

EFEITOS DO ULTRA-SOM TERAPÊUTICO SOBRE O CRESCIMENTO LONGITUDINAL DO FÊMUR E DA TÍBIA EM RATOS

EFFECTS OF THERAPEUTIC ULTRASOUND ON LONGITUDINAL GROWTH OF THE FEMUR AND TIBIA IN RATS

ALFREDO ALCANTARA BARRETO¹, ROMI KAWASAKI ALCANTARA BARRETO², HAMILTON DA ROSA PEREIRA¹, WILLIAM SAAD HOSNNE¹

RESUMO

Objetivo: Estudar efeitos do ultra-som terapêutico sobre o crescimento do fêmur e da tíbia, em ratos jovens. **Método:** *Ratus norvegicus* com quatro semanas de vida, machos, totalizando 115 animais, divididos em quatro grupos, foram submetidos ao ultra-som terapêutico (0,8 MHz, cabeçote fixo, pulso contínuo, por dez minutos, durante dez dias), na face medial do joelho direito, nas potências de 0,0 W/cm² (grupo controle), 0,5 W/cm² (grupo G2), 1,0 W/cm² (grupo G3), e 1,5 W/cm² (grupo G4). Lâminas histológicas da epífise, placa de crescimento e metáfise e as medidas dos comprimentos do fêmur e da tíbia foram estudadas na sexta, décima terceira e vigésima sexta semanas de vida. Os dados foram submetidos à análise de variância – fatorial inteiramente aleatorizado. **Resultado:** Nenhuma alteração estatística do crescimento ósseo foi estabelecida entre quaisquer dos três grupos tratados e o grupo controle. Entretanto, alterações sugestivas de diminuição do crescimento do fêmur e da tíbia de G4 em relação a G2 e G3, foram evidenciadas. No grupo G4 alterações histopatológicas como necroses celulares e neoformação óssea, pós-necrose, foram encontradas. **Conclusão:** Quando comparados os grupos tratados com o grupo controle, não há evidência estatística de estímulo ou inibição ao crescimento ósseo pela aplicação do ultra-som terapêutico. **Nível de Evidência:** Nível II, estudo coorte transversal.

Descritores: Terapia por ultrassom. Desenvolvimento ósseo. Epífises. Ratos.

ABSTRACT

Objectives: To determine the effects of ultrasound therapy on the femur and tibia growth in young rats. **Method:** Four-week-old male *Ratus Norvegicus* totaling 115 animals, divided into four groups, were submitted to ultrasound therapy (0.8 MHz, fixed tube head, continuous pulse, for 10 minutes, once a day, ten times) on the medial face of the right knee, with powers of 0.0 W/cm² (group G1), 0.5 W/cm² (group G2), 1.0 W/cm² (group G3), and 1.5 W/cm² (group G4). Histological slides of the epiphysis, growth plate and metaphysis and the femoral and tibial length measurements were studied in the sixth, thirteenth and twenty-sixth weeks of life. The data were submitted to factorial analysis of variance according to a one-way layout. **Results:** No statistically significant bone growth alteration was established between any of the three treated groups and the control group. However, alterations in femoral and tibial growth suggesting a decrease in G4 in relation to G2 and G3 were noted. In G4, histopathological alterations, such as cellular necrosis and post-necrosis bone neoformation were found. **Conclusion:** According to this study, no statistical evidence of bone growth stimulus or inhibition resulting from the application of ultrasound therapy was found when comparing the treated groups with the control group. Histological alterations regarded as pathological were only observed in G4. Also, smaller significant bone growth was found in G4 compared to G2 and G3. **Level of Evidence:** Level II, cross-sectional study.

Keywords: Ultrasound therapy. Bone development. Epiphyses. Rats.

Citação: Barreto AA, Barreto RK, Pereira HR, Hosnne WS. Efeitos do ultra-som terapêutico sobre o crescimento longitudinal do fêmur e da tíbia em ratos. *Acta Ortop Bras.* [online]. 2011;19(3):132-6. Disponível em URL: <http://www.scielo.br/aob>.

Citation: Barreto AA, Barreto RK, Pereira HR, Hosnne WS. Effects of therapeutic ultrasound on longitudinal growth of the femur and tibia in rats. *Acta Ortop Bras.* [online]. 2011;19(3):132-6. Available from URL: <http://www.scielo.br/aob>.

