

# Alterações histológicas provocadas pelas ondas ultrassônicas contínuas de 01 MHz no disco epifisário em tibia de camundongo

*Histological changes caused by continuous ultrasonic waves of 01 MHz on the epiphyseal disk of murine tibia*

Daniela Pinheiro da Silva<sup>1</sup>, José Wagner Cavalcante Muniz<sup>2</sup>, Ana Rita Pinheiro Barcessat<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Mestre em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Amapá (UNIFAP), Macapá, AP; <sup>2</sup>Doutor em Neurociências e em Biologia Celular pela Universidade Federal do Pará (UFPA), Professor Adjunto da UNIFAP, Macapá, AP; <sup>3</sup>Doutora em Estomatologia Básica e Aplicada – Patologia Bucal, Professora Adjunto da UNIFAP, Macapá, AP.

Fonte de Financiamento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ)

## RESUMO

**Objetivos:** Verificar alterações histológicas no disco epifisário da tibia em crescimento de camundongos em exposição a ondas ultrassônicas de frequência de 1 MHz.

**Métodos:** Estudo experimental de natureza quantitativa e randomizado. Para tanto, 16 camundongos albinos da linhagem *Swiss Webster*, em fase de crescimento, com idade de três semanas e peso entre 10-15 g foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos de oito animais cada um, e expostos a ondas ultrassônicas na tibia direita. Os grupos foram designados D1 (exposto à dose de 0,1 w/cm<sup>2</sup>) e D2 (exposto à dose de 0,5 w/cm<sup>2</sup>). O grupo controle, designado C, foi representado por 16 amostras referentes ao lado contralateral de cada animal dos grupos D1 e D2. Os procedimentos ocorreram em uma aplicação/dia, totalizando ao final, 10 aplicações sem interrupção. Análise histológica ocorreu pelas técnicas de hematoxilina-eosina, *alcian blue* e *von kossa*, visando medir a área da cabeça da tibia versus disco epifisário e as espessura das zonas proliferativa e hipertrófica. Para análise estatística foi utilizado teste de Friedman com correção de Bonferroni.

**Resultados:** O tecido ósseo foi influenciado pelas ondas ultrassônicas, assim como o disco epifisário, em que o grupo de maior parâmetro teve a área total do disco maior do que os demais. A zona calcificada não sofreu influência das ondas ultrassônicas, porém a zona proliferativa foi sensível a essa terapia, principalmente na menor dose. Não foi encontrada nenhuma alteração anatomopatológica nos grupos tratados e controle.

**Conclusões:** Nos parâmetros utilizados neste estudo foi observada ação positiva do ultrassom na cartilagem, e no tecido ósseo em formação, não sendo possível precisar qual foi o nível de intensidade da aplicação do ultrassom mais significativo estatisticamente.

**DESCRIPTORIOS:** DESENVOLVIMENTO ÓSSEO; TERAPIA POR ULTRASSOM.

## ABSTRACT

**Aims:** To evaluate the histological changes in the epiphyseal disk of the tibia in growing mice during exposure to ultrasonic waves of 1 MHz frequency.

**Methods:** Experimental study of quantitative and randomized nature. For this purpose, 16 Swiss albino mice of the Webster strain, during growth, aged 3 weeks and weighing 10-15 g were randomly divided into two groups of eight animals each and exposed to ultrasonic waves in the right tibia. Groups D1 (exposed to a dose of 0.1 W/cm<sup>2</sup>) and D2 (exposed dose of 0.5 W/cm<sup>2</sup>) were assigned. The control group, designated C, was represented by 16 samples relating to the contralateral side of each animal of groups D1 and D2. Procedures occurred in an application/day, totaling 10 applications without interruption. The samples were analyzed histological by hematoxylin-eosin staining techniques, Alcian blue and Von Kossa stains, in order to measure the area of the head versus the tibia epiphyseal disc, beyond the thickness of the proliferative and hypertrophic zones. For statistical analysis we used the Friedman test with Bonferroni correction.

**Results:** The bone tissue was influenced by ultrasonic waves, as well as the epiphyseal plate, where the group had the largest parameter of the total area larger than the other disc. The calcified zone was not influenced by the ultrasonic waves, but the proliferative zone was sensitive to this therapy, especially at the lowest dose. No pathological changes were found in the treated and control groups.

