2

Características procuradas	Presente	Ausente
Condrócitos hipertróficos fora da zona hipertrófica		X
Presença de necrose		X
Irregularidades na zona proliferativa		X
Lacunas na zona proliferativa		X
Focos de calcificação fora da zona calcificada		X

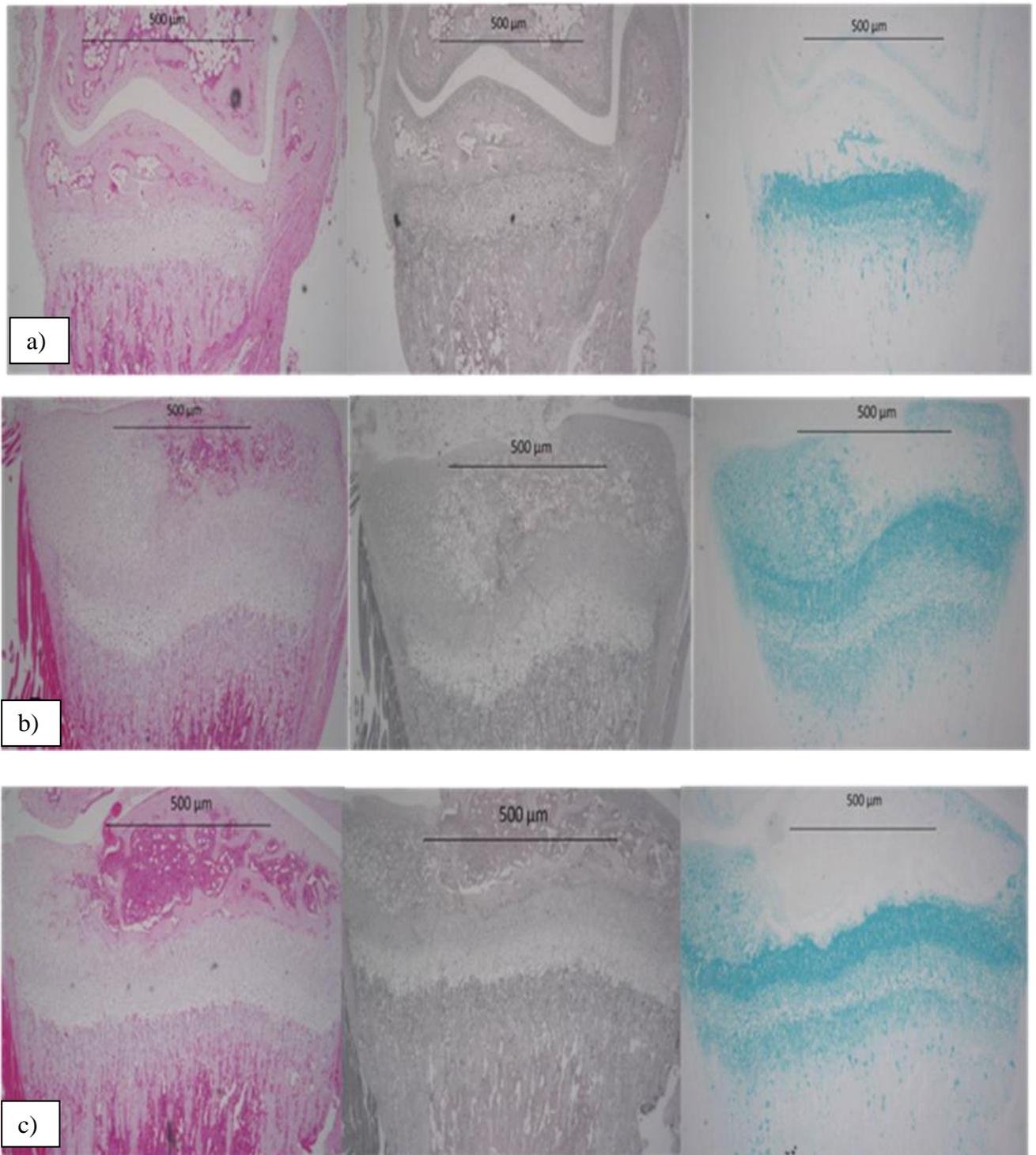
Grupos Controle e Tratados: Aumento 5x

Figura 15 - Fotos ilustrativas demonstrando a cabeça da tíbia e o disco epifisário nas colorações Hematoxilina-Eosina, *Von Kossa* e *Alcian Blue* dos grupos controle (a), dose 1 (b) e dose 2 (c), respectivamente. Aumento: 5x.