Todos os autores declaram não haver nenhum potencial conflito de interesses referente a este artigo.

1 – Departamento de Cirurgia e Ortopedia – Disciplina de Ortopedia e Traumatologia - Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, Brasil.

2 – Serviço de Reabilitação do SESI – São Paulo, Brasil.

Trabalho realizado no Departamento de Cirurgia e Ortopedia da Faculdade de Medicina de Botucatu da Universidade Estadual "Julio de Mesquita Filho" – UNESP – Botucatu (SP), Brasil. Correspondência: Departamento de Cirurgia e Ortopedia – Disciplina de Ortopedia e Traumatologia - Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, Campus de Rubião Junior – CEP: 18618-970 – Botucatu (SP), Brasil. E-mail: alalcbar@fmb.unesp.br.

Artigo recebido em 23/12/06, aprovado em 19/06/07.

INTRODUÇÃO

Ao lado de efeitos benéficos como aquecimento seletivo dos tecidos;^{1,2} efeitos indesejados podem ocorrer com a utilização do ultra-som, como o efeito de cavitação;³⁻⁶ hiper-aquecimento em tecidos mal vascularizados, hiperemia, respostas inflamatórias caracterizadas por aumento da vascularidade, edema e necrose tecidual,⁷ tornando a utilização terapêutica incerta em algumas situações, tais como, deficiência vascular, infecções, sobre o tecido nervoso e a placa epifisária.⁸⁻¹⁰

Os estudos biológicos realizados utilizaram ampla variação de frequência e tipo de pulso, potência, número e tempo de cada aplicação de ultra-som e com animais de diferentes idades e espécies (ratos e coelhos principalmente, mas também cães e carneiros) e em seres humanos. O resultado dos trabalhos, ainda que com alguma divergência,¹¹ mostram alterações vasculares,¹² estímulo à cicatrização de úlceras de pele,¹³ de tendões,¹⁴ na formação do calo de fratura,^{15,16} mas não na neoformação óssea,¹⁷ encontrando-se poucos trabalhos mais recentes sobre seus efeitos no crescimento ósseo longitudinal e na placa epifisária.¹⁸⁻²⁰

Devido a esta diversidade é difícil, a comparação dos dados, ter entendimento claro dos efeitos biológicos e uma conclusão segura, a ponto de Wells³, considerado "desapontador o conhecimento científico sobre as bases biológicas de sua utilização" e Haar⁴ e Leighton⁶ tecerem considerações sobre a necessidade de mais investigações a este respeito.

Resolvemos elaborar o presente estudo, visando investigar os efeitos de diferentes potências do ultra-som terapêutico sobre o crescimento ósseo longitudinal do fêmur e tíbia, em condições semelhantes às empregadas na terapêutica clínica, utilizando equipamentos de uso comum, observando o crescimento ósseo até a idade adulta.

Decidimos utilizar o rato como animal de experimentação objeto de vários estudos sobre a anatomia e fisiologia da placa epifisária.^{21,22} Ratos têm alta taxa de crescimento até atingir sua maturidade sexual na 13ª semana de vida e, apesar de manter a placa epifisária aberta por toda a vida, apresenta um crescimento mínimo após a 26ª. semana de vida.²¹

MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizados 115 Ratus Norvegicus com quatro semanas de vida, divididos em quatro grupos, submetidos a diversas potências de ultra-som (Tabela 1) e acompanhados até a 26ª de vida.

Tabela 1. Identificação dos grupos e número de animais.

Grupo	G1	G2	G3	G4	n
Potência	0,0	0,5	1,0	1,5	
Número de animais	30	28	27	30	115

O ultra-som foi aplicado, estando os animais anestesiados, utilizando-se aparelho comercial T.U.R. de 0,8 MHz de frequência, nas potências de 0,0 W/cm², 0,5 W/cm², 1,0 W/cm² e 1,5 W/cm². As aplicações foram diárias, com 10 minutos de duração cada, cinco vezes por semana e por duas semanas consecutivas. O cabeçote fixo foi colocado sobre a face medial do joelho direito, segundo o método da bexiga d'água de Buchtala,⁷ previamente tricotomizado.

O grupo controle G1 foi submetido à anestesia, o cabeçote foi aplicado, permanecendo o aparelho desligado.