**Conclusions:** With the parameters used in this study positive action of ultrasound was observed in the cartilage and bone tissue formation, not being possible to determine what was the intensity level of the application of ultrasound statistically more significant.

**KEY WORDS:** BONE DEVELOPMENT; ULTRASONIC THERAPY.

Recebido em novembro de 2013; aceito em fevereiro de 2014.

Endereço para correspondência / Corresponding Author:

DANIELA PINHEIRO DA SILVA  
Av. Tupis, 25 – Beírol  
68902-190 Macapá, AP, Brasil  
Tel.: (96) 8119-6215 / 9163-1136  
E-mail: [dani.spinheiro@yahoo.com.br](mailto:dani.spinheiro@yahoo.com.br)



<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

## INTRODUÇÃO

O ultrassom é uma modalidade terapêutica amplamente utilizada na prática fisioterapêutica, sendo vital a compreensão completa de seus efeitos físicos e biológicos e dos seus mecanismos de ação nos tecidos, de modo a usá-la efetivamente e, o mais importante, com segurança.<sup>1</sup> Dependendo da frequência de ondas utilizada, pode ser útil para o diagnóstico por imagem, cura terapêutica ou destruição tecidual.<sup>2</sup> Seus efeitos são influenciados por fatores biológicos de cada indivíduo, mas também por fatores físicos, tais como intensidade e tempo de exposição.<sup>3</sup>

O modo de transmissão das ondas ultrassônicas pode ser contínuo ou pulsado. O contínuo possui características como ondas sônicas contínuas, efeitos térmicos e micromassagem. Sua utilização ocorrerá quando ambos os efeitos, térmicos e não térmicos, forem necessários. Já o modo pulsado possui características de ondas sônicas pulsadas, efeitos térmicos minimizados e efeitos não térmicos.<sup>4</sup> Seus efeitos biológicos ainda carecem de comprovação sistematizada. Uma das contraindicações mais discutidas e controversas é a aplicação nas epífises de crescimento, pela presença do disco epifisário, de forma que a utilização da terapia em crianças deixa de ocorrer em função das dúvidas do profissional em relação aos possíveis efeitos adversos nessa área do osso.<sup>5</sup>

A célula óssea pode, rapidamente, identificar as características do estímulo mecânico, como o estímulo do ultrassom, 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; sabe-se que a hiperpolarização está associada à osteogênese, enquanto a despolarização, com a reabsorção óssea.<sup>7</sup>

As conclusões acerca do efeito do ultrassom em epífises de crescimento ósseo são controversas. Há estudiosos que indicam<sup>8</sup> que contra indicam,<sup>1,9,10</sup> que afirmam que o ultrassom deve ser usado com cautela,<sup>11</sup> que afirmam que ele não interfere na epífise de crescimento,<sup>6</sup> ou, ainda, aqueles que relatam que intensidades de ultrassom abaixo do padrão clínico têm efeito positivo na diferenciação osteogênica.<sup>12</sup>

A controvérsia científica quanto à indicação ou contraindicação do uso das ondas ultrassônicas nas epífises de crescimento ósseo justificou o presente trabalho, uma vez que ao se observar a aplicação direta das ondas no disco e sua possível interferência

pode-se sugerir a sua utilização ou não nos tecidos adjacentes.

## MÉTODOS

A pesquisa foi submetida à comissão de ética em pesquisa de animais da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP), sendo aprovada através do certificado de número 454515/2011, conforme normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O estudo foi realizado no laboratório de toxicologia do Curso de Ciências Farmacêuticas da UNIFAP e no Laboratório de Patologia Cirúrgica do Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (USP).

