Andrezza Furquim da Cruz

**ESTUDO DOS EFEITOS DA IRRADIAÇÃO
ULTRASÔNICA PULSADA DE BAIXA INTENSIDADE
SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE SEGMENTOS DE
COLUNA VERTEBRAL IMPLANTADOS EM
CAMUNDONGOS ISOGÊNICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia Interunidades - Escola de Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Bioengenharia.

Orientador: Prof. Dr. Affonso Luiz Ferreira

**SÃO CARLOS
2005**

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais **Antônio Carlos** e **Neuza**, pela vida, por
todo amor e dedicação, mas principalmente pela
oportunidade de cumprir mais esta etapa da minha vida.*

*Aos meus irmãos **Karina** e **Marcelo**, pela compreensão,
incentivo, carinho e amor.*

*À minhas avós, **Clyde** e **Edina**, por todas as orações e
sabedoria.*

*Às minhas amigas, **Ana Paula** e **Sílvia**, por acreditarem
em mim, pelo estímulo, amor, carinho e compreensão.*

AGRADECIMENTO ESPECIAL

*Agradeço de forma especial meu orientador, **Prof. Dr. Affonso Luiz Ferreira**, pelo incentivo, confiança, ensinamentos competência e orientação durante a execução deste trabalho.*

“Pelo que vi não há coisa melhor do que alegrar-se o homem nas suas obras, porque essa é a recompensa; quem o fará voltar para ver o que será depois dele?”

Eclesiastes 3:22

AGRADECIMENTOS

À CAPES pelo suporte financeiro concedido.

Ao Centro Universitário Barão de Mauá de Ribeirão Preto pelo espaço cedido para realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. José Carlos Pereira e ao César pela orientação e correção dos testes estatísticos aplicados nos experimentos.

Ao Prof. Dr. Orivaldo Lopes da Silva pelas proveitosas sugestões referentes ao capítulo do Ultra-som.

Aos Profs. Drs. José Marcos Alves, Orivaldo Lopes Silva, José Carlos Pereira, pelos preciosos ensinamentos de exatas para nós biólogos.

Aos funcionários da Bioengenharia de São Carlos, Mário Gazziro, responsável pela manutenção do aparelho de ultra-som, e em especial à Janete Ferreira Rodrigues dos Santos, secretária do Programa, sempre prestativa e dedicada.

Ao José Luiz de Souza, histotécnico do Centro Universitário Barão de Mauá de Ribeirão Preto, pelo preparo de todo o material histológico.

Ao amigo Rubilan Quionero, bioterista do Centro Universitário Barão de Mauá de Ribeirão Preto, pelo auxílio e cuidados com os animais de experimentação.

Aos técnicos de laboratório do Centro Universitário Barão de Mauá, Aristeu Costa e Márcio Rodrigues, pelo auxílio de esterilização do material utilizado.

À Márcia, técnica dos laboratórios de microscopia do Departamento de Morfologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pelo auxílio na aquisição das fotografias dos cortes histológicos pelo sistema do Axiophot.

*À colega de Pós-Graduação **Luisiane Ávila Santana**, pelo fornecimento e ajuda com o Programa ImageJ-NHI, USA, utilizado nas análises morfológicas.*

*À amiga **Alessandra Janetti Oliveira Valentin**, pela ajuda com o “abstract”.*

*A **Gracie Luiza da Silva**, pelo exemplo de força, dedicação e principalmente pela nossa amizade.*

*À amiga **Aninha Masson**, pelas broncas, pelo carinho, pela ajuda na obtenção de alguns artigos, mas acima de tudo pela amizade.*

*À grande amiga “**Pi**”, por cada valioso momento que passamos juntas durante esses poucos 15 anos de convívio e amizade, por cada semente plantada, por cada ramo crescido, pelas flores que ainda cultivamos e pelos frutos que estaremos sempre colhendo.*

*À minha “Tatinha” **Sílvia Helena Chinarelli Reche**, por todo carinho, amor, amizade e compreensão desprendidos a mim durante as várias fases dessa caminhada.*

*À **Thaís, Ivani, Aveliny, Maria Eugênia** porque “Cada novo amigo que ganhamos no decorrer da vida aperfeiçoa-nos e enriquece-nos, não tanto pelo que nos dá, mas pelo que nos revela de nós mesmos”.*

A todos que de alguma forma colaboraram com este trabalho,

MUITO OBRIGADA!!!

“... E você aprende que realmente pode suportar... Que realmente é forte, e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais. E que realmente a vida tem valor e que você tem valor diante da vida!”

Sir William Shakespeare

RESUMO

CRUZ, A.F. (2005). *Estudo dos efeitos da irradiação ultra-sônica pulsada de baixa intensidade sobre o desenvolvimento de segmentos de coluna vertebral implantados em camundongos isogênicos*. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

A presente pesquisa teve como objetivo avaliar a ação da irradiação ultra-sônica pulsada de baixa intensidade sobre o desenvolvimento e ossificação de blastemas da coluna vertebral, mediante implantes de segmentos de cauda de camundongos recém-nascidos em camundongos adultos receptores isogênicos das linhagens C57BL/6 e Balb/C. Segmentos de cauda de animais recém-nascidos eram implantados na tela subcutânea de camundongos adultos isogênicos C57BL/6 e intramuscularmente em camundongos adultos isogênicos Balb/C. Após 24 horas do implante, os animais de ambos os grupos, foram estimulados com o ultra-som pulsado de baixa intensidade (U.S.P.), 10 minutos por dia. Após 5 dias de estímulos, os animais receptores foram mortos e tiveram as caudas implantadas retiradas para análise histopatológica, mediante as colorações de Ácido Periódico e Reativo de Schiff associado ao azul de Alcian (PAS/AB), Tricrômico de Masson e Hemalumen-Eosina (HE). O grupo de animais estimulados e que recebeu implante subcutâneo apresentou o implante com desenvolvimento acelerado dos discos intervertebrais face aos achados de organização dos condrócitos e condroblastos na matriz cartilaginosa, mostrando maturidade na formação das fibrocartilagens. Observou-se também um aumento das fibras colágenas na fibrocartilagem dos discos as quais se mostravam mais espessas próximas ao núcleo pulposo, nos segmentos implantados e estimulados, em relação aos segmentos controles. As áreas dos segmentos foram analisadas pelo teste de Fisher e pelo teste t de Student. Não foram observadas diferenças significativas nos tamanhos das áreas dos corpos vertebrais nos animais cujo implante foi subcutâneo ($p \leq 0,05$). No grupo de animais que sofreram implantes intramusculares, observou-se uma maior velocidade na formação da matriz de ácido hialurônico do disco intervertebral após o estímulo com o U.S.P. Observou-se também que as fibrocartilagens dos anéis fibrosos estavam mais bem organizadas com maior número de células na matriz cartilaginosa, comparados aos segmentos dos controles. Em relação aos corpos vertebrais dos implantes intramusculares, não constatou-se aumento significativo em suas áreas ($p \leq 0,05$). Os achados permitem concluir que o U.S.P. promoveria a diferenciação ontogenética dos constituintes estruturais da coluna vertebral de camundongos mais rapidamente, mediante avaliação microscópica da ossificação endocondral das vértebras e a diferenciação dos componentes dos discos intervertebrais, segundo a metodologia empregada.

Palavras-chaves: ossificação endocondral, ultra-som pulsado de baixa intensidade.

ABSTRACT

CRUZ, A.F. (2005). *Low- intensity pulsed ultrasonic irradiation effects on development of vertebral column segments implanted in isogenics mice*. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

The aim of the present research was evaluate the action of low-intensity pulsed ultrasonic irradiation on development and ossification of vertebral column blastemas, through mice new born tail segments implants in adult receptor isogenic mice lineages C57BL/6 and Balb/C. New born tail segments were implanted in subcutaneous tissue of adults isogenics mice C57BL/6 and intramuscularly in adults isogenics mice Balb/C. After 24 hours the implant, the animals in both groups, were stimulated with the low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS), 10 minutes per day. After 5 days of stimulus, the receptors animals were death and had the implanted tails removed for histopathology, through Periodic Acid Schiff plus Alcian Blue (PAS/AB), Masson's tricromico and hem lumen-eosin (HE). The group of animals stimulated which received subcutaneous implant presented the implant with accelerated in inter-vertebral disks, faces to chondrocytes organization and chondroblastes findings in cartilaginous matrix, showing maturity in fiber cartilages arrangements. It was observed too, a collagen fibers enlargement in the disks fibro cartilage which show more dense next the pulposus nucleus in the segments implanted and stimulated, compared with the controls segments. The areas of the segments were available by Fisher's test and Student's t. It didn't watch significant differences in the vertebral bodies' areas sizes in the animals which implant was subcutaneous ($p \leq 0.05$). In the intramuscular implants animals group, it was observed a major velocity in the hialuronic acid matrix formation in the inter-vertebral disks after LIPUS stimulus. Moreover, the fibrous ring fiber cartilages' were better organized with large number of cells inside the cartilaginous matrix compared with the controls segments. With regard to the vertebral bodies in the intramuscular implants, it's not verifies significant increases in the areas ($p \leq 0.05$). The findings allow conclude that LIPUS should promote the ontogenetic differentiation of the structural components of the mice vertebral column more quickly, through vertebrae endochondral ossification microscopic evaluation and the inter-vertebral disks components differentiation, follow the methodology employed.