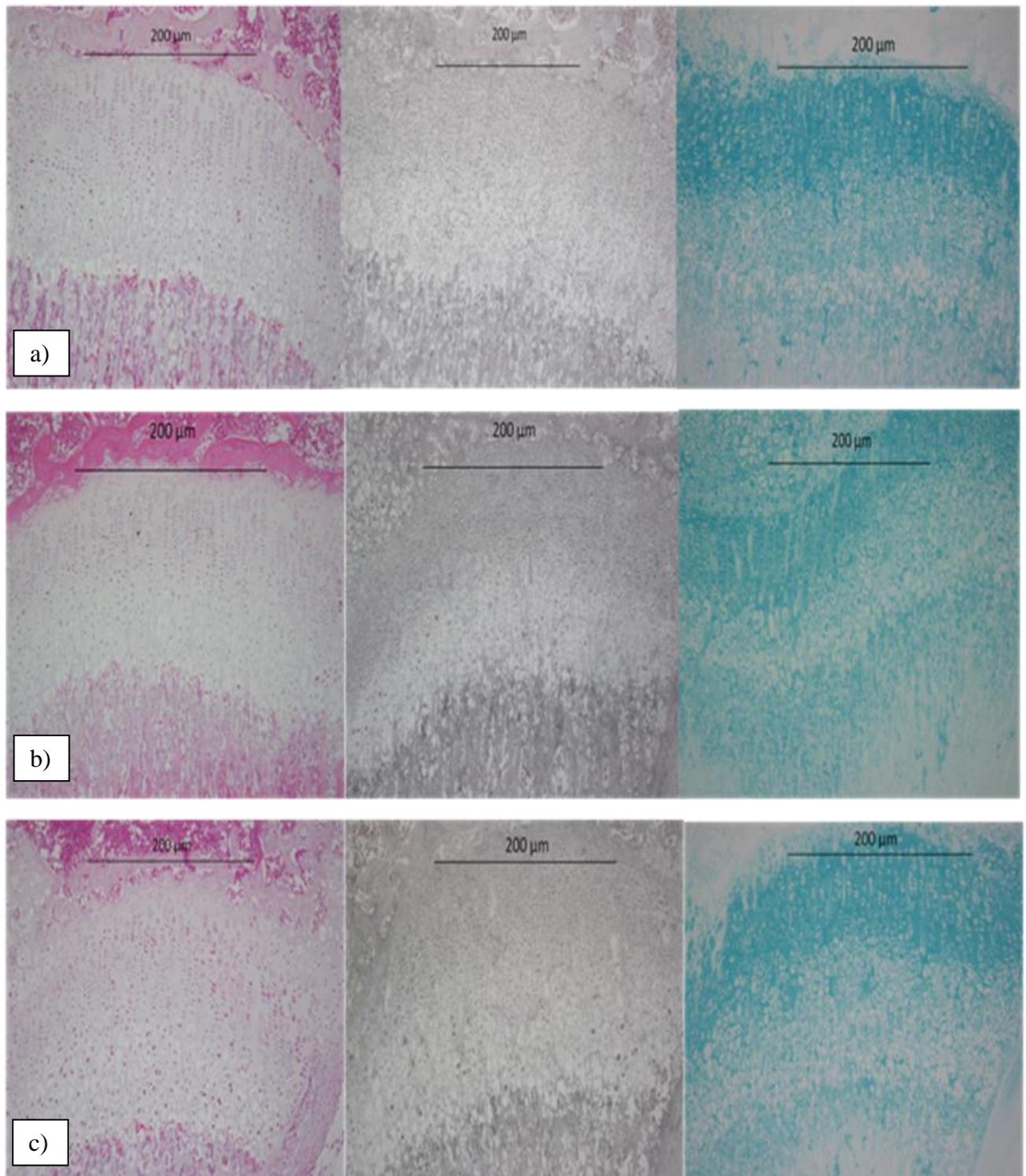
Grupo Controle e Tratados: Aumento 10x

Figura 16 - Fotos ilustrativas demonstrando as zonas do disco epifisário nas colorações Hemotoxilina-Eosina, *Von Kossa* e *Alcian Blue* dos grupos controle (a), dose 1 (b) e dose 2 (c), respectivamente. Aumento: 10x.

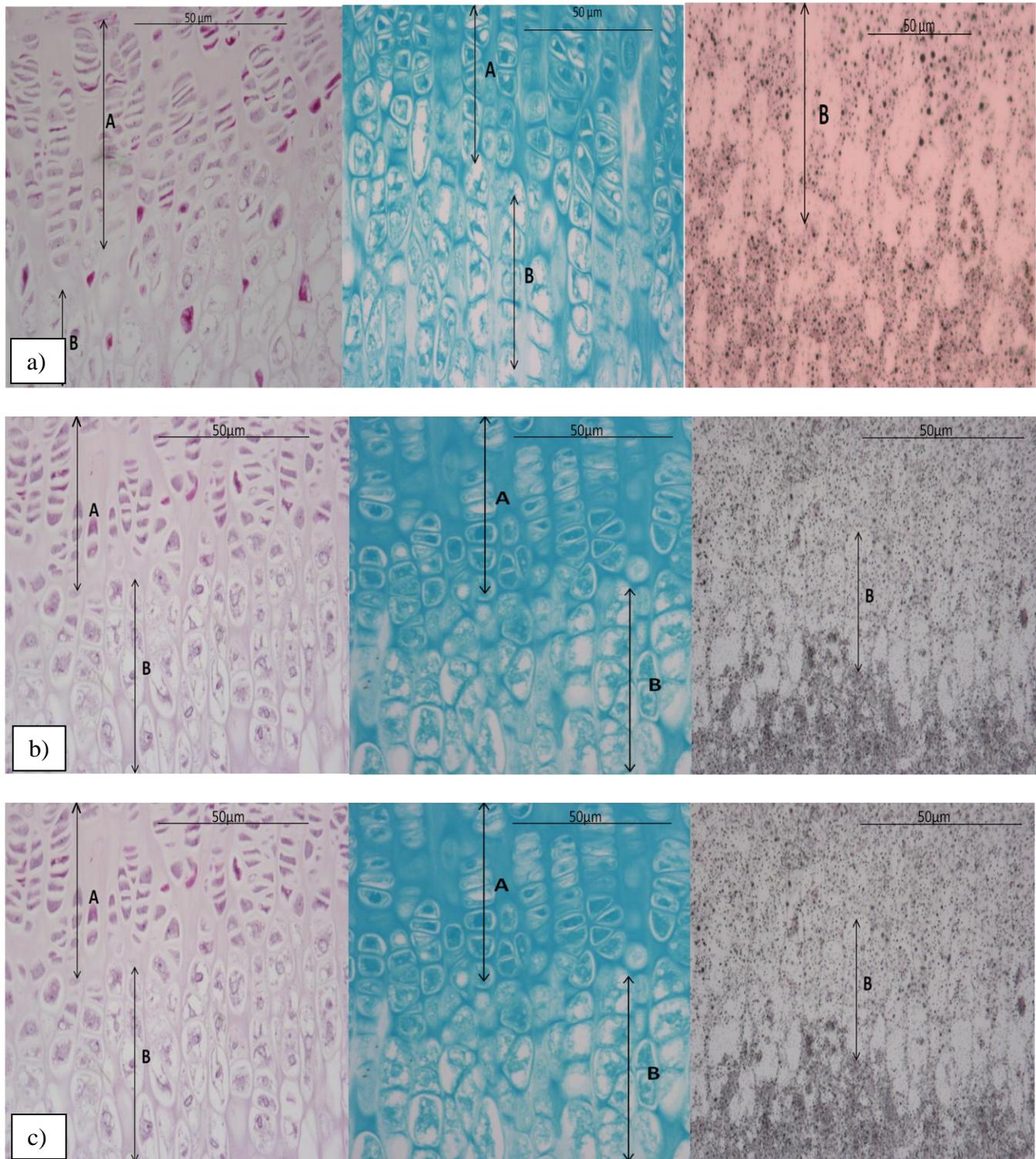
Grupos Controle e Tratados: aumento 40x

Figura 17 - Fotos ilustrativas demonstrando a zona proliferativa (A) e a zona hipertrópica (B) do disco epifisário dos grupos controle (a), dose 1 (b) e dose 2 (b), nas colorações Hemotoxilina-Eosina, Alcian Blue e Von Kossa, respectivamente. Aumento:40x.

Zonas do disco epifisário

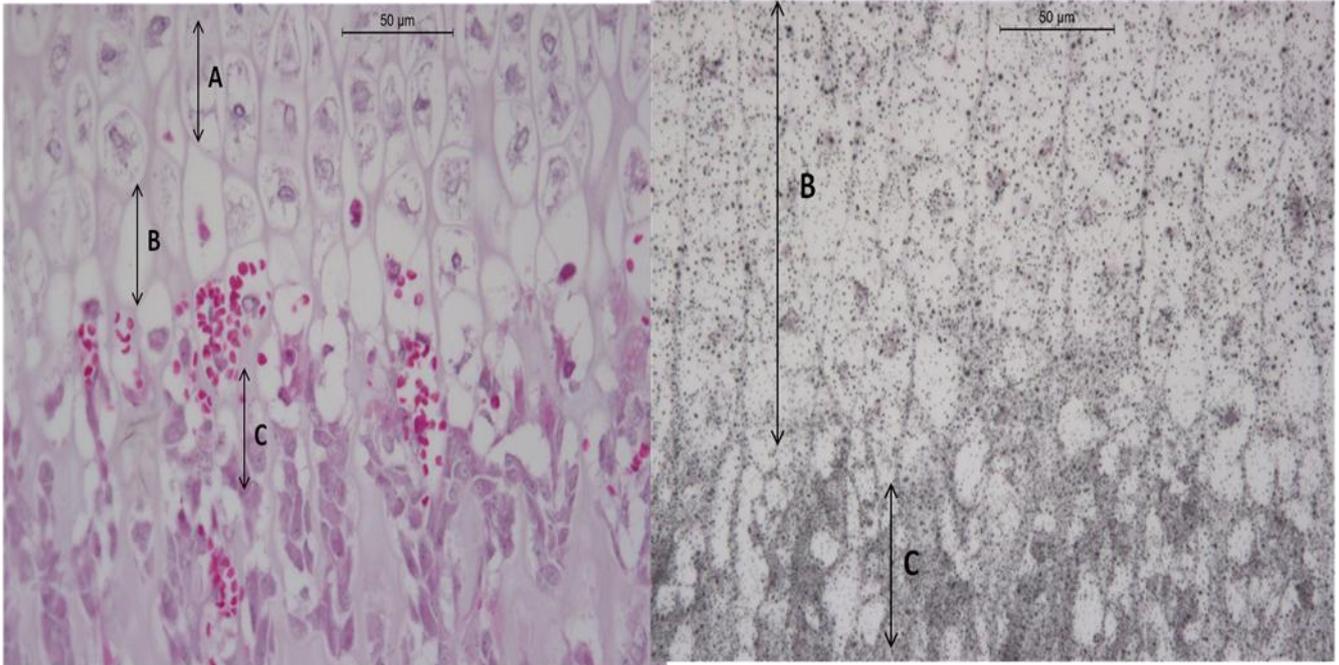


Figura 18 - Fotos ilustrativas demonstrando a zona hipertrópica (A), a zona calcificada (B) e a zona de ossificação (C) do disco epifisário em Hemotoxilina-eosina e em *Von Kossa*. Aumento:40x.