Foram utilizados 16 camundongos albinos da linhagem *Swiss Webster*, em fase de crescimento, com idade de três semanas, machos, com peso entre 10-15 g. Os grupos receberam tratamento veiculado com o ultrassom terapêutico modelo *Sonacel expert* da marca Bioset – Indústria de Tecnologia Eletrônica Ltda. (São Paulo, Brasil) de frequência de 01 MHz, transdutor eletroacústico reduzido especialmente desenvolvido para experimento animal com área de irradiação efetiva (ERA) de 0,8 cm<sup>2</sup>, modo de corrente contínuo.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos de oito animais, nos quais não havia nenhum tipo de lesão óssea. Os procedimentos ocorreram em uma aplicação por dia, totalizando ao final, 10 aplicações sem interrupção. O membro elegível foi o direito, ficando o membro esquerdo como controle. Foram propostos dois grupos de tratamento designados Dose 01 (D1) e Dose 02 (D2) e um grupo controle (C), com os seguintes parâmetros: Grupo D1: frequência = 1 MHz; intensidade = 0,1 w/cm<sup>2</sup>; contínuo e tempo = 1,5 minutos; Grupo D2: frequência = 1 MHz, intensidade = 0,5 w/cm<sup>2</sup>, contínuo e tempo = 1,5 minutos; Grupo C: não recebeu tratamento algum.

Ao término de cada experimento os animais foram sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub> e houve o processamento da amostra. Três cortes de 3 µm foram obtidos em micrótomo e as lâminas foram coradas em hematoxilina e eosina, sendo então analisadas em microscopia de luz convencional. Os outros dois cortes foram submetidos a colorações especiais de *alcian blue*, tendo por objetivo determinar variações da matriz cartilaginosa, e ao método de *Von kossa*, que teve por objetivo identificar possíveis focos de calcificação fora da placa epifisária.

Depois de realizadas as devidas técnicas de coloração, procedeu-se com a mensuração histológica realizada através do sistema de análise digital de imagem que contém o *software* especializado Lasv 4.1. Com o aumento de cinco vezes, mediu-se a área total da cabeça da tíbia e a área total do disco epifisário, para identificação de possíveis alterações da espessura do disco epifisário por cálculo de área expressa em micrômetros. Com o aumento de 10 vezes, foram tiradas três medidas de três áreas diferentes e de forma linear expressas em micrômetros, das zonas proliferativa e hipertrófica.

Para a análise estatística foi utilizado o teste de Friedman com correção de Bonferroni. Para a comparação dos três grupos simultaneamente, foi aplicado o teste de Friedman para blocos com repetições. Foi previamente fixado o nível de significância  $\alpha=0.05$  para rejeição da hipótese nula.

## RESULTADOS

Os resultados dos testes para cada uma das cinco características estudadas são apresentados na **Tabela 1**. Apenas as mensurações de zona calcificada não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos.

Para as características que apresentaram diferença significativa entre os grupos nesse primeiro teste, foi aplicado o teste de Friedman novamente, comparando os grupos dois a dois (**Tabela 2**). Observamos que na área do osso houve diferença estatística significativa apenas entre os grupos C e D1, em que os valores

médios do grupo C foram superiores aos valores médios do grupo D1. Quanto à área do disco houve diferença estatística significativa apenas entre os grupos C e D2, em que os valores médios do grupo C foram inferiores aos valores médios do grupo D2.

No que se refere à área do disco *versus* área do osso houve diferença estatística significativa apenas entre os grupos C e D2, onde os valores médios do grupo C foram inferiores aos valores médios do grupo D2. Verificamos que na zona calcificada não houve diferença significativa, já na zona proliferativa houve diferença estatística significativa entre os grupos C e D1, onde os valores médios do grupo C foram inferiores aos valores médios do grupo D1.

**Tabela 1.** Comparação entre os três grupos, sendo dois expostos a ondas ultrassônicas (grupo D1: frequência 1 MHz; intensidade 0,1 w/cm<sup>2</sup>, contínuo; tempo 1,5 minutos; e grupo D2: frequência 1 MHz; intensidade 0,5 w/cm<sup>2</sup>, contínuo; tempo 1,5 minutos) e um não exposto (grupo C, controle), para cada uma das cinco características estudadas. Podemos observar que apenas as mensurações de zona calcificada não apresentaram diferença estatística entre os grupos (valor  $p>0.05$ ).

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

\* Diferença significativa ao nível de 5%.

**Tabela 2.** Significâncias estatísticas das diferenças entre as alterações da espessura da área do disco epifisário e da área do osso expressa em micrômetros, após aplicação de ultrassom terapêutico, em 16 camundongos sem lesão óssea prévia, divididos em dois grupos de tratamento e um grupo controle constituído pelos membros contralaterais de cada animal.