Keywords: endochondral ossification; low-intensity pulsed ultrasound.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.	Modelo de propagação de ondas ultra-sônicas	24
FIGURA 2.	Propagação de uma onda acústica longitudinal	24
FIGURA 3.	Em “A” representação de uma onda em função da distância e em B, representação de uma onda em função do tempo.	26
FIGURA 4.	Reflexão e refração do ultra-som.	29
FIGURA 5.	Balança de força de Radiação.	35
FIGURA 6.	Dosímetros baseados em força de radiação.	36
FIGURA 7.	Sinais elétricos de excitação de transdutores piezelétricos.	37
FIGURA 8.	Variação da intensidade ultra-sônica no espaço.	38
FIGURA 9.	Variação da intensidade ultra-sônica no tempo.	38
FIGURA 10.	Esquemas ilustrando ossificação endocondral e o desenvolvimento de um osso longo típico.	44
FIGURA 11.	Reabsorção e formação óssea.	46
FIGURA 12.	Desenhos ilustrando os estádios do desenvolvimento vertebral.	49
FIGURA 13.	Possível mecanismo de sinalização das BMPs através de receptores de BMP e <i>Smads</i>	53
FIGURA 14.	Interação da sinalização de BMP e <i>lhh</i>	56
FIGURA 15.	Expressão do FGF.	57
FIGURA 16.	Ultra-som pulsado de baixa intensidade.	62
FIGURA 17.	Grupo de animais utilizados no experimento.	64
FIGURA 18.	Materiais cirúrgicos e anestésicos.	65

FIGURA 19.	Aplicação do ultra-som pulsado de baixa intensidade.....	67
FIGURA 20.	Resumo esquemático do procedimento experimental.....	69
FIGURA 21.	Marcação das áreas pelo programa ImageJ 1,33m.	71
FIGURA 22.	Implantes de cauda de recém-nascidos no subcutâneo do receptor adulto.	73
FIGURA 23.	Caudas de recém-nascidos implantadas no subcutâneo de camundongos adultos.	74
FIGURA 24.	Implante de cauda de camundongo recém-nascido no músculo glúteo maior do camundongo adulto.	76
FIGURA 25.	Caudas implantadas no músculo de camundongo adulto.	77
FIGURA 26.	Representação gráfica das médias das áreas relativas aos corpos vertebrais.	79
FIGURA 27.	Representação gráfica das médias das áreas relativas aos centros de ossificação interno dos corpos vertebrais.	80
FIGURA 28.	Representação gráfica das médias das áreas relativas aos discos intervertebrais.	81
FIGURA 29.	Representação gráfica das médias das áreas relativas aos núcleos pulposos.	83
FIGURA 30.	Representação gráfica das médias das áreas relativas aos anéis fibrosos.	84

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.	Coeficiente de atenuação para a frequência de 1 MHz em diferentes tecidos (Wells, 1997).	28
TABELA 2.	Coeficiente de atenuação para frequência de 1,5 MHz (Ziskin, 1989).	28
TABELA 3.	Propriedades acústicas típicas em vários meios. (Young, 1990).	30
TABELA 4.	Intensidades ultra-sônicas típicas em aplicações médicas (Ziskin, 1989).	39
TABELA 5.	Etapas na ossificação endocondral (Gartner & Hiatt, 2000).	47
TABELA 6.	Funções das BMPs envolvidas na condrogênese e ossificação. (Campos Jr, 2004).	54
TABELA 7.	Parâmetros físicos do ultra-som.	61
TABELA 8.	Valores descritivos das áreas relativas aos corpos vertebrais em mm ²	78
TABELA 9.	Valores descritivos das áreas relativas aos centros de ossificação em mm ²	80
TABELA 10.	Valores descritivos das áreas relativas aos discos intervertebrais em mm ²	81
TABELA 11.	Valores descritivos das áreas relativas aos núcleos pulposos em mm ²	82
TABELA 12.	Valores descritivos das áreas relativas aos anéis fibrosos em mm ²	83

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACES

ATDC5	Linhagem de células carcinognicas de embriões de ratos
ATP	Adenosina tri-fosfato
BALB/C	Linhagem de camundongo isogênico branco
BMP	Proteína morfogenética do osso
C57BL/6	Linhagens de camundongos isogênicos preto
Cbfa1	Fator ligante do core
CC/OC	Complexo “cartilagem calcificada / osso calcificado”
CDMP-1	Proteínas morfogenéticas derivadas da cartilagem
EUA	Estados Unidos da América
FGF	Fator de crescimento do fibroblasto
FGFR	Receptores do Fator de crescimento do fibroblasto
GTPase	Enzimas lticas da Guanina Tri-Fosfato
HE	Coloração de Hematoxilina e Eosina
HUVEC	Células endoteliais de umbigo humano
Ihh	Membro da família “Hedgehog” Indiano expresso na superfície celular de células pré-mitóticas e pr-hipertrofcas
IL-1	Interleucina-1
N-CAM	Gene codificador da N-caderina
PA	Média do pulso
PAS/AB	Coloração de cido Perdico e Reativo de Schiff associada  coloração de Azul de Alcian (Alcian Blue)
PDGF-AB	Fator de crescimento derivado das plaquetas
PEBP[alfa]/C bfa1	Fator de transcrição do Cbfa1
PTH	Paratormônio
PTHrP	Proteína relacionada ao paratormônio
PZT	Zirconato titanato de chumbo
RNA _m	cido Ribonucléico Mensageiro
SA	Valor médio do campo ultra-sônico no espaço

SaOS-2	Linhagem de células osteoblásticas
SATA	Intensidade Média espacial – média temporal
SOX9	Gene que codifica a proteína ligante do DNA
SP	Valor de pico do campo ultra-sônico no espaço
SPPA	Intensidade pico – média do pulso
SPTA	Intensidade pico espacial – média temporal
SPTP	Intensidade pico espacial – pico temporal
TA	Média temporal de variação do campo elétrico
TGF- β	Fator beta de transformação do crescimento
TM	Coloração de Tricrômico de Masson
TNF	Fator de necrose tumoral
TP	Pico temporal de variação do campo elétrico
USP	Universidade de São Paulo
U.S.P.	Ultra-som Pulsado de Baixa Intensidade
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial

LISTA DE SÍMBOLOS

$[1,25-(\text{OH})_2 \text{D}_3]$	1,25-dihidroxi-vitamina D_3
kHz	Quilohertz
λ	Comprimento de onda
T	Período
A	Amplitude
P	Potência
W	Watt (unidade de Potência)
f	Frequência
c	Velocidade do som
m/s	Metros por segundo (unidade de velocidade)
t	Tempo
I	Intensidade
W/cm^2	Watt por centímetro quadrado (unidade de intensidade)
α	Coeficiente de atenuação da onda
P_{ref}	Potência de referência
db/cm^2	Decibéis por centímetro quadrado (unidade de Atenuação)
MHz	Megahertz
Z	Impedância acústica
g/mL	Gramas por mililitro
$10^6 \text{Kg}^{-2} \text{ms}^{-1}$	Unidade de impedância
H^+	Íon hidrogênio
OH^-	Íon hidroxila
F_{rad}	Força de Radiação
$\mu\text{N/mW}$	MicroNewtons por miliWatts (unidade de força de radiação)
V	Volt (unidade de amplitude)
cm	Centímetro
μs	Micro segundos

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVOS	20
3. REVISÃO DA LITERATURA	22
3.1. O Ultra-som	22
3.1.1. Características das ondas ultra-sônicas	25
3.1.1.1. Comprimento de onda	25
3.1.1.2. Período	25
3.1.1.3. Amplitude	25
3.1.1.4. Potência	25
3.1.1.5. Frequência	25
3.1.1.6. Velocidade do som	26
3.1.1.7. Intensidade.....	27
3.1.1.8. Atenuação.....	27
3.1.1.9. Tempo de irradiação.....	28
3.1.1.10. Impedância acústica.....	29
3.1.2. Transdutores.....	31
3.1.3. Mecanismos de interação do ultra-som com células e tecidos biológicos.....	31
3.1.3.1. Cavitação.....	32
3.1.3.2. Microfluxo acústico.....	33
3.1.3.3. Piezeletricidade.....	33
3.1.4. Dosimetria.....	34
3.2. Ossificação Endocondral.....	40
3.2.1. Ossificação endocondral de uma vertebral típica	48
3.2.2. Fatores envolvidos no processo de ossificação endocondral	50
3.2.3. Fatores envolvidos na regulação da condrogênese e ossificação endocondral – BMP, FGFRs, Cbfa1	51
3.2.3.1. Proteínas Morfogenéticas do osso	51
3.2.3.2. Proteínas ligantes relacionadas ao paratormônio (PTHrP) e “ <i>indian hedgehog</i> ” (Ihh)	55
3.2.3.3. Fator de crescimento do fibroblasto (FGFs) e receptores (FGFRs)	57
3.2.3.4. Cbfa1 (OMIM600211)	59

4. MATERIAL E MÉTODOS	61
4.1. Material	61
4.1.1. O equipamento de ultra-som.....	61
4.1.2. Animais de experimentação.....	62
4.2. Procedimentos experimentais.....	64
4.2.1. Esterilização dos materiais cirúrgicos.....	64
4.2.2. Técnicas de Implantes.....	65
4.2.2.1. Implantes subcutâneos.....	66
4.2.2.2. Implantes intramusculares.....	66
4.2.3. Aplicações do U.S.P.....	67
4.2.4. Morte dos animais e coleta do material.....	68
4.2.5. Análise Histopatológica.....	68
4.2.6. Avaliação microscópica e Estatística dos implantes.....	70
5. RESULTADOS.....	72
6. DISCUSSÃO.....	85
7. CONCLUSÃO.....	92
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93
APÊNDICE.....	106
ANEXO A.....	114
ANEXO B.....	116
ANEXO C.....	118
ANEXO D.....	129

1. INTRODUÇÃO

O ultra-som, uma forma de energia mecânica que é transmitida em tecidos biológicos como uma onda de pressão acústica abaixo da percepção auditiva humana, é usado extensamente na medicina como uma ferramenta terapêutica, operativa ou diagnóstica.