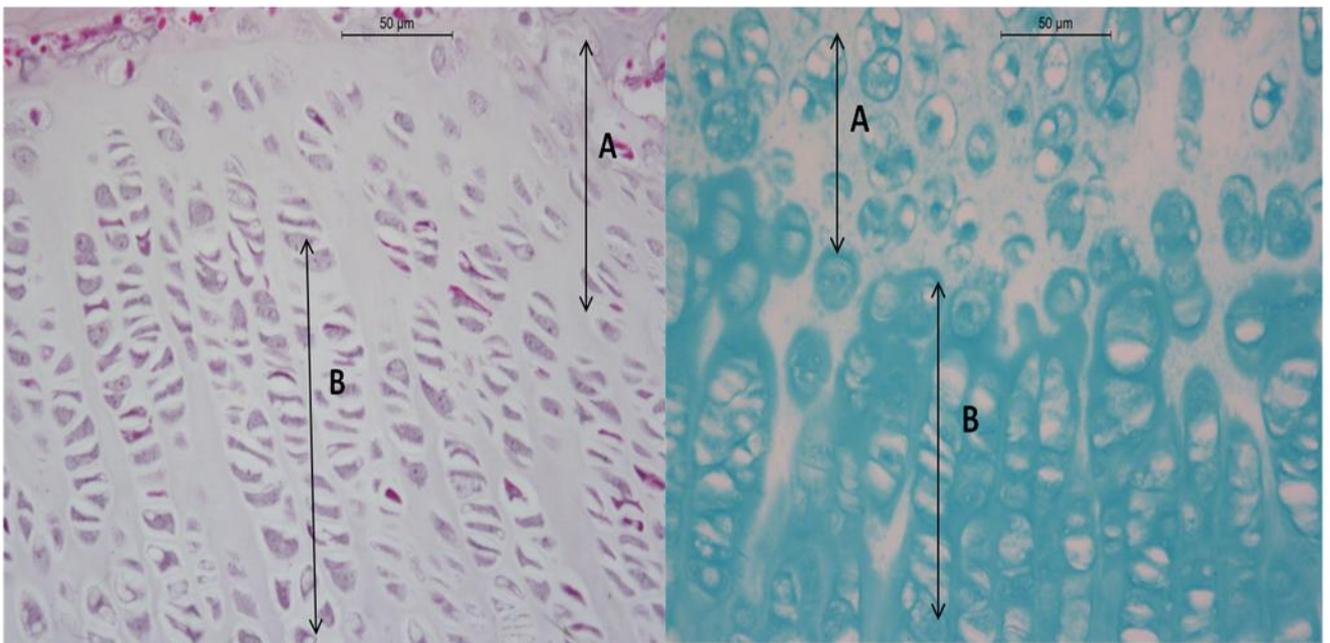


Figura 19 - Fotos ilustrativa demonstrando a zona de repouso (A) e a zona proliferativa (B) do disco epifisário em Hemotoxilina-eosina e em *Alcian Blue*. Aumento:40x.

7 DISCUSSÃO

Dúvidas clínicas sobre o possível efeito danoso que o ultrassom contínuo pode causar à placa de crescimento ósseo e estudos controversos encontrados na literatura, tais como os relatados na pesquisa de Fréz e colaboradores (2006) que concluíram que o ultrassom contínuo de 1 w/cm^2 produz alterações histológicas significativas na espessura da cartilagem no lado tratado, sugerindo uma aceleração no metabolismo da placa, estudo este que contrapõe com os resultados encontrados na pesquisa de Barreto e col. (2011) que também utilizou várias intensidades de ultrassom contínuo na placa de crescimento ósseo entre as quais a intensidade 1 w/cm^2 e ao final, concluíram que o ultrassom não produziu nenhum efeito na cartilagem de crescimento. Somados a importante função que a placa de crescimento ósseo exerce no crescimento global e no alinhamento dos ossos longos foram os principais motivos para a realização deste trabalho.

Nesta pesquisa somente o modo contínuo que clinicamente pode trazer grandes efeitos terapêuticos, incluindo o alívio da dor, redução da rigidez articular e aumento do aporte sanguíneo, foi avaliado em função de sua contra-indicação clínica absoluta feita por diversos autores (KITCHEN, 2003; KAHN, 2001; AGNE, 2005), que procuram evitar um dos efeitos indesejáveis mais temidos pelo uso do ultrassom contínuo que são as manifestações provocadas pela cavitação transitória caracterizada pela formação de bolhas que entram em colapso violento entre si liberando energia que pode romper até ligações moleculares, produzindo radicais livres, que causam alterações químicas e lesam o tecido adjacente. Fato este observado com menos frequência em pesquisas realizadas com ultrassom pulsátil em epífises de crescimento ósseo, que sugerem efeitos positivos (FRÉZ et al, 2006) ou ainda nenhum efeito do ultrassom sobre a placa de crescimento e nem sobre a densidade mineral óssea (SPADARO; ALBANESE, 2011). Histologicamente, os efeitos da cavitação não foram observados nos grupos tratados (D1 e D2) desta pesquisa.

A área do osso, delimitada nesta pesquisa a partir do limite inferior do disco epifisário até o limite superior da epífise da tíbia, foi menor no grupo D1 com menor parâmetro de intensidade ($0,1 \text{ w/cm}^2$) quando comparada ao controle, o que sugere que as ondas ultrassônicas possivelmente estariam influenciando a atividade do disco epifisário e conseqüentemente no tamanho do osso, fato este não visualizado na comparação realizada entre o tamanho do disco no grupo D1 comparado ao controle, este resultado pode ser atribuído ao efeito direto do ultrassom no tecido ósseo, uma vez que o campo acústico

produzido pelo ultrassom altera as propriedades bioelétricas do osso remodelando o seu crescimento.

O disco epifisário apresenta-se maior, com significância estatística, do que o controle, bem como a proporção disco/área do osso no grupo do parâmetro máximo ($0,5\text{w/cm}^2$) evidenciando-se assim o efeito das ondas ultrassônicas sob a morfologia do disco epifisário aumentando seu comprimento. Estes resultados concordam com as observações feitas por Barreto e col. (2011) que sugeriram que os grupos tratados com intensidades de 0,5 e 1,0 W/cm^2 , poderiam ter uma tendência de estímulo ao crescimento do osso.