Dez animais de cada grupo foram escolhidos por sorteio, para sacrifício, nos seguintes momentos do experimento: M2 - seis semanas de vida (dia seguinte após a 10ª. aplicação do ultra-som),

M3 - com 13 semanas de vida e, M4 - com 26 semanas de vida. Não foram tomadas amostras em M1, dia da primeira aplicação do ultra-som.

Em cada um destes momentos, de cada animal sacrificado, foram extraídos o fêmur e a tíbia, dos lados direito e esquerdo e estabelecido seus comprimentos com paquímetro, em centésimos de milímetros. Os resultados dos grupos tratados foram comparados individualmente com o grupo controle e entre si e, o lado direito comparado ao esquerdo.

Após as medidas de comprimento as peças foram fixadas em formol, descalcificadas (solução de Bouin) e elaboradas lâminas, coradas pelo método de Mason, para exame histopatológico. Os cortes histológicos foram preparados de maneira a possibilitar a visualização das metáfises, placas epifisárias e epífises, distal do fêmur e proximal da tíbia (Figura 1), e o disco epifisial foi investigado procurando-se lesões histológicas.

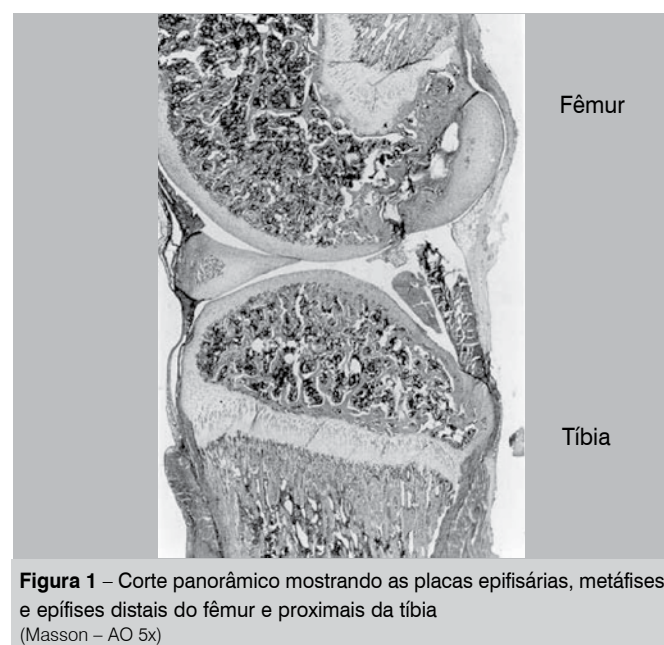


Figura 1 – Corte panorâmico mostrando as placas epifisárias, metáfises e epífises distais do fêmur e proximais da tíbia (Masson – AO 5x)

Método estatístico

O estudo dos comprimentos ósseos longitudinais do fêmur e do conjunto fêmur-tíbia no lado direito foi realizado em cada momento comparando-se cada grupo com todos os demais, sendo submetidos à verificação estatística pela análise de variância – fatorial inteiramente aleatorizado – Snedecor e Cochran²³ testando as hipóteses de efeito de grupo para o conjunto dos momentos e efeito de grupo em cada momento. A mesma análise estatística foi utilizada para comparar os lados direito e esquerdo onde, fixando-se o grupo, verificou-se as diferenças entre os momentos. Em todas as conclusões o nível de significância considerado foi de 5%.

RESULTADO

Aspectos clínicos gerais

Em 14 animais do grupo G4 (1,5 W/cm²) encontramos a ocorrência de hiperemia e úlceras de pele, e em um destes animais necrose da musculatura, da cápsula articular e ligamentos, com subluxação do joelho, necrose e reabsorção ósseas. Em seis animais do grupo G3 (1,0 W/cm²) encontramos claudicação, hiperemia e discreto edema no joelho direito. Nenhuma alteração clínica foi encontrada nos animais do grupo G2 (0,5 W/cm²) e G1 (controle).

ASPECTOS HISTOLÓGICOS

Não encontramos nos animais dos grupos G1, G2 e G3 alterações microscópicas que pudessem ser consideradas patológicas.