As primeiras aplicações do ultra-som deram-se em 1917, durante a Primeira Grande Guerra, quando Chilowsky e Langevin criaram dispositivos sonares para detectar submarinos.

Os anos de 1920 e 1930 foram muito importantes na compreensão da capacidade do ultra-som produzir mudanças nos sistemas os quais a energia era direcionada. Desde então, muitas pesquisas com a finalidade de avaliar os efeitos biológicos causados pelo ultra-som, têm ocupado a atenção de investigadores, parte devido ao interesse nas aplicações do ultra-som em biotecnologia e terapia médica, parte devido à necessidade de segurança nas aplicações médicas onde é utilizado, principalmente no que diz respeito aos seus mecanismos físicos (NYBORG, 2000).

O uso do ultra-som pulsado de baixa intensidade (U.S.P.) no reparo ósseo se deu em 1977, no Brasil, a partir da tese de livre docência do Prof. Dr. Luiz Romariz Duarte intitulada *“Estimulação Ultra-Sônica do Calo Ósseo”*, no Departamento de Engenharia de Materiais da Escola de Engenharia de São Carlos – Universidade de São Paulo (USP), sendo suas primeiras aplicações no homem, foram realizadas no Departamento de Cirurgia, Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, em casos clínicos de pseudo-artroses.

DUARTE (1977, 1983), foi o primeiro a demonstrar a ação do U.S.P no reparo de fraturas induzidas em tecido ósseo de coelhos. Para tanto, foram realizados dois estudos. No primeiro realizou-se uma osteotomia bilateral da tíbia e no segundo um defeito bilateral em forma de furo na cortical do fêmur, e foi estabelecido ainda, um grupo controle para cada grupo tratado com o U.S.P., comprovando, por meio de análises radiográficas e histológicas, uma diferença significativa sobre a osteogênese nos dois experimentos.

A partir daí, novos trabalhos utilizando outros modelos animais foram desenvolvidos demonstrando a resposta óssea ao U.S.P., incluindo a promoção de expressão de genes específicos da cartilagem e aumento do padrão de ossificação endocondral (KRISTIANSEN et al., 1997).

O conceito do uso de estimulação biofísica a nível celular, para modular a formação e reparo de tecidos não é novo. O campo eletromagnético pulsado, utilizado para promover a consolidação de pseudo-artroses, pode influenciar a formação da cartilagem e da matriz extracelular durante o processo de formação do osso endocondral.

A resposta fisiológica do osso às forças mecânicas inclui a formação, deposição e a reabsorção óssea. Como resultado, o ultra-som pulsado de baixa intensidade (U.S.P.), mostrou aumentar a concentração de cálcio compreendido nas culturas de células ósseas e cartilaginosas, e tem um papel na modulação da síntese do fator de transformação do crescimento (TGF- β) e resposta do hormônio paratireoideo (PTH) em células mesenquimatosas e osteoblastos. (RYABY et al, 1989; 1992).

PARVISI et al (1999), demonstraram em condrócitos, que o U.S.P. aumenta a regulação da expressão de proteínas da matriz extracelular e fenótipos de colágenos, precursores da ossificação endocondral.

COOK et al. (2001), avaliaram os efeitos do U.S.P. no reparo de defeitos osteocondrais em coelhos Nova Zelândia. O estudo foi realizado em duas etapas. Na primeira, o efeito do U.S.P. foi avaliado 4, 8, 12, 24 e 52 semanas após a cirurgia, e na segunda, utilizou-se tempos diferentes de tratamento (5, 10 ou 40 minutos por dia), comparando-os com a aplicação convencional de 20

minutos por dia. Um reparo mais rápido com menos mudanças degenerativas foi observado nos defeitos tratados com o ultra-som. Com 40 minutos diários, houve um aumento significativo ($p \leq 0.05$) na qualidade histológica do reparo da cartilagem, mostrando que o U.S.P. tem um efeito significativamente positivo na consolidação de defeitos osteocondrais.

UGLOW et al. (2003), em experimentos com tíbia de coelhos, analisaram a ação do U.S.P. sobre a osteogênese. Neste experimento, não foi identificada nenhuma diferença entre o grupo tratado e o controle, em relação ao conteúdo mineral ósseo, na área de osteotomia experimental, bem como na resistência óssea, constatando que a “modulação” pelo ultra-som pode ocorrer por aceleração da ossificação endocondral mediante sua ação sobre os condrócitos.

Em recente experimento envolvendo a distração da osteogênese, SAKURAKISHI et al (2004), utilizando modelo semelhante ao de UGLOW et al, em tíbia de coelhos, evidenciaram que a ossificação endocondral no grupo que recebeu o tratamento com o U.S.P. ocorreu mais precocemente que a do grupo controle, sugerindo que os efeitos do U.S.P. seja mediado via endocondral, demonstrando que o U.S.P. melhora a osteogênese endocondral na fase inicial do alongamento. Os autores consideram ainda necessários estudos complementares sobre a ação do U.S.P. em casos de “distração” da osteogênese por fixadores rígidos.

COOK (1999), bem antes aos achados de Uglow, simulando defeitos osteocondrais na patela de coelhos, verificou que houve diferenças estatisticamente comprovadas na qualidade de reparo tecidual após o estímulo com o U.S.P. com 4, 8 e 12 semanas e com 4, 12 e 24 semanas de tratamento, evidenciando eficiência positiva do uso do U.S.P. no reparo do osso subcondral.

AZUMA et al (2001), com o objetivo de determinar se U.S.P. teria maior influência em algum estágio específico da consolidação da fratura, investigaram o efeito do tempo de tratamento do U.S.P. em um modelo de fratura bilateral em ratos. Os sítios de fratura foram estimulados em 4 tempos diferentes (dias 1 a 8, dias 9 a 16, dias 17 a 24, e dias 1 a 24), e os animais foram sacrificados no 25º

dia. De forma interessante, verificou-se que a união foi acelerada em cada grupo independentemente do tempo de tratamento. Esses resultados foram confirmados por radiografia, estudos histológicos e medida de resistência mecânica. O torque máximo para se obter fratura no lado tratado foi maior que no lado controle em todos os tempos, sugerindo que, embora a biologia de consolidação da fratura possa ser acelerada, nenhum estágio específico é mais sensível ao U.S.P. que o outro.

NOLTE et al (1999), estudando os efeitos do estímulo com o U.S.P. em um modelo de ossificação endocondral *in vitro*, utilizando metatarsos de fetos de camundongos, verificaram que houve um aumento da diáfise calcificada durante a cultura no grupo tratado com o U.S.P., evidenciando a hipótese de que tanto a atuação do U.S.P. quanto as forças mecânicas envolvidas possuem efeitos estimulatórios similares na calcificação.

ITO e cols. (2000), analisaram os efeitos do U.S.P. e do 1,25-dihidroxi- vitamina D₃ [1,25-(OH)₂D₃] em co-culturas de células osteoblásticas (SaOS-2) e células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVEC), na secreção do fator de crescimento, e mostrou que o U.S.P. aumenta a secreção de fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF-AB), acelerando a consolidação de fraturas pela estimulação do fator de secreção das células em cooperação com 1,25-(OH)₂D₃ *in vivo*.

Em um trabalho mais recentemente desenvolvido, DUDA et al (2004), construíram um modelo de cartilagem articular constituído de células cartilaginosas do úmero de bois adicionadas em suspensão de fibrinogênio e trombina. Este modelo foi implantado subcutâneamente em camundongos homozigóticos atímicos “nus” (nude mices), e posteriormente tratados com U.S.P., mostrando que o efeito estimulatório do mesmo pode estar limitado a uma fase muito inicial da condrogênese, e que embora a atuação do U.S.P. na condrogênese da consolidação de fraturas seja benéfica, ele parece não ter efeitos positivos na maturação das estruturas do tecido cartilaginoso modelado.

2. OBJETIVOS

A presente pesquisa tem por finalidade avaliar a ação da irradiação pulsada de baixa intensidade (U.S.P.) sobre a ossificação de blastemas da coluna vertebral mediante implantes de segmentos de cauda de camundongos isogênicos recém-nascidos em camundongos isogênicos adultos.