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

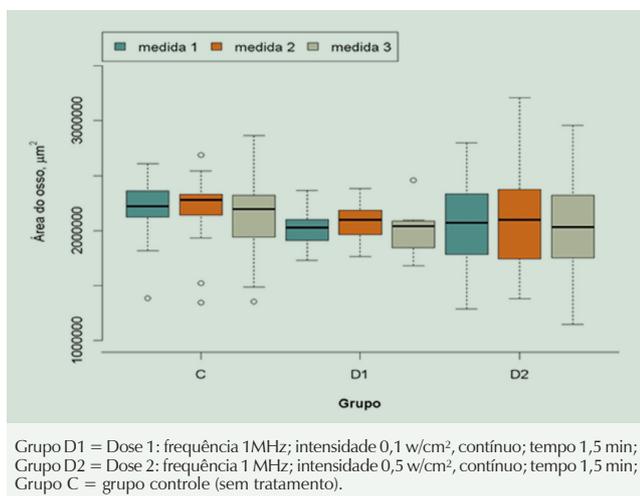
\* Diferença significativa ao nível de 5%.

Razão = Área do disco / Área do osso.

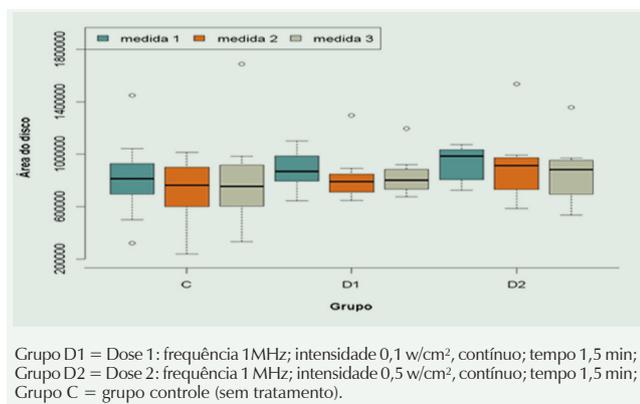
Grupo D1 = Dose 1: frequência 1 MHz; intensidade 0,1 w/cm<sup>2</sup>, contínuo; tempo 1,5 min;

Grupo D2 = Dose 2: frequência 1 MHz; intensidade 0,5 w/cm<sup>2</sup>, contínuo; tempo 1,5 min;

Grupo C = grupo controle (sem tratamento).



**Figura 1.** Área do osso segundo os grupos (C, D1 e D2) e segundo os blocos de medidas feitas em três áreas diferentes e de forma linear expressas em micrômetros, das zonas proliferativa e hipertrófica (medida 1, medida 2 e medida 3). As medidas do 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 2.** Área do disco segundo os grupos (C, D1 e D2) e segundo os blocos de medidas feitas em três áreas diferentes e de forma linear expressas em micrômetros, das zonas proliferativa e hipertrófica (medida 1, medida 2 e medida 3). Os grupos D1 e D2 apresentaram valores maiores de mediana. Além disso, o grupo D1 apresentou menor variação.

## DISCUSSÃO

Dúvidas clínicas e estudos controversos sobre o possível efeito danoso que o ultrassom contínuo pode causar à placa de crescimento ósseo, como os relatados na pesquisa de Fréz et al.,<sup>8</sup> concluíram que o ultrassom contínuo de 1 w/cm<sup>2</sup> produz alterações histológicas na cartilagem tratada, sugerindo uma aceleração no metabolismo da placa. Esses estudos

se contrapõem com os resultados encontrados na pesquisa de Barreto et al., que também utilizou várias intensidades de ultrassom contínuo na placa de crescimento ósseo, entre as quais a intensidade 1 w/cm<sup>2</sup> e, ao final, concluiu que o ultrassom não produziu nenhum efeito na cartilagem de crescimento. Essas controvérsias, somadas à 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.