Santos e col. (2005) ao avaliarem a influencia do ultrassom, modo contínuo e pulsado sobre as epífises de tíbias de coelhos em crescimento, nas potencias de 1w/cm^2 , 2w/cm^2 e 3w/cm^2 , concluíram que as alterações encontradas nos grupos tratados com ultrassom contínuo exibiram uma relação dose-dependente, isso é, quanto maior a dose, maiores as alterações encontradas. Estes resultados coincidem com a avaliação clínica observada nesta pesquisa em que, na medida, que aumentamos a dose do ultrassom observamos edemas, vermelhidão, claudicação e até queimadura no lado tratado (apêndice A), porém esta relação de dependência de dose não foi o alvo deste estudo. Histologicamente, as alterações encontradas no grupo D2 com maior intensidade, sugerem que o ultrassom ao aumentar a espessura do disco epifisário, poderia estar retardando o fechamento precoce da placa.

Os resultados descritos acima levam a crer que doses terapêuticas menores produzem melhores resultados, ideia esta reforçada pela pesquisa de Perry e col. (2008) que demonstraram que os efeitos da estimulação de baixa intensidade do ultrassom pulsátil foram associados ao aumento significativo de formação óssea *in vivo*, mostrando claramente que a formação óssea pode ser induzida por estimulação mecânica de baixa intensidade.

Considerando-se separadamente as zonas constitutivas do disco epifisário verifica-se a interferência patente do ultrassom na zona proliferativa, que é caracterizada pela proliferação, divisão e multiplicação de novos condrócitos que se agrupam nos grupos isógenos. Esta zona apresentou-se maior no grupo D1, o de menor parâmetro ($0,1\text{w/cm}^2$) do que o controle, provavelmente porque os condrócitos estão com ciclo celular mais ativo e o aporte energético oferecido pelo ultrassom leva ao aumento de ATP acelerando o metabolismo celular, o que também ocorre na zona hipertrófica, porém como esta já entrou em processo de degeneração para posterior morte, tal efeito não é tão evidente em termos de aumento da área desta zona. No grupo D2, de maior parâmetro ($0,5\text{w/cm}^2$) não foi observado nenhuma alteração na espessura da camada proliferativa, possivelmente porque a interferência do ultrassom nesta zona pode estar relacionada uma aceleração do metabolismo celular provido pelo aporte

energético de baixa intensidade o que não ocorreria ao se aumentar à fluência. Ideia esta reforçada pela pesquisa de Angle e col. (2010) que ao expor células da medula óssea a intensidades baixas de ultrassom pulsátil nas fases aguda, intermediária e tardia da diferenciação osteogênica concluíram que intensidades baixas de ultrassom, incluindo intensidades abaixo do padrão clínico utilizado têm efeito positivo na diferenciação osteogênica.

Sabe-se que a taxa de crescimento ósseo pode ser resumida como o resultado de dois processos que ocorrem na placa de crescimento: proliferação e hipertrofia dos condrócitos. Ressaltando que a proliferação celular, a produção de matriz e a hipertrofia dos condrócitos são os três fatores que mais são associados às atividades das placas de crescimento ósseo. (FELISBINO; CARVALHO,1990 apud PACHECO, p.25). Portanto, o aumento da espessura da zona de proliferação, pode estar indicando aumento do metabolismo na placa com provável proliferação celular.

A zona hipertrófica que nesta pesquisa compreendeu por questões metodológicas a zona hipertrófica e calcificada representa a área em que os condrócitos estão hipertrofiados, cheios de glicogênio e lipídios, produzindo grande quantidade de colágeno tipo X, em um dado momento os condrócitos hipertróficos entram em morte celular programada, caracterizando o início da mineralização de sua própria matriz, por meio da liberação de vesículas de matriz contendo fosfatase alcalina e outras proteínas. O tamanho desta zona não diferiu entre os grupos controle, D1 e D2 mantendo-se as alterações de fato para a zona proliferativa, evidenciando-se maior susceptibilidade às ondas ultrassônicas dos condrócitos proliferativos do que células já hipertróficas.

Levando em consideração que a zona hipertrófica é a principal responsável pelo crescimento do disco epifisário e que a taxa de produção de matriz pelos condrócitos nas zonas hipertrófica e calcificada é que leva o osso a crescer em comprimento e que os condrócitos hipertróficos secretam fatores de crescimento específicos como fator de crescimento vascular endotelial - VEGF, sugerimos mais pesquisas precisam ser realizadas visando elucidar que de forma o ultrassom influencia biologicamente nestes fatores de crescimento ósseo.

8 CONCLUSÃO

Com a pesquisa concluímos que a área total da cabeça do osso foi maior no grupo controle do que nos grupos tratados, sendo um indicativo que o tecido ósseo é influenciado pelas ondas ultrassônicas. Do mesmo modo, o disco epifisário, em que foi observado que o grupo de maior parâmetro teve a área total do disco maior do que os demais.

Observamos que a zona hipertrófica não teve influencia das ondas ultrassônicas, porém a zona proliferativa foi sensível a esta terapia, principalmente na menor dose, sugerindo que as ondas ultrassônicas influenciam a proliferação de condrócitos em doses mais brandas.

No grupo D1, a única característica histológica marcante foi a aparente organização da zona de repouso em relação ao controle. No grupo D2, foi observado um aparente aumento da zona proliferativa em relação à hipertrófica, não havendo outra característica histológica importante a relatar. Não foram encontradas nenhuma alteração anatomopatológica nos grupos controle e tratados.

As diferenças estatisticamente encontradas estão próximas ao valor de significância estatística (5%) utilizado na pesquisa, podendo o fato ser atribuído ao valor quantitativo da amostra empregada. Portanto sugere o estudo a realização futura com valores maiores da amostra, a fim de alcançar níveis de significância estatística mais representativa como aponta os resultados em tela.

No estudo foi verificada a ação do ultrassom positiva na cartilagem, tecido em formação, não podendo precisar qual nível de intensidade da aplicação do ultrassom se tornou mais significativo estatisticamente.

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 14724. **Informação e documentação. Trabalhos Acadêmicos - Apresentação.** Rio de Janeiro: ABNT, 2002.

AGNE, J.E. **Eletrotermoterapia:** teoria e prática. Santa Maria: Orium,2005. p. 282-308.

AGNE, J.E. **Eletrotermoterapia** teoria e prática. Santa Maria (RS): Pallotti, 2004.

ANGLE, S.R.; SENA,K.; SUMNER,D.R.; VIRDI,A.S. Osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells by various intensities of low-intensity pulsed ultrasound. **Ultrasonics**, v.51, p. 281-288, 2010.

ARNOULD, T.W. **Princípios e práticas de fisioterapia.** 4 ed. Porto Alegre: ArteMed,1999.

BARRETO, A. A.; BARRETO, R. K. A.; PEREIRA, H. R.; HOSNNE, W. S. Efeitos do ultra-som terapêutico sobre o crescimento longitudinal do fêmur e da tíbia em ratos. **Acta Ortop Bras.**, v.19, n. 3, p. 132-6, 2011.

BARRETO, A. A. Efeitos do ultra-som terapêutico sobre o crescimento das epífises, distal do fêmur e proximal da tíbia em *rattus norvegicus*. 2009. 148 p. Tese (doutorado).Faculdade de Medicina. Universidade Estadual Julio de Mesquita Filho. Botucatu,São Paulo.

BASSET,C.A.L. Biophysical principles affecting bone structure. In: BOURNE,G.H (ed). **Biochemistry and physiology of bone.** New York: Academic press, 1971, p. 1-76.

BOLANDER,M.E. Regulation of fracture repair by grown factors. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med** 200, 1992, p. 165-170.