O estudo tem como finalidade avaliar comparativamente o desenvolvimento da ossificação endocondral de blastemas da coluna vertebral estimulados ou não pelo U.S.P. em dois grupos diferentes de implantes, subcutâneo e intramuscular.

Para tal finalidade, utilizou-se um modelo de ossificação endocondral *in vivo*, que constou de segmentos de cauda implantados no músculo e no subcutâneo de camundongos isogênicos adultos, que após aplicação do U.S.P., foram analisados histopatologicamente e mediante avaliações morfométricas, utilizando-se um software específico (ImageJ 1,33m NIH, USA), entre segmentos estimulados e não estimulados.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. O ULTRA-SOM

O ultra-som é uma forma de energia mecânica de alta frequência, acima de 20 kHz (OKUNO et al., 1986), que se propaga através de ondas de pressão acústica imperceptíveis ao ouvido humano, promovendo a agitação de partículas em torno da sua posição de equilíbrio fazendo-as oscilar, diminuindo gradativamente a sua amplitude em decorrência da perda de energia da onda, sem provocar deformação do meio, seja ele sólido, líquido ou gasoso (TER HAAR, 1987).

Na onda mecânica, a energia é transmitida pela agitação das moléculas do meio no qual a onda está se propagando, e encontra uma resistência causada por forças elásticas de acordo com estrutura molecular do meio (FREDERICK, 1965). Assim, as ondas podem ser classificadas em transversais, longitudinais e superficiais.

Nas ondas transversais, também chamadas de ondas de cisalhamento, as partículas do meio em que elas propagam, vibram perpendicularmente à direção de propagação da onda nesse meio, mantendo-se constantes os planos de partículas no meio de propagação. Nas ondas longitudinais ou ondas de compressão, as partículas do meio em que elas se propagam, vibram na mesma direção de propagação da onda nesse meio. Por fim, as ondas superficiais são obtidas após a refração das ondas longitudinais e causam oscilações elipsoidais nas partículas. Nos meios líquidos e gasosos apenas ondas do tipo longitudinal podem ser produzidas (WELLS, 1977).

Onda	Configuração
Longitudinal	<p>.....</p> <p>.....</p> <p>.....</p> <p>.....</p> <p>.....</p>
Transversal

FIGURA 1. Modelo de propagação de ondas ultra-sônicas.

FIGURA 2. Propagação de uma onda acústica longitudinal. Em "A" observa-se o comportamento de um conjunto de partículas nos instantes iniciais de propagação. A energia ultra-sônica atinge uma nova partícula, em determinado espaço de tempo, descrevendo um movimento oscilatório. Em "B", são mostradas as regiões de compressão e rarefação durante a propagação da onda. (Ter Haar, G. *Physiotherapy*. v 73, n. 3, 1987)

3.1.1. Características das ondas ultra-sônicas:

As ondas ultra-sônicas apresentam alguns parâmetros como os demais tipos de onda.

- 3.1.1.1. **Comprimento de onda (λ):** é descrito como a menor distância entre dois planos próximos (regiões de compressão ou de rarefação máxima), onde as partículas se encontram no mesmo estado de movimento em determinado instante de tempo, caracterizando 1 (um) ciclo completo de onda.
- 3.1.1.2. **Período (T):** é o intervalo de tempo em que uma partícula realiza um ciclo completo de movimento.
- 3.1.1.3. **Amplitude (A):** é distância entre a posição de equilíbrio e a posição extrema ocupada por uma partícula que oscila.
- 3.1.1.4. **Potência (P):** é a quantidade de Energia (E) total do feixe, produzida ou consumida em um intervalo de tempo (t), expressa em Watt (W). A potência com que o ultra-som atinge um sítio ósseo é menor que a potência transmitida pelo transdutor, devido à atenuação causada pelas camadas de tecido entre a pele e o sítio, além da reflexão na interface entre os tecidos.
- 3.1.1.5. **Frequência (f):** corresponde ao número de oscilações ou ciclos que uma partícula realiza por unidade de tempo.

FIGURA 3. Em "A" representação de uma onda em função da distância e em "B", representação de uma onda em função do tempo.

3.1.1.6. **Velocidade do som (c):** é definida como a distância percorrida pela onda ultra-sônica por unidade de tempo, expressa em m/s (metros por segundo). Entretanto, a velocidade de uma onda ultra-sônica depende do tipo de onda considerada e das constantes elásticas do meio em que se propaga, sendo inversamente proporcional à compressibilidade de seu meio de propagação.

Em um meio mais compressível como, por exemplo, o ar, a transmissão é mais lenta, porque existe mais espaço entre as moléculas e assim, essas podem ser facilmente comprimidas. Já os meios líquidos e sólidos são menos compressíveis, pois suas moléculas são mais próximas umas das outras, e

conseqüentemente um pequeno movimento da molécula já afeta a molécula subsequente; assim, líquidos e sólidos apresentam velocidade de propagação maior (GUIRRO, 2002).

Nos tecidos moles do corpo humano, a velocidade de propagação da onda ultra-sônica está ao redor de 1.500 m/s e entre 2710 e 4080 m/s para o osso (YOUNG, 1990). A velocidade das ondas ultra-sônicas nos diferentes meios está ilustrada nas tabelas 1 e 2.

3.1.1.7. **Intensidade (I):** é a energia (E) que atravessa uma unidade de área (S) em uma unidade de tempo (t), dada em Watt /cm² (TER HAAR, 1987). Quando uma onda acústica atravessa determinado meio, as partículas vibram adquirindo energia cinética, que associada à onda ultra-sônica é chamada de intensidade acústica.

3.1.1.8. **Atenuação:** refere-se a uma diminuição da intensidade da onda ultra-sônica conforme esta se distancia de sua fonte, causado por espalhamento e absorção pelo meio. A atenuação total do ultra-som ao se propagar em um meio é o produto do coeficiente de atenuação deste meio pela espessura do mesmo. A atenuação de uma onda obedece a uma lei exponencial:

$$I = I_0 \cdot e^{-2\alpha X} ,$$

onde I é a intensidade do ultra-som após atravessar uma espessura X de um material com coeficiente de atenuação α ; I_0 é a intensidade inicial e e a base dos logaritmos naturais. (McGROUTHER, 1994).

O coeficiente de atenuação do ultra-som geralmente aumenta com a frequência, razão pela qual existe um limite

máximo na frequência a ser empregada clinicamente. Também pode ser expressa em função da potência:

$$A = 10 \log \frac{P}{P_{ref}} \quad (1), \quad \text{onde}$$

P é a potencia que atinge um determinado meio, e P_{ref} uma potência de referência.

É expressa em decibéis por centímetro quadrado (dB/cm²).

Tabela 1. Coeficiente de atenuação para a frequência de 1MHz em diferentes tecidos (WELLS, 1977).

Tecidos	Coeficiente de atenuação (a) UNIDADES
Sangue	0.18
Gordura	0.63
Cérebro	0.85
Fígado	0.94
Rim	1.0
Músculos (paralelo às fibras)	1.3
Músculos (transversal às fibras)	3.3
Miocárdio	1.8
Ossos do crânio	20
Pulmão	41

Tabela 2. Coeficiente de atenuação para frequência de 1,5 MHz (ZISKIN, 1989 - p.11)

Tecido	Coeficiente de atenuação (a) UNIDADES
Pele	1.16
Gordura	0.91
Músculo	1.43

3.1.1.9. Tempo de Irradiação: é o tempo total de exposição às ondas ultra-sônicas.

- 3.1.1.10. **Impedância (Z):** é a propriedade de uma onda se deslocar mais facilmente em determinado meio que em outros. Pode ser descrita pela equação:

$$Z = \rho \cdot c, \text{ onde,}$$

ρ é a massa específica do meio e c é a velocidade da onda.

A impedância do meio é considerada constante, visto que, a velocidade do som no meio é basicamente constante dentro de uma larga faixa de frequência (WILLIAMS, 1983).

A porcentagem de energia refletida e refratada no meio de aplicação do ultra-som depende do ângulo de incidência e da diferença da impedância acústica entre os meios (fig. 4).

FIGURA 4. Reflexão e refração do Ultra-som (WELLS, 1977 - p.16). A onda refletida na interface retorna através do meio incidente com a mesma velocidade com que se aproximou da interface, porém, a velocidade da onda transmitida é alterada em função da característica do segundo meio.