Foram encontradas em animais de todos os grupos, no lado direito (tratado), (mas também no lado esquerdo e no grupo G1 não submetidos ao ultra-som) e em todos os momentos áreas de hemorragia óssea e proliferação celular (Figuras 2 e 3), irregularidades e lacunas na zona de proliferação da placa epifisária, desarranjo na disposição em paliçada dos condrócitos e neoformação óssea (Figura 4), semelhantes aos descritos por De Forest *et al.*⁸ e Ito⁹ que as consideraram patológicas.

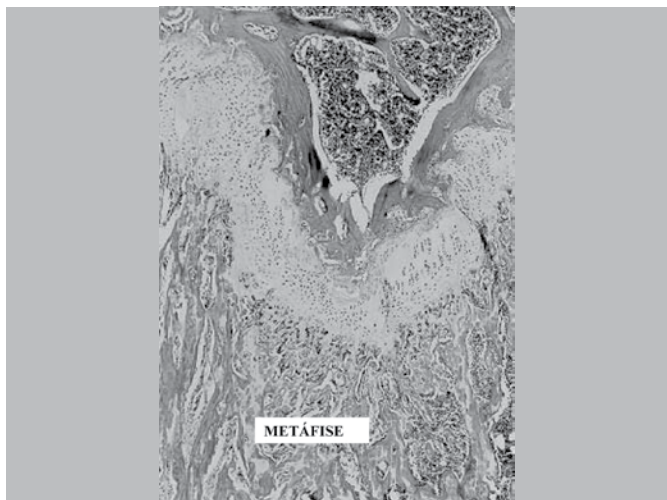


Figura 2 – Grupo G1 (controle) – M3 – placa epifisária: áreas acelulares, hiper-celulares, focos de hemorragia e irregularidades na disposição em paliçada. (Masson AO 13,2x)

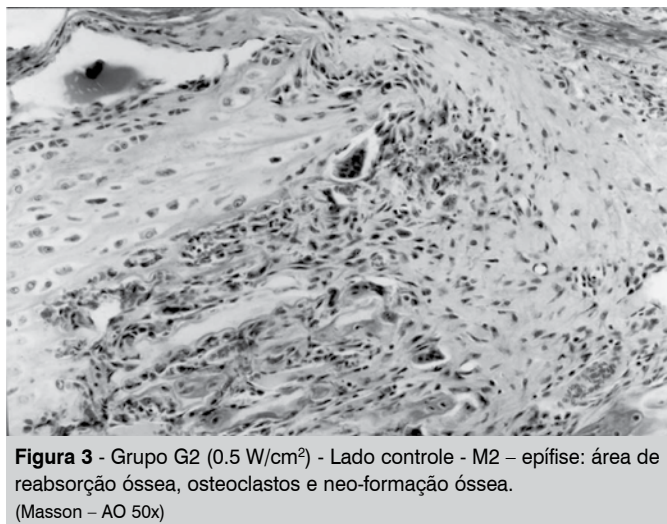


Figura 3 - Grupo G2 (0.5 W/cm²) - Lado controle - M2 – epífise: área de reabsorção óssea, osteoclastos e neo-formação óssea. (Masson – AO 50x)

No grupo G4, em M2, foi observado no lado tratado a presença de necrose óssea, tecido de granulação, neutrófilos e neoformação óssea de regeneração (Figura 5), notando-se uma ou mais destas alterações em quase todos os animais. Embora neoformação óssea fosse, também, encontrado no lado esquerdo, no lado direito observou-se neoformação óssea de regeneração pós-necrose óssea. Em um animal observou-se destruição da epífise, placa epifisária e metáfise da tíbia, tecido de granulação e grande quantidade de neutrófilos.

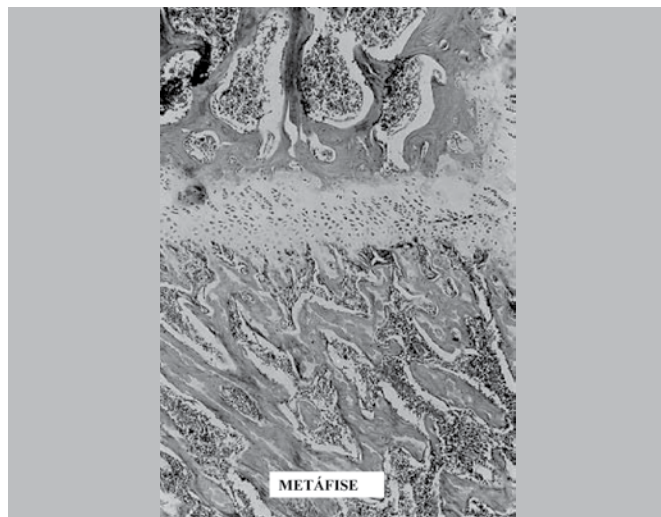


Figura 4 - Grupo G2 (0,5 W/cm²) – lado esquerdo – M3 – placa epifisária: desarranjo na zona de proliferação. Focos de hemorragia na medular. (Masson - AO 20x)