CARVALHO, A. F. U., ARAÚJO, A. J., FARIAS, D. F., ROCHA-BEZERRA, L. C. B., CAVALHEIRO, M. G. Desenvolvimento e performance reprodutiva de camundongos Swiss em ambiente enriquecido. **Brazilian Journal of Biology**, v.69, n.1, p. 153-160, 2009.

COHEN, M.; ABDALLA, E.J. **Lesões nos esportes:** Diagnóstico, prevenção e tratamento. Rio de Janeiro: Revinter, 2005.

CORMACK, D.H. **Fundamentos de Histologia.** 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

CHEUNG,W.H.; CHOW,S.K.; SUN, M.; QIN,L.; LEUNG, K. Low intensity pulsed ultrasound accelerated callus formation angiogenesis and callus remodeling in osteoporotic fracture healing. **Ultrasound in Med e Biol**, v. 37, n. 2, p .231-238, 2010.

CLAES, L.; WILLIE,B. The enhancement of bone regeneration by ultrasound. **Prog Biophys Mol Biol**, v.93, p. 384-98, 2007.

DECHIARA,T.M.; KIMBLE,R.B.; POUYMIROU,W.T.; ROJAS,J.; MASIAKOWSKI,P.; VALENZUELA, D.M.; YANCOPOULOS, G.R. Ror2 encoding a receptor-like tyrosine kinase, is required for cartilage and growth plate development. **Nat Genet**, v. 24, n.3, p. 271-4, 2000.

DOCKER, M.F. A review of instrumentation available for therapeutic ultrasound. **Physiotherapy**, v.73, n.4, p.154-155,1987.

DOBLARÉ, M.; GARCÍA, J.M.; GOMÉZ, M.J. Modelling bone tissue fracture and healing: a review. **Engineering Fracture Mechanics**, v. 71, p. 1809-1840, 2004.

DUARTE,L.R. The stimulación of boné growth by ultrasound. **Arch. Orthop. Traum. Surgery**, v. 101, p. 153-159, 1983.

DUNCAN, R.L; TURNER, C.H. Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain. **Calcif Tiss Int.**, v. 57, n. 5, p. 344-58, 1995.

FRÉZ,A.R.; ARIZA,D.; FERREIRA,J.R.L.; ALVES,E.P.B.; BREDA,G.R.; CENTENARO,L.A.; UEDA,T.K.; BERTOLINI, G.R.F. Efeito do ultra-som terapêutico contínuo em placas epifisárias de coelhos. **Rev Bras Med Esporte**. Niterói: vol.12, n.3, Maio/Junho, 2006. Acessado em 27/04/11.

GUIRRO,E.C.O.; GUIRRO,R.R.J. **Fisioterapia Dermato-funcional**: fundamentos, recursos e patologias. 3. ed. revisada e ampliada. Barueri: Manole, 2002.

GUSMÃO,C.V.B; BELANGERO, W.D. Como a célula óssea reconhece o estímulo mecânico? **Ver. Bras. de ortop. e traumat.**, Julho/Agosto, 2009.

HARLE, J.; MAYIA, F.; OLSEN, I.; SALIH, V. Effects of ultrasound on transforming growth factor - beta genes in bone cells. **Eur Cell Master Res.**; v. 57, p. 449-56, 2005.

HUGHES-FULFORD, M. Signal transduction and mechanical stress. **Sci STKE**, n. 249, 2004.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

KAHN, J. **Princípios e prática de eletroterapia**. 4. ed. São Paulo: Santos, 2001.

KITCHEN, S. **Eletroterapia prática baseada em evidências**. 11. ed. Barueri: Manole, 2003. p. 31-44/211-230.

KITCHEN, S.S.; PATRIDGE, C.J. A review of therapeutic ultrasound:II. The efficacy of ultrasound. **Physiotherapy**, v.76, p.595, 1990.

LOW,J. **Eletroterapia explicada: Princípios e prática**. 3. ed. Barueri: Manole, 2001. p. 187-228.

LOW, J.; REED, A.. **Eletroterapia explicada**. 3 ed. Barueri: Manole, 2001.

MALIZOS, K.N.; HANTES, M.E.; PROTOPAPPAS, V; PAPACHRISTOS, A. Low – intensity pulsed ultrasound for bone healing: on overview. *Injury*, v. 37, p. 56-62, 2006.

MITRAGOTRI, S; SUNDARAM, J; MELLEIN, BR. An experimental and theoretical analysis of ultrasound-induced permeabilization of cell membranes. **Biophysical Journal**. v.84, p. 3087-3101. May, 2003.

MORTIMER, A.J.; DYSON,M. The effect of therapeutic ultrasound on calcium uptake in fibroblasts. **Ultrasound and Medicine**, v.14, p. 499-506, 1988.

NARUSE,K.; MIYAUCHI, A.; ITOMAN, M.; MIKUNI – TAKAGAKI,Y.; Distinct anabolic response of osteoblast to low – intensity pulsed ultrasound. **J Bone Miner Res**, v. 18, p. 360 - 9, 2003.

NUI, T.; ROSEN, C.J.; The insulin – like growth factor – I gene and osteoporosis: a critical appraisal. **Gene**,; v. 361, p. 38-56, 2005.

OGDEN, J.A. Development and maturation of the neuromusculoskeletal system in low level winter's pediatric orthopedics. ed. Raymond T. Morrissy, **J.B. Lippincott Company**, Philadelphia, p. 1-26, 1990.

ROSIM, G. de C. **Análise da influência do ultra-som terapêutico na penetração transcutânea de diclofenaco sódico em humanos saudáveis**. Dissertação (Mestrado). São Carlos: Universidade de São Paulo. Escola de Engenharia de São Carlos: 2003.

PACHECO, I. **O efeito da carga compressiva repetitiva sobre a placa de crescimento: estudo experimental em ratos**. 2003. 116 p. Tese (doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

PERRY, M.J.; PARRY, L.K.; BURTON, V.J.; GHEDUZZI, S.; BERESFORD, J.N.; HUMPHREY, V.F.; SKERRY, T.M. Ultrasound mimics the effect of mechanical loading on bone formation *in vivo* on rat ulnae. **Medical Engineering e Physics**, v. 31, p. 42-47, 2008.

POUNDER, N.M.; HARRISON, A.J. Low intensity pulsed ultrasound for fracture healing: A review of the clinical evidence and the associated biological mechanism of action. **Ultrasounds**, v. 48, p. 330-338, 2008.

SANTOS, C. A.; FIALHO, H. S. A.; PINTO, J. A.; ALVES, M.T.S. **Influência do ultra-som terapêutico na epífise de crescimento ósseo de coelhos**. Artigo extraído da dissertação de mestrado. Unifesp: 2005.

SENA, K.; ANGLE, S.R.; KANAJI, A.; AHER, C.; KARWO, D.G.; SUMNER, D.R.; VIRDI, A.S. Low – intensity pulsed ultrasound (LIPUS) and cell-to-cell communication in bone marrow stromal cells. **Ultrasonics**, 2010.

SILVA, O.L. **Estudo do mecanismo de ação do ultra-som na estimulação do crescimento ósseo**. Dissertação (mestrado). Faculdade de engenharia de São Carlos-USP, 1977.

SOOTT, A.; KHAN, K.M.; DURONIO, V.; HART, D.A. Mechanotransduction in human bone in vitro cellular physiology that underpins bone changes with exercise. **Sports Med**, v.38, n.2, p. 139-160, 2008.