Tabela 3. Propriedades acústicas típicas em vários meios (YOUNG, 1990)

Meio	Massa específica (g/mL)	Velocidade do som (m/s)	Impedância Característica (10 ⁶ kg ⁻² ms ⁻¹)
Ar	1.293	331.5	429
Água (20°C)	1.0	1480	1.52
Plasma Sanguíneo	1.06	1570	1.62
Gordura	0.92	1460 - 1470	1.35
Fígado	1.06	1540 - 1585	1.63 - 1.68
Músculo	1.07	1545 - 1630	1.65 - 1.74
Osso	1.38 - 1.81	2710 - 4080	3.75 - 7.38

A porcentagem de energia refletida ($\alpha_r = I_r / I_i$) transmitida ou refratada ($\alpha_t = I_t / I_i$) é determinada pelas equações 2 e 3, onde, I_i , I_r e I_t são as intensidades incidente, refletida e transmitida respectivamente, e θ_i e θ_t , os ângulos de incidência e transmissão respectivamente.

$$\alpha_r = \frac{I_r}{I_i} = \left(\frac{Z_2 \cos \theta_i - Z_1 \cos \theta_t}{Z_2 \cos \theta_i + Z_1 \cos \theta_t} \right)^2 \quad (2)$$

$$\alpha_t = \frac{I_t}{I_i} = \frac{4 \cdot Z_2 Z_1 \cdot \cos \theta_i \cdot \cos \theta_t}{(Z_2 \cos \theta_i + Z_1 \cos \theta_t)^2} \quad (3)$$

Se a incidência for perpendicular ao meio 2 ($\theta_i = 90^\circ$), as equações 2 e 3 são simplificadas:

$$\frac{I_r}{I_i} = \left(\frac{Z_2 - Z_1}{Z_2 + Z_1} \right)^2 \quad (4)$$

$$\frac{I_t}{I_i} = \frac{4 \cdot Z_2 Z_1}{(Z_2 + Z_1)^2} \quad (5)$$

3.1.2. Transdutores

Em 1880, os irmãos Pierre e Jacques Curie descobriram o fenômeno da piezeletricidade definido como a variação das dimensões físicas de certos materiais sujeitos a campos elétricos, onde as cargas da rede cristalina se interagem com o material produzindo uma tensão mecânica. Atualmente, sabe-se que este fenômeno é uma propriedade material de alguns cristais e substâncias anisotrópicas, ou seja, substâncias cristalizadas que reagem diferentemente segundo a direção de propagação de um determinado fenômeno físico, como a propagação da luz ou do calor, o crescimento do cristal, a dureza, etc. (RICHARDSON, 1989).

Os transdutores piezelétricos são dispositivos que respondem a uma tensão elétrica, deformando-se, ou a uma tensão mecânica alterando-se sua polarização. Alguns cristais podem naturalmente ser piezelétricos, tais como a turmalina e o quartzo, podendo ser utilizados como transdutores. Porém, materiais como o zirconato titanato de chumbo (PZT) e o titanato de bário (BaTiO_3), podem apresentar piezeletricidade após serem submetidos a um processo de polarização elétrica.

Neste trabalho, utilizamos como transdutor um disco circular de zirconato titanato de chumbo (PZT) com diâmetro de 2,2 cm e a frequência de ressonância 1,5 MHz.

3.1.3. Mecanismos de Interação do ultra-som com células e tecidos biológicos

A interação entre o U.S.P. e alguns tecidos biológicos, é dependente de seus efeitos biofísicos e não térmicos, como a cavitação, o microfluxo acústico e do fenômeno da piezeletricidade, que ocorrem durante a aplicação do mesmo.

3.1.3.1. Cavitação

Cavitação é o fenômeno que relata a formação de cavidades ou microbolhas (10^{-6} mm de diâmetro) em meio líquido, no caso, sangue ou em fluidos teciduais, quando o mesmo é estimulado acusticamente. Essas bolhas que se formam durante a passagem da onda acústica, podem permanecer intactas em vários ciclos de aplicação do U.S.P.(cavitação estável), ou podem se romper e liberar grande quantidade de energia (cavitação transiente).

A *cavitação estável* está associada com a vibração de corpos gasosos que oscilam geralmente de forma não linear, dentro de um equilíbrio, sendo que são relativamente permanentes e podem ficar oscilando por muitos ciclos de pressão acústica. Quando tais oscilações volumétricas estão estabelecidas, as bolhas de gás produzem um fluxo ou ondulação no meio, as micro-ondulações acústicas (MAXWELL, 1995).

Esse tipo de cavitação é responsável, em parte, pelo estímulo produzido pela onda ultra-sônica para a reparação dos tecidos, através de modificações na permeabilidade da membrana celular para os íons cálcio e íons sódio, que provocam um aumento na síntese de proteínas (YOUNG & DYSON, 1978).

A intensidade limite para que ocorra esse tipo de cavitação é de 0,1 W/cm² em meio aquoso (HILL, 1972), e de 0,2 w/cm² “in vivo” (TER HAAR et al, 1982).

A *cavitação transiente* ocorre quando um feixe ultra-sônico atravessa o campo oscilando violentamente causando intensas ondas de choque ou um campo de cisalhamento hidrodinâmico produzindo pulsos de alta pressão e temperatura em tempo curto liberando grande quantidade de energia causando o rompimento do material.

Essa liberação excessiva de energia, com aumento da temperatura e da pressão, pode causar grandes danos ao tecido local formando radicais livres altamente reativos, íons hidrogênio (H⁺), hidroxilas livres (OH⁻), que podem

por sua vez, causar mudanças químicas na célula e lise celular (OKUNO, CALDAS & CHOW, 1986).

3.1.3.2. Microfluxo acústico

O fluxo ou corrente acústica corresponde a movimentos unidirecionais e circulares constantes do fluido, induzida por forças da radiação ultra-sônica. Quando esses movimentos do fluido se dão ao longo da fronteira das cavidades estáveis ou pequenos corpos, e são resultantes da pressão mecânica exercida pela onda de radiação, denominam-se microfluxo acústico.

Esses movimentos dão origem a forças e tensões que podem, dependendo da magnitude do fenômeno, modificar de maneira reversível ou não, a configuração normal das células, afetando seu funcionamento, danificando macromoléculas, além de alterar o ritmo de difusão de partículas e a permeabilidade da membrana. (OKUNO, CALDAS & CHOW, 1986).

Dependendo do tipo de célula, a alteração de íons produzida pelo fluxo ou microfluxo, pode alterar a motilidade, a síntese ou a secreção da célula, de forma permanente ou não, dependendo da magnitude do ocorrido, o que pode acelerar o processo de reparo. (DYSON, 1987).

3.1.3.3. Piezeletricidade

FUKADA & YASUDA (1957), descreveram pela primeira vez o fenômeno da piezeletricidade ocorrida em um tecido biológico. Eles observaram os efeitos direto e inverso da piezeletricidade no osso. Quando o mesmo sofria uma deformação mecânica, formavam-se cargas elétricas na face oposta do osso, devido às moléculas de colágeno existentes no local.

SILVA (1987), demonstrou que a aplicação de um campo acústico pode determinar a ação de um campo elétrico ao nível de membrana celular e

pressupõe que este efeito deva ocorrer em todos os tecidos que contam colágeno.

3.1.4. Dosimetria

A energia transmitida pelos transdutores ultra-sônicos deve ser periodicamente aferida. Essa aferição é feita em dosímetros cujo princípio de funcionamento é baseado em força de radiação. Comercialmente são denominados de “Balanças de Força de Radiação”, devido ao fato da força ser medida com auxílio de uma balança mecânica ou eletrônica.

O princípio básico do processo é o seguinte: um campo ultra-sônico que atinge um objeto exerce uma força que se denomina “força de radiação” (F_{rad}), proporcional à potência incidente. Se o objeto absorver completamente a energia incidente, a expressão da força é dada pela equação:

$$F_{rad} = \frac{W}{c} ,$$

onde c é a velocidade do ultra-som no meio onde o objeto está imerso, geralmente água, e W é a potência incidente, dados em $\mu\text{N}/\text{mW}$ (ZISKIN, 1993).

As figuras 5 e 6 mostram um esquema deste dosímetro e uma fotografia de dois modelos comercializados, onde estão representados todos os componentes do mesmo.

FIGURA 5. **Balança de Força de Radiação.** A figura mostra o esquema de funcionamento da balança, onde se observa: tanque de teste (1), absorvedor de energia refletida pelo alvo (2), meio de medida - água deionizada (3), alvo (4), acoplador entre o alvo e a balança (5), transdutor (6) e balança (7).

FIGURA 6. Dosímetros baseados em força de radiação. Em A, aparelho da NPL Acoustics®, Reino Unido. B mostra um dosímetro modelo UPM-DT-1 Ohmic Instruments Co., EUA (no detalhe, o alvo cônico sem a presença do tanque de água).

O sinal elétrico que excita o transdutor ultra-sônico pode ser contínuo ou pulsado (figura 7). O campo ultra-sônico apresenta variações no espaço e no tempo. Na figura 8 observa-se que no espaço há um valor de pico (SP) e um valor médio (SA). Existem três medidas de variação temporal do campo elétrico (figura 9): pico temporal (TP), média temporal (TA) e média do pulso (PA) que combinadas fornecem as intensidades que, segundo Alvarenga (2001), podem ser aferidas:

- **Intensidade pico espacial - pico temporal (SPTP):** valor de intensidade pico temporal num ponto do campo acústico onde a mesma é um máximo, ou é um máximo local de determinada região.
- **Intensidade pico espacial - média de pulso (SPPA):** valor de intensidade média do pulso no ponto do campo acústico onde a mesma é máxima ou é um máximo local de determinada região.
- **Intensidade pico espacial - média temporal (SPTA):** valor da intensidade média temporal num campo acústico onde a mesma é máxima ou é um máximo local de determinada região.
- **Intensidade média espacial - média temporal (SATA):** é a intensidade total no feixe dividido pela área do mesmo (ISA) durante o período de repetição do pulso. Na intensidade SATA, a intensidade, e a potência são proporcionais à amplitude de vibrações de moléculas e são utilizadas para se avaliar o aquecimento de um tecido devido à propagação do ultra-som.