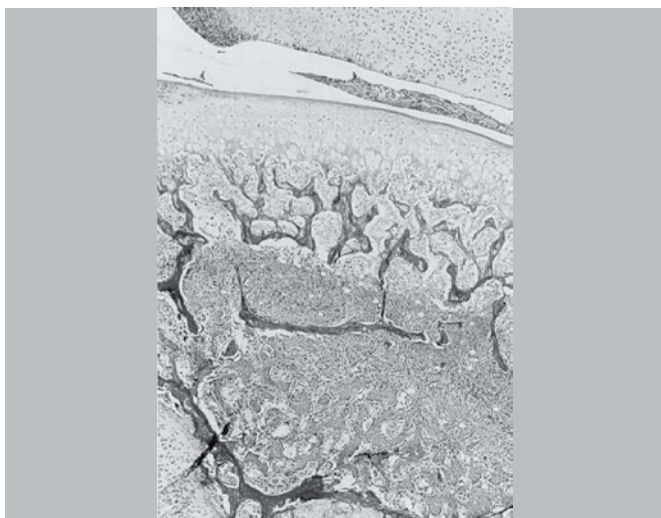


Figura 5 – Grupo G4 (1,5 W/cm²) – lado direito – M2 – epífise: neoformação óssea de regeneração e neutrófilos. (Masson – AO 10x)

Em geral, a placa epifisária metáfise e epífise tanto do fêmur quanto da tíbia, apresentavam-se histologicamente normais, exceto em animais do grupo G4 e em menor grau do grupo G3.

Comprimento ósseo:

No grupo de animais submetidos a 1,5 W/cm² (G4) houve tendência estatística a um menor crescimento do fêmur em relação aos grupos tratados G2 e G3, mas não em relação ao grupo controle G1. (Tabela 2) Quando a tíbia foi incluída na medida o comportamento estatístico foi semelhante. (Tabela 3)

Na comparação entre os lados direito e esquerdo do fêmur (Tabela 4) vemos que em G2 houve crescimento maior do lado direito por tempo determinado. Em G3 não houve diferença ao longo do tempo. Em G4 houve, inicialmente, um crescimento menor do lado direito, parcialmente compensado em M4. Quando a medida da tíbia é incluída (Tabela 5) notamos o mesmo comportamento anterior para os grupos em G2 e G4, mas em G3 notamos, em M4, que o lado direito é significativamente maior do que o lado esquerdo.

Tabela 2. Comprimento do fêmur - Análise de variância - Fatorial inteiramente aleatorizado.

Hipóteses testadas	Estatísticas calculadas	Comentários
H02: Efeito de grupo para o conjunto dos momentos	F crit = 2,71 F calc = 6,47	G2 = G3) > G4 G1 não difere dos demais
H04: Efeito de grupo em cada momento	dms = 312	M2: G1 = G2 = G3 = G4 M4: (G2 = G3) > G4 G1 não difere dos demais

F crítico (F crit), F calculado (F calc), diferença mínima significativa (dms).

Tabela 3. Comprimento do membro - Análise de variância - Fatorial inteiramente aleatorizado.

Hipóteses testadas	Estatísticas calculadas	Comentários
H02: Efeito de grupo para o conjunto dos momentos	F crit = 2,71 F calc = 7,68	G2 = G3) > G4 G1 não difere dos demais
H04: Efeito de grupo em cada momento	dms = 572	M2: G1 = G2 = G3 = G4 M3: G3 > G4 única diferença M4: (G2 = G3) > G4 G1 não difere dos demais

F crítico (F crit), F calculado (F calc), diferença mínima significativa (dms).