SPADARO, J. A.; ALBANESE, S.A. Application of low – intensity ultrasound to growing bone in rats. *Ultrasound in medicine and biology*, **Elsevier**, USA, v. 24, n. 4, p. 567-573, 1998.

STARKEY, C. **Recursos terapêuticos em fisioterapia**. 2.ed. São Paulo: Manole, 2001. p. 404.

SWARTHOUT, J.T.; D'ALONSO, R.C.; SELVAMURUGAN, N.; PARTRIGDE, N.C. Parathyroid hormone – depend signaling pathways regulating genes in bone cells. **Gene**, v. 282, p. 01-17, 2002.

TELSER, A.G.; YOUNG, J.K.; BALDWIN, K.M. **Histologia**. Série Elsevier de formação básica integrada. Elsevier: São Paulo, 2007; 5: 129-158.

WAN, M.; CAO, X. **BMP signaling in skeletal development**. Biochem Biophys Res Commun, 2005; 328: 651-7.

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

Apêndice

Apêndice A

Após a aprovação na qualificação, foi iniciado o 1º teste piloto com o grupo D1, ou seja, o de menor intensidade, no qual 10 camundongos, machos, com 21 dias de nascidos foram inicialmente pesados, identificados e se iniciou a administração de tetraciclina via oral conforme técnica adaptada por Jorgetti¹ (2007) que preconiza a administração de tetraciclina via oral na dose de 0,02 mg/g/dia, em dois períodos de três dias, separados por um intervalo de tempo de 10 dias, durante o qual a droga foi descontinuada. No primeiro momento, a droga foi administrada três dias antes da 1ª aplicação do ultrassom.

Os experimentos se iniciaram e as observações clínicas foram devidamente anotadas e descritas abaixo.

Tabela A.1: Descrição clínica observada no grupo 01 referente ao teste piloto.

Experimento	Numero de animais	Densidade de Potencia	Tempo	Alterações clínicas identificadas
1º dia	10	0,1 w/cm ² Modo contínuo	5 min.	Um animal morreu durante a administração da tetraciclina.
2º dia	09	0,1 w/cm ² Modo contínuo	5 min.	Sem alteração clínica visível.
3º dia	09	0,1 w/cm ² Modo contínuo	5 min.	Sem alteração clínica visível.
4º dia	09	0,1 w/cm ² Modo contínuo	5 min.	Foi observado estresse nos animais durante a manipulação, provavelmente pelo tempo de tratamento.
5º dia	09	0,1 w/cm ² Modo contínuo	5 min.	Observado estresse dos animais durante o experimento.
6º dia	09	0,1 w/cm ² Modo contínuo	5 min.	Observado estresse dos animais durante o experimento.
7º dia	09	0,1 w/cm ² Modo contínuo	5 min.	Observado estresse dos animais durante o experimento
8º dia	09	0,1 w/cm ² Modo contínuo	5 min.	Observado estresse dos animais durante o experimento.
9º dia	08	0,1 w/cm ² Modo contínuo	5 min.	Um animal foi encontrado morto
10º dia	08	0,1 w/cm ² Modo contínuo	5 min.	Observado estresse dos animais durante o experimento.

Após a término da 10^o sessão, o segundo momento da técnica de Jorgetti (2007) foi iniciado, no qual a droga foi administrada três dias posterior a última aplicação do ultrassom, em seguida foi realizada a eutanásia dos animais que foram enviados para a USP para análise histológica.

A descalcificação ocorreu conforme previsto, no entanto ao levar as laminas ao microscópio de fluorescência para se verificar a distancia entre as duas faixas fluorescentes, conforme preconizou Junqueira e Carneiro (1999). Observou-se que durante a descalcificação, a tetraciclina não ficou impregnada, não sendo possível verificar a taxa de crescimento aposicional, para a realização deste teste seria necessário que as laminas fossem obtidas pela técnica de desgaste do tecido ósseo, que se dá através do polimento com lixa. Sendo que o fragmento ósseo é colado com bálsamo do Canadá sobre uma superfície de madeira plana e é lixado com uma lixa de granulometria grossa primeiro e depois é lixado com um lixa mais fina (Timm, 2005)², o que é inviável devido o tamanho de cada amostra ser pequeno. Este teste foi alterado, no qual retiramos a aplicação da tetraciclina na pesquisa e somente mantivemos a morfometria óssea, porém incluímos a técnica histológica de *Van Kossa* e *Alcian Blue*. Este teste não foi levado em consideração, pela mudança de técnica histológica.

O 2^o teste piloto foi realizado com o grupo D2, ou seja, o de maior intensidade, no qual 10 camundongos, machos, com 21 dias de nascidos foram pesados e identificados, foi realizada a 1^o sessão do tratamento com os parâmetros de intensidade máxima do ultrassom, que é de 2 mw/cm² na face medial do membro direito por 5 minutos.

As observações clínicas encontradas neste 2^o teste foram descritas, abaixo:

Tabela A.2: Descrição clínica observada no grupo 02 referente ao teste piloto.

Experimento	Numero de animais	Densidade de Potencia	Tempo	Alterações clínicas identificadas
1 ^o dia	10	2 w/cm ² Modo contínuo	5 min.	Após a 1 ^o sessão, foi verificado que o primeiro animal tratado morreu e o segundo animal tratado apresentou edema e vermelhidão do membro tratado imediatamente após a 1 ^o aplicação de ultrassom, sendo que ambos os animais aparentavam sinais de sofrimento, provavelmente pela intensidade da dose aplicada, estes animais foram excluídos do trabalho. Os demais animais apresentaram-se agitados durante o tratamento. Os pesquisadores obtaram pela redução do tempo para 2 minutos, uma vez que foi observado desde o 1 ^o teste piloto, o estresse dos animais pela

				exposição de tempo ao tratamento.
2° dia	08	2 w/cm ² Modo contínuo	2 min.	Antes do início da 2° sessão foi observado que dois animais apresentavam queimadura no membro tratado, não sendo aplicados a 2° sessão, estes animais também foram excluídos da pesquisa. Assim, os pesquisadores obtaram por reduzir ainda mais o tempo aplicado para 1,5 minutos. Durante a aplicação da 2° sessão, observou-se que os três últimos animais tratados apresentavam-se agitados e com sinais de sofrimento, por isso a intensidade também foi alterada para 1,5 w/cm ² , já que o cabeçote do ultrassom é reduzido, bem como sua área efetiva de radiação – ERA, o que faz com que as ondas ultrassônicas fiquem concentradas na ERA e haja uma elevação de temperatura local, o que resulta na morte dos animais, bem como a deformação dos membros tratados, uma vez que as estruturas que os animais possuem não suportam tal elevação térmica.
3° dia	05	1,5 w/cm ² Modo contínuo	1,5 min.	Antes da 3° sessão, observou-se que mais um animal apresentava queimadura, sendo excluído da pesquisa. A intensidade foi alterada para 1,0 w/cm ² e o tempo de 1,5 minuto foi mantido. No entanto, durante a 3° sessão observou-se que os animais apresentavam sinais de sofrimento e por este motivo, a intensidade foi alterada mais uma vez para 0,5 w/cm ² . A partir deste sessão houve padronização dos parâmetros para a pesquisa.
4° dia	05	0,5 w/cm ² Modo contínuo	1,5 min.	Não foi observado nem sinal clínico importante. Os animais durante o experimento se encontram tranquilos durante a aplicação do experimento.
5° dia	05	0,5 w/cm ² Modo contínuo	1,5 min.	Não foi observado nem sinal clínico importante.
6° dia	05	0,5 w/cm ² Modo contínuo	1,5 min.	Não foi observado nem sinal clínico importante.
7° dia	05	0,5 w/cm ² Modo contínuo	1,5 min.	Não foi observado nem sinal clínico importante.
8° dia	05	0,5 w/cm ² Modo contínuo	1,5 min.	Não foi observado nem sinal clínico importante.
9° dia	05	0,5 w/cm ² Modo contínuo	1,5 min.	Não foi observado nem sinal clínico importante.
10° dia	05	0,5 w/cm ² Modo contínuo	1,5 min.	Não foi observado nem sinal clínico importante.