FIGURA 7. Sinais elétricos de excitação de transdutores piezelétricos: (A) sinal contínuo e (B) sinal pulsado (Hedrick, 1995).

FIGURA 8. Variação da intensidade ultra-sônica no espaço. (Buchong, 1991)

FIGURA 9. Variação da intensidade ultra-sônica no tempo. (Biomedical Class - Ultrasound Imaging Physics of Matter - Energy Interactions, 2003)

A maior parte dos estudos com ultra-som utiliza valores de intensidade SATA para expressar a energia ultra-sônica.

A tabela 4 mostra alguns valores de intensidades do ultra-som em aplicações médicas.

TABELA 4. **Intensidades ultra-sônicas típicas em aplicações médicas** (ZISKIN, 1989).

Aplicação	Intensidade SATA (mW/cm ²)
Cirurgia	> 10
Fisioterapia	0,5 – 3,0
Doppler	0,05 – 0,5
Imagem	0,0001 – 0,05
Tratamento de fraturas	0,03

Algumas precauções devem ser tomadas para que essa dosimetria seja confiável. Assim, o aparelho deve conter características como:

- Uso de água degaseificada ou deionizada;
- Alvo cônico de 45° com geometria perfeita para se evitar reflexões na parede do absorvedor.
- Balança de precisão
- Ausência de vibrações do suporte ou correntes de ar no ambiente.

Assim, a dosimetria do ultra-som é realizada periodicamente para determinar a exposição exata do paciente e para minimizar riscos potenciais.

3.2. OSSIFICAÇÃO ENDOCONDRA

Dos duzentos e seis ossos que constituem o esqueleto adulto humano, a maioria deles, independentemente da sua morfologia e função, forma-se mediante um tipo de ossificação denominada de endocondral. Há ossos, entretanto, que se originam simultaneamente a partir de dois tipos de ossificação, endocondral e intramembranosa, tais como a clavícula, mandíbula e ossos do crânio.

Os ossos de origem cartilaginosa formam-se a partir de blastemas mesenquimais que se transformam em modelos cartilagosos os quais se desenvolvem, por multiplicação dos condrócitos, até a ossificação endocondral se iniciar, quando o modelo cartilaginoso é substituído por tecido ósseo.

As células mesenquimais são comprometidas a tornarem-se células cartilagosas devido a presença de fatores parácrinos que induzem a aproximação de células mesodérmicas para expressar dois fatores de transcrição, o *Pax 1* e o *Scleraxis*, que ativam os genes cartilagem específicos. As células mesenquimais, inicialmente, se condensam em nódulos compactos e diferenciam-se em condrócitos. Uma substância denominada N-caderina, parece ter importante papel na iniciação dessas condensações bem como o gene *N-CAM* parece ser crítico para mantê-las (TUAN, 1984, HALL e MIYAKI, 1995). Outras moléculas como fibronectina, syndecans, tenascinas e trombopondinas, moléculas de adesão de células neurais, da cinase e da adesão focal, e do *paxillin*, também foram relatadas (SHUM e NUCKOLLS, 2002). Em humanos, o gene *SOX9* que codifica a proteína ligante do DNA, também é expresso em condensações mesenquimais pré-cartilagosas.

A ossificação endocondral de um modelo de cartilagem hialina inicia-se pela área na qual seu pericôndrio se desenvolve inicialmente. Esse fato ocorre sempre no mesmo local do modelo de cartilagem hialina em quaisquer áreas topográficas dos modelos ósseos cartilaginosos. Sinalizações entre o pericôndrio e os condrócitos levam as células para o centro do modelo de cartilagem hialina para dar início ao programa de maturação e preparar um sítio de ossificação. Esses condrócitos aceleram a velocidade de sua proliferação e ficam presos ao seu ciclo celular. As células pós-mitóticas modificam sua morfologia e tornam-se condrócitos hipertrofiados (GARTNER & HIATT, 2000). Visto que a proliferação e os condrócitos articulares sintetizam uma matriz de cartilagem composta na maior parte por colágeno tipo II, os condrócitos hipertrofiados cessam a expressão deste tipo de colágeno, e começam a expressar o colágeno do tipo X, que é reorganizado em um marcador de células hipertrofiadas na linhagem condrocítica (SHUM e NUCKOLLS, 2002). Por um período este modelo cresce, tanto aposicional como intersticialmente. Eventualmente, os condrócitos localizados no centro do modelo de cartilagem hipertrofiado, acumulam glicogênio no seu citoplasma e se tornam vacuolizados. Quando isso ocorre, células condrogênicas se tornam osteoprogenitoras formando osteoblastos, que, com a hipertrofia dos condrócitos, são ativados no pericôndrio secretando matriz óssea. Uma fina camada de osso, o colar, é depositada em torno da porção média do modelo de cartilagem pelo processo de ossificação intramembranosa. Esse colar ósseo previne a difusão de nutrientes para os condrócitos hipertrofiados dentro do núcleo do modelo de cartilagem, causando apoptose dos condrócitos. O pericôndrio que rodeia o colar se torna periósteo.

A hipertrofia dos condrócitos resulta em espessamento das lacunas às custas da matriz cartilaginosa, e uma redução entre os septos dessa matriz, que se torna calcificável e com depósito de agregações granulares e grupos de cristais de fosfato e carbonato de cálcio. Com a confluência das lacunas, há formação de concavidades largas e irregulares e orifícios no centro do modelo cartilaginoso, a futura cavidade medular (GARTNER & HIATT, 2000).

Mudanças regressivas nas células cartilaginosas hipertrofiadas, incluindo inchamento de seus núcleos e perda de cromatina, fazem os condrócitos depositarem um fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), o fator angiogênico, dentro de suas matrizes extracelulares, o que promove a infiltração de vasos sanguíneos da camada investida de tecido conectivo, o perióstio, no tecido cartilaginoso. Como consequência essas células hipertrofiadas morrem e se degeneram. Com a morte dos condrócitos, um grupo de células que têm envolvido o modelo cartilaginoso diferencia-se em osteoblastos (SHUM e NUCKOLLS, 2002).

Os vasos finos se filiam e crescem em direção oposta a cada extremo do de modelo cartilaginoso, formando laços de capilares que se estendem para as extremidades de cavidades na cartilagem calcificada, levando consigo células primitivas pluripotentes originárias do perióstio. Algumas dessas células que se proliferam se diferenciam em elementos hematopoiéticos da medula óssea, e outras, se diferenciam em osteoblastos, que se reúnem em uma camada epitelióide na superfície irregular das espículas da matriz cartilaginosa calcificada, e começam a depositar matriz óssea sobre elas.

As células osteoprogenitoras que se dividiram para formar osteoblastos elaboram a matriz óssea na superfície da cartilagem calcificada. Essa matriz óssea se torna calcificada para formar um complexo de “cartilagem calcificada/osso calcificado” (CC/OC). Este complexo pode ser visto em secções histológicas coradas, devido à cartilagem calcificada ser basofílica, enquanto que o osso calcificado é acidofílico.

Como o osso subperiosteal torna-se denso e cresce a partir da diáfise em direção às epífises, osteoclastos começam reabsorver o complexo CC/OC aumentando a cavidade medular. Assim como esse processo continua, a cartilagem da diáfise é substituída por osso, exceto as placas epifisárias, que são responsáveis pela continuidade do crescimento ósseo longitudinal por 10 a 20 anos.

Muito mais tarde, formam-se os centros de ossificação secundários ou complementares em cada epífise. Esses centros são semelhantes ao centro

primário da diáfise, porém seu crescimento é radial em vez de longitudinal, de modo que uma parte da cartilagem do modelo, denominada de placa de crescimento, torna-se aprisionada entre o centro primário e os centros secundários, extremos, de ossificação em expansão. Os condrócitos componentes da placa de crescimento se proliferam por multiplicação, amadurecem e necrosam a medida em que a matriz se mineraliza. Além disso, nas superfícies articulares dos ossos longos ou nas faces articulares dos ossos curtos, não existe pericôndrio, de modo que não se forma o tecido ósseo nessa região, permanecendo assim, como cartilagem articular por toda a vida, constituindo-se na futura cartilagem articular.

Quando o tecido ósseo formado a partir dos centros secundários das epífises dos ossos longos, o tecido cartilaginoso fica reduzido às superfícies articulares como a cartilagem articular, que persistirá por toda a vida do indivíduo e não contribui para a formação do tecido ósseo, e a cartilagem epifisária ou de conjugação, constituída inicialmente por um disco cartilaginoso ainda não substituído pelo tecido ósseo em expansão que será o responsável pelo crescimento longitudinal do osso. A cartilagem de conjugação fica localizada entre o tecido ósseo dos centros secundários das epífises e o tecido ósseo da diáfise constituída a partir do centro primário. Seu desaparecimento por ossificação, aproximadamente aos 20 anos de idade, irá determinar a parada do crescimento longitudinal dos ossos longos. O desenvolvimento ósseo continua até unir a diáfise à epífise. A região antes ocupada pela placa de crescimento, quando ossificada, passará a chamar-se metáfise (GARTNER & HIATT, 2000).

A figura 10 mostra esquematicamente as etapas do processo de ossificação endocondral em um osso longo.