DISCUSSÃO

A incidência de complicações clínicas no joelho encontradas em G3 (1,0 W/cm²) e G4 (1,5 W/cm²) foi semelhante aos achados de Buchtala⁷ e Ito⁹ que aplicaram o ultra-som em potências de 2,0 W/cm² ou mais.

A ocorrência de algumas das alterações descritas na literatura, tais como: necrose, reabsorção, periostite, proliferação e rarefação ósseas; fechamento da placa epifisária e separação da epífise; diminuição e aumento de osteoblastos e osteoclastos; como observado por Buchtala⁷, De Forest *et al.*⁸ e Ito⁹, foram encontradas neste trabalho somente no grupo tratado com 1,5 W/cm² (G4) e possibilita a conclusão que estes efeitos são relacionados à potência como sugerido por Lehmann.³⁻¹⁰, embora não seja observado utilizando potências iguais ou abaixo de 0,77 W/cm².¹⁸⁻²⁰

Como muitas das descrições histológicas consideradas patológicas pela literatura foram encontradas em nosso trabalho, tanto no lado direito quanto no lado esquerdo (não tratado) e também no grupo controle não submetido ao ultra-som, sugerimos que alguns achados histológicos dos trabalhos da literatura, mais do que alterações patológicas sejam produtos das técnicas de obtenção das peças e confecção de lâminas e/ou representem diferentes aspectos da normalidade.

Com base na análise estatística conclui-se que o ultra-som não provocou efeito de inibição ou de estímulo ao crescimento ósseo

Tabela 4. Comprimento do fêmur - comparação entre lados direito e esquerdo.

Hipóteses testadas	Estatísticas calculadas	Comentários	
Diferença entre lados direito e esquerdo	G2	M2: t = 0,52p > 0,50	direito = esquerdo
		M3: t = 3,00 p < 0,01	direito > esquerdo
	G3	M4: t = 0,13p > 0,50	direito = esquerdo
		M2: t = 1,66p > 0,10	direito = esquerdo
	G3	M3: t = 1,07p > 0,30	direito = esquerdo
		M4: t = 0,43 p > 0,50	direito = esquerdo
	G4	M2: t = 3,09p < 0,01	direito < esquerdo
		M3: t = 1,29 p > 0,20	direito = esquerdo
		M4: t = 1,91 0,05 < p < 0,10	direito < esquerdo

Tabela 5. Comprimento do membro - comparação entre os lados direito e esquerdo.

Hipóteses testadas	Estatísticas calculadas	Comentários	
Diferença entre lados direito e esquerdo	G2	M2: t = 0,59 p > 0,50	direito = esquerdo
		M3: t = 2,66 p < 0,05	direito > esquerdo
	G3	M4: t = 1,15 p > 0,20	direito = esquerdo
		M2: t = 0,99 p > 0,30	direito = esquerdo
	G3	M3: t = 1,47 p > 0,10	direito = esquerdo
		M4: t = 2,42 p > 0,05	direito > esquerdo
	G4	M2: t = 6,45 p < 0,001	direito = esquerdo
		M3: t = 1,29 p > 1,15	direito < esquerdo
		M4: t = 1,96 0,005 < p < 0,10	direito < = esquerdo (tendência)

do fêmur ou da tíbia, em relação ao grupo controle. Entretanto G4 (1,5 W/cm²), em M4, foi significativamente menor do que G2 (0,5 W/cm²) e G3 (1,0 W/cm²), sugerindo um efeito inibitório ao crescimento em G4 e/ou de estímulo em G2 e G3.

Quando comparamos o lado tratado ao não tratado notamos em G2, tanto para o fêmur quanto para o membro, uma diferença maior do lado direito em M3, que desaparece em M4, sugerindo um estímulo, temporário, ao crescimento ósseo (Tabelas 4 e 5). Em G4 o lado direito foi menor que o esquerdo em M2, compensado parcialmente em M4. Em G3, ao final do experimento em M4, o membro direito é estatisticamente maior do que o esquerdo (Tabela 5), sugerindo um estímulo ao crescimento.

CONCLUSÃO

Nenhuma alteração estatística significativa foi observada, ao final do experimento, que pudesse determinar efeito de inibição ou estímulo ao crescimento ósseo do fêmur ou do membro entre os grupos tratado e o grupo controle.