Como houve diversas alterações nos parâmetros de tempo e intensidade, o teste piloto deste grupo não foi levado em consideração.

¹ - JORGETTI, V. **Biópsia óssea e análise histomorfométrica.** Fleury medicina e saúde, 2007. <<http://www.fleury.com.br/Medicos/SaudeEmDia/ManualDoencas/pages/bi%C3%B3psia%C3%B3sseaean%C3%A1lisehistomorfom%C3%A9trica.aspx>> Acesso em 10/08/11.

² - TIMM, L.L. **Técnicas rotineiras de preparação e análise de laminas histológicas.** Centro Universitário La Salle. Caderno La Salle XI: Canoas, v.2, nº1, 231-239, 2005.

ANEXOS

Anexo 1

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

Certificamos que o Protocolo no. FR-454515/2011 – CEP sobre **“ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS PROVOCADAS PELAS ONDAS ULTRASSÔNICAS CONTÍNUAS DE 1MHz NO DISCO EPIFISÁRIO EM FÊMUR DE CAMUNDONGOS”**, sob a responsabilidade de **José Wagner Cavalcante Muniz**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Humana, adotados pelo Comitê Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP), em reunião realizada em 16/02/2012.

Data para apresentação do relatório no CEP-UNIFAP: 15/02/2013

CERTIFICATE

We certify that the protocol number FR-454515/2011 – CEP about **“ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS PROVOCADAS PELAS ONDAS ULTRASSÔNICAS CONTÍNUAS DE 1MHz NO DISCO EPIFISÁRIO EM FÊMUR DE CAMUNDONGOS”**, **José Wagner Cavalcante Muniz** is in agreement with the Ethical Principles in Human Research adapted by National Ethical Committee (CONEP) and was approved by the Universidade Federal do Amapá (UNIFAP) – Ethical Committee for Research (CEP) in 16/02/2012.

Macapá, 16 de fevereiro de 2012

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

Anexo 2

1418720736473825

TERMO DE CONCESSÃO E ACEITAÇÃO DE APOIO FINANCEIRO A PROJETO

CONCEDENTE

Nome: CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO
CNPJ/ME: 33.654.831/0001-36

BENEFICIÁRIO

Nome: José Wagner Cavalcante Muniz
CPF/ME: 301.291.173-15

1. FINALIDADE

Concessão de auxílio financeiro a projeto de natureza científica, tecnológica ou de inovação.

1.1. TÍTULO DO PROJETO

ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS PROVOCADAS PELAS ONDAS ULTRASSÔNICAS CONTÍNUAS DE 1 MHz NO DISCO EPIFISÁRIO EM FÊMUR DE CAMUNDONGO.

1.2. IDENTIFICAÇÃO DO PROCESSO

Número do processo: 471885/2011-8
Edital/Chamada: Universal 14/2011 - Faixa A - até R\$20.000,00

2. VALOR GLOBAL DA CONCESSÃO

AUXÍLIO FINANCEIRO

Custeio: R\$ 2.976,00

Capital: R\$ 10.000,00

Valor Global: R\$ 12.976,00

- 2.1. Os recursos serão liberados pelo CNPq em função de suas disponibilidades financeiras e orçamentárias.
- 2.2. As despesas decorrentes da execução do objeto do presente Termo, em exercício futuro, por parte do CNPq, correrão à conta de suas dotações orçamentárias do respectivo exercício, sendo objeto de apostila, a indicação dos créditos e empenhos para sua cobertura em exercício subsequente.

2.3. O pagamento das bolsas de longa duração será efetuado diretamente ao bolsista, mediante depósito em conta-corrente aberta junto ao Banco do Brasil, conforme instruções do CNPq, ou na modalidade cartão, quando for o caso.

2.4. O pagamento de bolsas de curta duração será efetuado pelo BENEFICIÁRIO do auxílio, coordenador do projeto, que deverá prestar contas de acordo com as normas do CNPq e manter cópias dos recibos dos pagamentos efetuados, segundo modelo disponível na página do CNPq na Internet.

2.5. A vigência das bolsas não poderá ultrapassar a vigência do presente instrumento.

3. INSTITUIÇÃO DE VÍNCULO FUNCIONAL/EMPREGATÍCIO

Nome: *****

CNPJ: *****

4. INSTITUIÇÃO DE EXECUÇÃO DO PROJETO

Nome: Universidade Federal do Amapá

CNPJ: 34868257000181

5. DECLARAÇÃO:

Ao enviar este documento ao CNPq, o BENEFICIÁRIO DECLARA FORMALMENTE:

a) conhecer o Protocolo de Cooperação Técnica firmado entre a instituição indicada como executora deste projeto e o CNPq e as [Condições Gerais](#) que regem o presente Termo;

b) saber que os documentos referidos na alínea 'a' são parte integrante do presente Termo, e que foram publicados no Diário Oficial e reproduzidos na página do CNPq na Internet;

c) subscrever e concordar integralmente com os referidos Termos;

d) conhecer e cumprir as normas do CNPq, ora em validade, sobre a modalidade de auxílio que lhe é concedida e que também são consideradas parte integrante deste documento; saber que a eventual mudança dessas normas não afeta, altera ou incide sobre o presente Termo, exceto quando proposta pelo CNPq e formalmente aceita pelo BENEFICIÁRIO.

e) possuir anuência formal da INSTITUIÇÃO de execução do projeto, seja sob a forma de vínculo empregatício ou funcional ou, na ausência deste, sob a forma de [declaração de autoridade institucional](#) competente, segundo modelo disponível na página do CNPq na Internet, para a utilização de sua infra-estrutura e facilidades pertinentes para a execução do projeto;

f) dispor das autorizações legais cabíveis de instituições como Instituto Brasileiro de Meio Ambiente - IBAMA, Fundação do Nacional do Índio - FUNAI, Comitê de Ética na Pesquisa - CEP, Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, das Comissões de Ética em pesquisa com animais, Comissão Nacional de Energia Nuclear - CNEN e outras, no caso em que a natureza do projeto as exigir;

g) no caso de o projeto incluir a concessão de bolsas:

indicará bolsista com titulação e nível correspondentes ao da bolsa concedida, pelo tempo estipulado, por meio do formulário pertinente e que responderá integralmente pela adequação e correção desta indicação; comunicará ao CNPq, por meio do formulário pertinente, a substituição do bolsista nos casos em que isso seja previsto e permitido; manterá sob sua custódia, documento assinado pelo bolsista, segundo modelo disponível na página do CNPq na internet, declarando conhecer as regras da bolsa que receberá e comprometendo-se a acatá-las integralmente.

h) que manterá sob sua guarda, os documentos comprobatórios referidos no item 2.4 e nas alíneas "e", "f" e "g.3" deste item, até 5 (cinco) anos após a aprovação final das contas do CNPq pelo Tribunal de Contas da União;

i) que conferiu as informações constantes de seu currículo Lattes e as declara corretas e atualizadas;
j) que tem ciência de que esta declaração é feita sob pena da incidência nos artigos 297-299 do Código Penal Brasileiro sobre a falsificação de documento público e falsidade ideológica, respectivamente, disponível na página do CNPq, na Internet.