Figura 10. Esquemas ilustrando a ossificação endocondral e o desenvolvimento de um osso longo típico. A a J são secções longitudinais e A' a D' são secções transversais nos níveis indicados. A, Modelo cartilaginoso do osso. B, Aparece um anel ósseo sob o periosteio. C, A cartilagem começa a calcificar-se. D, Mesênquima vascularizado penetra na cartilagem calcificada. E, Em cada junção diáfise-epifisária há uma zona de ossificação. F, Vasos sanguíneos e mesênquima penetram na cartilagem epifisária superior. G, O centro de ossificação epifisário cresce. H, um centro semelhante desenvolve-se no disco cartilaginoso epifisário inferior. I, o disco cartilaginoso epifisário inferior está ossificado. J, O disco cartilaginoso epifisário superior ossifica-se formando uma cavidade contínua de medula óssea. Quando os discos epifisários se ossificam, o osso não pode mais crescer em comprimento (**Fonte:** BLOOM W, FAWCETT: *A Textbook of Histology*. 11th ed. Filadélfia, WB Saunders, 1986)

YASUI et al. (1997), descreveu em estudo com ratos, além dos processos intramembranoso e endocondral, um terceiro tipo de ossificação, que denominou de “formação de osso trans-condróide”, onde o osso condróide, um tecido intermediário entre o osso e a cartilagem, era formado diretamente por células similares a condrócitos, assumidas pelo autor como condrócitos jovens, que expressavam temporariamente ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) de colágeno tipo II, com transição gradual de tecido fibroso para osso e consecutivamente sem a invasão de capilares.

BIANCO et al. (1998), propuseram que todos os condrócitos hipertrofiados possuem potencial inerente para se diferenciar em células similares aos osteoblastos e continuar a formação inicial do osso, porém somente aqueles condrócitos situados no “limite” entre os tecidos osteogênicos cartilaginoso e não-cartilaginoso, sofreriam futura diferenciação para osso produzindo células. Aqueles condrócitos situados fora desse “limite” não sofreriam diferenciação e entrariam em processo de apoptose.

Simultaneamente a essas etapas, o osso passa a ser constantemente remodelado com a manutenção do processo, pelos estimulantes primários de reabsorção óssea, como o paratormônio (PTH), proteína relacionada ao paratormônio (PTHrP), interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral (TNF), sobre os osteoblastos, que após receberem o sinal químico, liberam um mediador solúvel que induz a reabsorção óssea pelos osteoclastos. As citocinas e fatores de crescimento como o fator de transformação do crescimento beta (TGF- β), liberados da matriz durante sua digestão, atuam como uma alça de retro-alimentação e desencadeiam a formação e ativação de novos osteoblastos para sintetizar e depositar osso novo na depressão decorrente da reabsorção, como mostrado na figura 11 (ROSEMBERG, 2000).

Figura 11. Reabsorção e formação óssea. A reabsorção e a formação óssea são processos acoplados que são controlados por fatores sistêmicos e citocinas locais, alguns dos quais são depositados na matriz óssea. As citocinas são fundamentais na comunicação entre os osteoblastos e os osteoclastos. (Fonte: Rosenberg, A, *in* Robbins, Patologia Estrutural e Funcional, 2000).

Tabela 5. Etapas na Ossificação Endocondral. (GARTNER & HIATT, 2000)

<i>Evento</i>	<i>Descrição</i>
Modelo de cartilagem hialina formado	Um modelo de cartilagem é formado na região de desenvolvimento embrionário onde o osso será desenvolvido. Alguns condrócitos maturam, hipertrofiam e morrem. Matriz cartilaginosa se torna calcificada.
<i>Centro de Ossificação Primária</i>	
Endocôndrio na diáfise torna-se vascularizado.	Vascularização do endocôndrio modifica para periósteo. Células condrogênicas se tornam células progenitoras.
Osteoblastos secretam a matriz formando o colar ósseo subperiosteal	O colar é formado de osso primário (ossificação intramembranosa).
Condrócitos no núcleo da diáfise hipertrofiam-se, morrem e se degeneram.	Presença do periósteo e colar ósseo previnem a difusão de nutrientes para condrócitos. Sua degeneração (leaves) da lacuna, abrindo grandes espaços no septo da cartilagem.
Osteoclastos delimitam buracos no colar subperiosteal, permitindo a entrada de "bud" osteogênico.	Buracos permitem células progenitoras e capilares para invadirem o modelo cartilaginoso agora calcificado, e começam a depositar matriz óssea.
Formação do complexo CO/OC	A matriz óssea é depositada no septo de cartilagem calcificada formando este complexo. Histologicamente: cartilagem calcificada – azul, osso calcificado – vermelho.
Osteoclastos começam reabsorver o complexo CO/OC.	Destruição do complexo aumenta cavidade medular.
O colar subperiosteal espessa, começando a crescer em direção às epífises.	Esse evento por anos substitui completamente cartilagem diáfise por osso.
<i>Centro de Ossificação Secundária</i>	
Ossificação começa na epífise	Inicia do mesmo modo que no centro primário exceto por não existir colar ósseo. Osteoblastos depositam a matriz óssea na estrutura de cartilagem ossificada.
Crescimento de osso na placa epifisária	Articulação cartilaginosa na superfície do osso se mantém. Placa epifisária persiste – crescimento adicionando ao fim da placa epifisária. Osso é adicionado no fim da placa diafisária.
Epífise e diáfise tornam-se contínuas	No fim do crescimento ósseo, a cartilagem da placa epifisária cessa a proliferação. O desenvolvimento ósseo continua para unir a diáfise e a epífise.

3.2.1. Ossificação Endocondral em uma Vértebra Típica

Durante o período embrionário, surgem os centros de condrogênese em cada vértebra mesenquimal. Os dois centros de cada *centrum* se fundem no final deste período para formar o centro cartilaginoso do corpo vertebral. Simultaneamente, os centros dos arcos vertebrais se fundem entre si e com o *centrum*. Os processos espinhais e transversos desenvolvem-se a partir de centros de condrogênese próprios do arco vertebral. A condrogênese espalha-se até que seja formado um molde de coluna vertebral cartilaginosa.

A ossificação de uma vértebra típica, em humanos, inicia-se no período embrionário e termina por volta dos 25 anos. Inicialmente, temos dois centros de ossificação primária, ventral e dorsal, para o *centrum* (corpo), que logo se fundem para formar um único centro. Assim, são três os centros primários ao final do período embrionário: um no *centrum* e um em cada metade do arco vertebral. A ossificação torna-se evidente nos arcos vertebrais por volta da 8ª semana. Ao nascimento, cada vértebra consiste de três partes ósseas conectadas por cartilagem. As metades do arco vertebral geralmente se fundem durante os 3-5 anos iniciais de vida. As lâminas dos arcos se unem na primeira região lombar, e depois a união vai progredindo cefalicamente. A princípio, o arco vertebral articula-se com o *centrum* nas juntas neurocentrais cartilaginosas. Essas articulações permitem que os arcos vertebrais cresçam à medida que a medula espinhal aumenta. Essas juntas desaparecem quando o arco vertebral se funde com o *centrum*, entre os 3º e 6º anos de vida.

Após a puberdade, surgem cinco centros de ossificação secundários: um para a extremidade do processo espinhal, outros dois para a extremidade de cada processo transversal e dois circundando as epífises anulares das bordas superiores e inferiores do corpo vertebral. O corpo vertebral é composto pelas epífises anulares superior e inferior e pela massa de osso compreendida entre as mesmas. Ele inclui o *centrum*, partes do arco vertebral e as facetas para as cabeças das costelas. Todos os centros secundários unem-se com o restante da vértebra por volta dos 25 anos (fig. 12).

Figura 12. Desenhos ilustrando os estádios do desenvolvimento vertebral. *A*, Vértebra mesenquimal com 5 semanas. *B*, Centros de Condrogênese numa vértebra mesenquimal com 6 semanas. *C*, Centros de ossificação primária em uma vértebra cartilaginosa com 7 semanas. *D*, Uma vértebra torácica na ocasião do parto consistindo em 3 partes ósseas. Note a cartilagem entre as metades dos arcos vertebrais e o *centrum* (a junta neurocentral). *E* e *F*, Duas vistas de uma vértebra torácica típica durante a puberdade, mostrando a localização dos centros de ossificação secundária. (**Fonte:** MOORE, KL & PERSAUD, TVN. *Embriologia Básica*. 4th ed. Filadélfia, WB Saunders, 1995).

3.2.2. Fatores envolvidos no processo de Ossificação Endocondral

Embora existam inúmeros artigos referindo-se à ossificação endocondral, muitos dos mecanismos que controlam o processo ainda não são compreendidos ou são desconhecidos.

WEISS e REDDI (1981), estudando a localização da fibronectina durante a diferenciação de cartilagem, osso e medula óssea, por técnicas de imunofluorescência em implantes de matriz óssea desmineralizada em ratos, determinou que a mesma está presente no osso em desenvolvimento e é sintetizada por células mesenquimais, condrócitos e osteoblastos, dando suporte ao recrutamento e adesão das células osteoprogenitoras que se infiltrarão no osso e se diferenciarão em osteoblasto.