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 w/cm<sup>2</sup>) quando comparada ao controle, o que sugere que as ondas ultrassônicas possivelmente estariam influenciando a atividade do disco epifisário e consequentemente no tamanho do osso. O disco epifisário apresentou-se maior no grupo do parâmetro máximo (0,5 w/cm<sup>2</sup>) do que no grupo controle, evidenciando-se assim o efeito das ondas ultrassônicas sobre a morfologia do disco epifisário, aumentando seu comprimento. Estes resultados concordam com as observações feitas por Barreto et al.,<sup>13</sup> que sugeriram que os grupos tratados com intensidades de 0,5 e 1,0 w/cm<sup>2</sup> poderiam ter uma tendência de estímulo ao crescimento do osso. Porém, estes dados diferem dos resultados encontrados por Santos et al.<sup>5</sup> nos grupos tratados com ultrassom contínuo de 1 w/cm<sup>2</sup> e 2 w/cm<sup>2</sup> por 5 min e 3 min, que concluíram que o ultrassom prejudica o crescimento ósseo, apesar de naquele trabalho a intensidade ser menor (0,5 w/cm<sup>2</sup>) quando comparada à pesquisa de Santos et al.<sup>5</sup>

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. Essa zona apresentou-se maior no grupo D1 (o de menor parâmetro) do que no controle, provavelmente porque os condrócitos estão com ciclo celular mais ativo e o aporte energético oferecido pelo ultrassom leva ao aumento de adenosina trifosfato, 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. No grupo D2, de maior parâmetro, não foi observada nenhuma alteração na espessura da camada proliferativa, possivelmente porque a interferência do ultrassom nessa zona pode estar relacionada a uma

aceleração do metabolismo celular provido pelo aporte energético de baixa intensidade, o que não ocorreria ao se aumentar a densidade de energia. Ideia esta reforçada pela pesquisa de Angle et al.,<sup>12</sup> 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 mais associados às atividades das placas de crescimento ósseo.<sup>14</sup> 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 dessa 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 das células já hipertróficas.

Com esta 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, não se podendo precisar que nível de intensidade da aplicação do ultrassom se tornou mais significativo estatisticamente. As zonas de proliferação foram as mais susceptíveis ao efeito das ondas ultrassônicas enquanto nas zonas hipertróficas não se observaram aumentos significativos com nenhuma das doses.

## REFERÊNCIAS

1. Kitchen S. Eletroterapia prática baseada em evidências. 11ª ed. Barueri: Manole; 2003.
2. Guirro ECO, Guirro RRJ. Fisioterapia dermatofuncional: fundamentos, recursos e patologias. 3ª ed. Barueri: Manole; 2002.
3. Freitas TP, Freitas LS, Streck EL. Ultra-som terapêutico no mecanismo de cicatrização: uma revisão. ACM Arq Catarin Med. 2011;40(1):89.
4. Cohen M, Abdalla EJ. Lesões nos esportes: diagnóstico, prevenção e tratamento. Rio de Janeiro: Revinter; 2005.
5. Santos CA, Fialho HSA, Pinto JA, Alves MTS. Influência do ultrassom terapêutico na epífise de crescimento ósseo de coelhos. Fisioter Pesqui, 2005;12(2):13-9.
6. Spadaro JA, Albanese SA. Application of low – intensity ultrasound to growing bone in rats. Ultrasound Med Biol. 1998 May;24(4):567-73.
7. Scott A, Khan KM, Duronio V, Hart DA. Mechanotransduction in human bone in vitro cellular physiology that underpins bone changes with exercise. Sports Med. 2008;38(2):139-60.
8. Fréz AR, Ariza D, Ferreira JRL, Alves EPB, Breda GR, Centenaro LA, Ueda TK, Bertolini GRF. Efeito do ultra-som terapêutico contínuo em placas epifisárias de coelhos. Rev Bras Med Esporte. 2006 May/Jun;12(3):150-2.
9. Kahn J. Princípios e prática de eletroterapia. 4ª ed. São Paulo: Santos; 2001.
10. Agne JE. Eletrotermoterapia: teoria e prática. Santa Maria: Orium; 2005.
11. Low J. Eletroterapia explicada: princípios e prática. 3ª ed. Barueri: Manole; 2001.
12. Angle SR, Sena K, Sumner DR, Virdi AS. Osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells by various intensities of low-intensity pulsed ultrasound. Ultrasonics. 2011 Apr;51(3):281-8.
13. Barreto AA. Efeitos do ultra-som terapêutico sobre o crescimento das epífises, distal do fêmur e proximal da tíbia em *rattus norvegicus* [doutorado]. [Botucatu]: Universidade Estadual Julio de Mesquita Filho; 2009. 148 p.
14. Pacheco I. O efeito da carga compressiva repetitiva sobre a placa de crescimento: estudo experimental em ratos [doutorado]. [Porto Alegre]: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2003. 116 p. 