Poder-se-ia considerar que, ao comparar os grupos de 0,5 e 1,0 W/cm² com o grupo de 1,5 W/cm², haja tendência de estímulo ao crescimento do fêmur nos dois primeiros grupos e/ou inibição no último grupo, mas este efeito não foi, em relação ao grupo controle, significativo. Mais estudos são necessários para melhores conclusões.

REFERÊNCIAS

1. Lehmann JF, DeLateur BJ, Silverman DR. Selective heating effects of ultrasound in human beings. *Arch Phys Med Rehabil.* 1966;47:331-9.
2. Lehmann JF, DeLateur BJ, Warren CG, Stonebridge JS. Heating produced by ultrasound in bone and soft tissue. *Arch Phys Med Rehabil.* 1967;48(8):397-401.
3. Wells PN. Ultrasonics in medicine and biology. *Phys Med Biol.* 1977;22(4):629-69.
4. ter Haar G. Therapeutic ultrasound. *Eur J Ultrasound.* 1999;9(1):3-9.
5. ter Haar G. Therapeutic applications of ultrasound. *Prog Biophys Mol Biol.* 2007;93(1-3):111-29.
6. Leighton TG. What is ultrasound? *Prog Biophys Mol Biol.* 2007;93(1-3):3-83.
7. Buchtala V. The present state of ultrasonic therapy. *Br J Phys Med.* 1952;15(1):3-6.
8. De Forest RE, Herrick JF, Janes JM, Krusen FH. Effects of ultrasound on growing bone; an experimental study. *Arch Phys Med Rehabil.* 1953;34(1):21-31.
9. Ito S. Study on ultrasonic irradiation in orthopedic surgery. *Hirosaki Med J.* 1964;16:242-60.
10. Lehmann JF, De Lauter, BJ. Diatermia e calor superficial, laser e crioterapia. In: Kottke FJ, Lehmann JF, Tratado de medicina física e reabilitação de Krusen. 4a ed. São Paulo: Manole; 1994. p. 277-356.
11. Goddard DH, Revell PA, Cason J, Gallagher S, Currey HL. Ultrasound has no anti-inflammatory effect. *Ann Rheum Dis.* 1983;42(5):582-4.
12. Dyson M, Pond JB. The effects of ultrasound on circulation. *Physiotherapy.* 1973;59(9):284-7.
13. Dyson M, Franks C, Suckling J. Stimulation of healing of varicose ulcers by ultrasound. *Ultrasonics.* 1976;14(5):232-6.
14. Gan BS, Huys S, Sherebrin MH, Scilley CG. The effects of ultrasound treatment on flexor tendon healing in the chicken limb. *J Hand Surg Br.* 1995;20(6):809-14.
15. Duarte LR. The stimulation of bone growth by ultrasound. *Arch Orthop Trauma Surg.* 1983;101(3):153-9.
16. Gebauer D, Correll J. Pulsed low-intensity ultrasound: a new salvage procedure for delayed unions and nonunions after leg lengthening in children. *J Pediatr Orthop.* 2005;25(6):750-4.
17. Schortinghuis J, Bronckers AL, Stegenga B, Raghoobar GM, de Bont LG. Ultrasound to stimulate early bone formation in a distraction gap: a double blind randomised clinical pilot trial in the edentulous mandible. *Arch Oral Biol.* 2005;50(4):411-20.
18. Wiltink A, Nijweide PJ, Oosterbaan WA, Hekkenberg RT, Helders PJ. Effect of therapeutic ultrasound on endochondral ossification. *Ultrasound Med Biol.* 1995;21(1):121-7.
19. Ogurtan Z, Celik I, Izci C, Boydak M, Alkan F, Yilmaz K. Effect of experimental therapeutic ultrasound on the distal antebrachial growth plates in one-month-old rabbits. *Vet J.* 2002;164(3):280-7.
20. Lyon R, Liu XC, Meier J. The effects of therapeutic vs. high-intensity ultrasound on the rabbit growth plate. *J Orthop Res.* 2003;21(5):865-71.
21. Kember NF. Aspects of the maturation process in growth cartilage in the rat tibia. *Clin Orthop Relat Res.* 1973;(95):288-94.
22. Brighton CT. Structure and function of the growth plate. *Clin Orthop Relat Res.* 1978;(136):22-32.
23. Snedecor GW, Cochran WG. Statistical methods. 7th ed. Ames: The Iowa State University; 1980.