6. LEGISLAÇÃO APLICÁVEL

Sujeita-se o BENEFICIÁRIO às normas do CNPq, às condições contidas na Instrução Normativa nº 01, de 15 de janeiro de 1997, da Secretaria do Tesouro Nacional, na Portaria Interministerial MF/MP/CGU nº 127, de 29 de maio de 2008, nas Leis nº 8.666/93 e nº 10.973/04, nos Decretos nº 93.872/86 e nº 5.563/05 e na Lei n.º 8.112/90, de 11 de dezembro de 1990, no que couber, bem como nos demais instrumentos legais pertinentes.

7. DA VIGÊNCIA e ALTERAÇÕES

7.1. O presente Termo terá vigência pelo prazo máximo constante no Edital/Chamada correspondente.

7.2. O aceite deste Termo deve ser devidamente enviado ao CNPq. O prazo para utilização dos recursos para custeio/capital e/ou bolsas começa a vigorar a partir da data da publicação, pelo CNPq, no Diário Oficial da União, do presente Termo de Concessão e Aceitação, pelo período de 24(vinte e quatro) meses.

7.3. Este instrumento poderá ser alterado, por meio de termos aditivos, com as devidas e aceitas justificativas apresentadas no prazo mínimo de 30 (trinta) dias antes da data que se pretenda o implemento das alterações, exceto o aditamento com o intuito de alterar sua finalidade, sendo nulo de pleno direito qualquer ato nesse sentido.

8. DA NOTIFICAÇÃO E PUBLICAÇÃO

8.1. O CNPq notificará o BENEFICIÁRIO, por via eletrônica, a aprovação de seu projeto.

8.2. Por razões orçamentárias, o BENEFICIÁRIO terá o prazo estipulado na notificação eletrônica para retornar ao CNPq o presente Termo de Concessão e Aceitação.

8.3. O não cumprimento do prazo definido, exceto quando plenamente justificável a critério da Diretoria do CNPq, implica irreversivelmente no cancelamento da concessão. Não são justificativas aceitáveis: endereços errados na Plataforma Lattes; nãoabertura do e-mail institucional; esquecimento; viagens e problemas com o computador ou na transmissão em tempo hábil.

8.4. A publicação do extrato deste Termo no Diário Oficial da União será providenciada pelo CNPq, até o quinto dia útil do mês seguinte ao de sua assinatura, devendo ocorrer no prazo de 20 (vinte) dias daquela data.

9. ACEITE

Ao enviá-lo ao CNPq, o BENEFICIÁRIO declara que leu e aceitou integralmente os termos deste documento. Termo de aceitação registrado eletronicamente por meio da internet junto ao CNPq, pelo agente receptor 10.0.0.228(srv211.cnpq.br) , mediante uso de senha pessoal do Beneficiário em 09/01/2012, originário do número IP 189.82.0.42(189.82.0.42) e número de controle 2418950724189507:436481213-3040561202.

Para visualizar este documento novamente ou o PDF assinado digitalmente, acesse: [http://efomento.cnpq.br/efomento/termo?](http://efomento.cnpq.br/efomento/termo?numeroAcesso=1418720736473825)
numeroAcesso=1418720736473825.

Anexo 3



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

Macapá-AP, 04 de Julho 2011.

Ao Dr. Fernando Medeiros
Presidente do Laboratório Central do Estado do Amapá /LACEN

Assunto: Solicitação de parceria para pesquisa experimental em animais.

Senhor Presidente,

Como docente vinculado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Amapá – UNIFAP venho solicitar a Vossa Senhoria parceria deste laboratório, no sentido da disponibilização de 39 camundongos albino *swiss* com 04 semanas em fase de crescimento para a realização de pesquisa experimental da mestranda **Daniela Pinheiro da Silva**, Matrícula CS 6112001, conforme projeto de pesquisa anexo.

Atenciosamente,

Assinatura manuscrita em tinta preta, com uma linha decorativa curva abaixo.

Prof. Dr. José Wagner Cavalcante Muniz
Orientador

Anexo 4



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

Macapá-AP, 04 de Julho 2011.

A Profa. Dra. Jocivania Oliveira da Silva
Coordenadora do Laboratório de Toxicologia

Assunto: Solicitação de parceria para pesquisa experimental em animais.

Senhora Coordenadora,

Como docente vinculado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Amapá - UNIFAP venho solicitar a Vossa Senhoria parceria, no sentido da disponibilização do espaço do referido laboratório para armazenagem de 30 camundongos albino *swiss* com 04 semanas em fase de crescimento para a realização de pesquisa experimental da mestrand **Daniela Pinheiro da Silva**, Matrícula CS 6112001, conforme projeto de pesquisa anexo.

Atenciosamente,

Assinatura manuscrita em tinta preta, com uma linha decorativa curva abaixo.

Prof. Dr. José Wagner Cavalcante Muniz
Orientador

Anexo 5



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

Macapá-AP, 04 de Julho 2011.

À Profa. Dra. Suzana Cantanhede Orsini Machado De Souza.
Departamento de estomatologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo - FO/USP
AV Prof Lineu Prestes, 2227, Cidade Universitária. CEP 05508-000. São Paulo.

Assunto: Solicitação de parceria para pesquisa experimental em animais.

Senhora Coordenadora,

Como docente vinculado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Amapá – UNIFAP venho solicitar a Vossa Senhoria parceria para processamento e análise histológica do material da pesquisa da mestranda **Daniela Pinheiro da Silva** que ficará sob responsabilidade da doutoranda Ana Rita P. Barcessat, conforme projeto de pesquisa anexo.

Atenciosamente,

Assinatura manuscrita em tinta preta, com uma linha decorativa curva abaixo do nome.

Prof. Dr. José Wagner Cavalcante Muniz
Orientador

Anexo 6



RECIBO DE ENVIO DE FORMULÁRIOS ELETRÔNICOS

Número do protocolo	5134831672465559
Solicitante	José Wagner Cavalcante Muniz
CPF/CGC	30129117315
Formulário	Formulário de Propostas Web (1.0.0)
Edital / Chamada	Universal 14/2011 - Faixa A - até R\$20.000,00

O sistema de recepção de formulários eletrônicos do CNPq registra que em 02/08/2011, às 20:15:18 horas, o formulário identificado acima foi recebido e reconhecido no CNPq, recebendo o número de protocolo 5134831672465559. Acompanhe o andamento de sua solicitação no site do CNPq (<http://www.cnpq.br>) em PLATAFORMA CARLOS CHAGAS'.

Anexo 7



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
Programa de Pós-Graduação em Odontologia
Patologia Bucal

DECLARAÇÃO

Declaro para fins de qualificação do projeto intitulado: Alterações histológicas provocadas pelas ondas ultrassônicas contínuas de 1 Mhz no disco epifisário em fêmur de camundongo, do Programa de Pós-Graduação de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Amapá, de autoria da mestranda **DANIELA PINHEIRO DA SILVA**, orientada pelo Prof. Dr. José Wagner Cavalcante Muniz, que o processamento e análise histológica das peças será realizado no Laboratório de Patologia Cirúrgica da Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, sob responsabilidade da doutoranda Ana Rita Pinheiro Barcessat.

São Paulo, 09 de setembro de 2011.


Profa. Dra. Suzana C.O.M. de Sousa
Disciplina de Patologia Bucal
Responsável