YASODA et al (1998), em experimento *in vitro* utilizando tíbias de fetos de camundongos, verificou que os peptídios natriuréticos, produzidos tipicamente na porção atrial do coração e cérebro, aumentavam significativamente o comprimento do osso em relação aos centros cartilaginosos, aumentando a zona de proliferação dos condrócitos hipertrofiados, sugerindo que esses peptídios natriuréticos ativam a condrogênese no processo de ossificação endocondral.

Avanços recentes nos estudos genéticos e bioquímicos têm sido úteis no entendimento da regulação molecular da maturação dos condrócitos durante o processo de ossificação endocondral e a formação das articulações. A clonagem de linhagens comprometidas em desordens genéticas comuns humanas, que afetam a ossificação endocondral tem contribuído para identificar genes que regulam o desenvolvimento do osso. Interações entre células e entre célula e matriz ativam cinases, fosfatases e GTPases citoplasmáticas que podem, ser modulados sinalizando os fatores de crescimento e diferenciação tais como as proteínas morfogenéticas do osso (BMPs) e Wnts (SHUM e NUCKOLLS, 2002).

Estudos de receptores de fator de crescimento dos fibroblastos (FGFRs), *Hedgehog* Indiano (*Ihh*), proteínas receptoras do paratormônio (PTHrP),

proteínas morfogenéticas do osso (BMPs), e fatores ligantes do core (Cbfa1), tem revelado como se dá a regulação endócrina da ossificação endocondral.

Outros fatores como retinóides, óxido nítrico, hipóxia, vitamina D, estrogênios e outras moléculas pequenas, bem como as moléculas da matriz extracelular e sinais biomecânicos, contribuem também para a regulação da diferenciação e maturação dos condrócitos.

A seguir estão descritas algumas vias de regulação da condrogênese e da ossificação.

3.2.3. Fatores envolvidos na regulação da Condrogênese e Ossificação Endocondral – BMP, FGFRs, Cbfa1.

3.2.3.1. Proteínas Morfogenéticas do Osso (BMPs)

URIST (1965), baseado em fatos da época de que o tecido ósseo implantado em um sítio hospedeiro pode gerar uma resposta local de formação de novo tecido, foi um dos pioneiros no estudo específico da capacidade do osso desmineralizado e extratos ósseos induzirem a formação de osso quando implantados em sítios não ósseos em roedores. Ele se referiu às proteínas responsáveis pela atividade osteoindutora como “Proteínas Morfogenéticas do Osso” (BMP). O tipo de formação óssea identificado primeiramente foi o endocondral, a partir da formação da cartilagem. O mesmo implantou amostras de osso animal e humano, removidas em condições assépticas e descalcificadas em solução de ácido clorídrico, em tecido muscular de animais de laboratório. Após 4 a 6 semanas, observou os primeiros depósitos ósseos. A neoformação nos implantes de matriz óssea descalcificada ocorreu por um meio de proliferação celular do hospedeiro.

Urist comprovou ainda, em seus experimentos, que as BMPs extraídas do osso podem produzir diferenciação celular, organização do tecido ósseo com vascularização intensa, formação de cartilagem, e remodelação óssea completa com formação de estruturas de renovação do tecido calcificado.

Posteriormente, foram identificadas as seqüências genéticas e as proteínas responsáveis por estes eventos. As BMPs estão relacionadas a produtos genéticos multifuncionais expressos pelo desenvolvimento embrionário.

Desde então um grande número de moléculas da família das BMPs e de sua superfamília, o fator beta de transformação de crescimento (TGF- β s) tem sido clonados e identificados.

De uma maneira geral, as BMPs são moléculas dímeras, com estrutura espacial e seqüência de aminoácidos semelhantes ao TGF- β , onde as cadeias são unidas por pontes dissulfídicas, totalizando um conjunto de 18 proteínas diferentes.

As BMPs, têm demonstrado função em múltiplos sistemas e em estágios de desenvolvimento. A diversidade e a especificidade das BMPs, ainda são tópicos de intensa investigação. As ações pleiotrópicas de BMPs podem ser dependentes das concentrações, e a sinalização de BMP é modulada por proteínas de BMP e por outros fatores de crescimento e diferenciação, mediante receptores de serina-treonina-quinase. As funções das BMPs são auto-reguladas pelos eventos celulares com mecanismos de retro-alimentação positivos (estimulatórios) e negativos (inibitórios).

Há 2 tipos de receptores, tipo I e tipo II, cada um com um número de subtipos e de afinidade variada às diferentes BMPs, necessários para a transdução do sinal.

A implantação de BMP-2 ou BMP-7 em áreas onde não há calcificação produz a formação de osso e cartilagem no local pelo ligamento a receptores específicos, e, a partir daí, genes no núcleo das células são ativados pelas proteínas *Smad* e iniciam a produção de proteínas relacionadas com calcificação.

As proteínas *Smad1*, *Smad5* e *Smad8* sofrem fosforilação pela ação dos receptores e se translocam para o núcleo para regular a transcrição dos genes alvo. Existe um fator de transcrição (PEBP2[alfa]A/Cbfa1) que parece ser alvo específico das *Smads* ativadas. A ausência deste fator faria com que animais de laboratório não apresentassem calcificação (CAMPOS JR, 2004).

A BMP6 pode ter um papel direto na regulação da maturação dos condrócitos, enquanto as outras BMPs podem contribuir na sinalização entre condrócitos e o pericôndrio. A BMP6 é expressa em condrócitos pré-hipertróficos e hipertróficos e várias outras BMPs são expressas no pericôndrio. Esse tipo de BMP, em culturas de condrócitos, promove a expressão de genes do colágeno tipo X e de fosfatase alcalina. A não expressão de receptores ativos de BMP tipo I em desenvolvimento de membros, entretanto, atrasa a maturação dos condrócitos, e aumenta a expressão do *Ihh* deixando-o em excesso, aumentando a regulação do PTHrP. Esse fato sugere que a estimulação da BMP deste receptor no pericôndrio diafiseal, media a sinalização entre o *Ihh* dos condrócitos pré-hipertróficos e a expressão do PTHrP no pericôndrio periarticular (SHUM e NUCKOLLS, 2002).

Figura 13. Possível mecanismo de sinalização das BMPs através de receptores de BMP e Smads. A BMP se liga aos receptores de BMP (BMPR-I e BMPR-II) nas células alvos, e Smad 1 e Smad 5 transduzem sinais da BMP interagindo com Smad 4. A Smad 6 inibe a atividade pela ligação ao receptor BMPR-I. Smads 1, 4 e 5 atuam positivamente, e Smad 6 atua negativamente na sinalização das BMPs. (Fonte: YAMAGUSHI, A., KOMORI, T., SUDA, T. *Endocrine Reviews* 21(4): 393–411 [Adapted from M. Kawabata *et al.*: *Cytokine Growth Factor Rev* 9:49–61, 1998 (70).])

As BMPs não são apenas um fator de indução de calcificação ectópica. Sem elas, animais experimentais nascem com problemas de formação de

coração, pulmões, fígado, e ainda parecem estar envolvidas no processo da osteoporose.

Quando implantadas *in vivo*, induzem uma série de eventos, como formação óssea endocondral, incluindo infiltração de células mesenquimais, diferenciação destas células em condrócitos, remoção desta cartilagem, formação do osso, povoamento do osso com elementos da medula óssea, culminando com o processo de remodelação do tecido ósseo.

A tabela 6 mostra as principais funções das BMPs envolvidas no processos de condrogênese e de ossificação.

Tabela 6. Funções das BMPs envolvidas na condrogênese e ossificação.

BMP	Função
BMP-2	Osteoindutiva, apoptose, diferenciação de osteoblastos
BMP-3	Inibe a osteogênese, mais abundante
BMP-4	Osteoindutiva, desenvolvimento do pulmão e sistema ocular
BMP-5	Condrogênese
BMP-6	Condrogênese e diferenciação de osteoblastos
BMP-7	Osteoindutiva, desenvolvimento do fígado
BMP-8	Osteoindutiva
BMP-14	Condrogênese

Fonte: site: <http://www.bmp.com.br/bmp/main/>

Enomoto-Iwamoto et al (1998), para determinar o papel da sinalização das BMPs nos condrócitos durante a ossificação endocondral, introduziu formas dominantes negativas de receptores de BMP em condrócitos imaturos e não imaturos do esterno de embrião de galinha. Através de análises moleculares, concluiu que a sinalização das BMPs, particularmente aquela mediada pelo receptor do tipo II, é requerida para manutenção da diferenciação do fenótipo, controle da proliferação celular e expressão do fenótipo para hipertrofia.

3.2.3.2. Proteínas Ligantes Relacionadas ao Paratormônio (PTHrP) e “*Indian Hedgehog*” (*Ihh*)

A proliferação e maturação dos condrócitos na placa de crescimento são reguladas por uma retro-alimentação negativa de comunicação intercelular, mediada por moléculas que sinalizam a secreção de proteínas relacionadas ao paratormônio (PTHrP) e a um ligante de superfície celular, o *Indian Hedgehog* (*Ihh*).

O PTHrP é um hormônio de peptídio homólogo ao hormônio paratireoideo, sintetizado e secretado pelas células do pericôndrio, e por condrócitos tardios ao desenvolvimento. Funciona como uma molécula modeladora inibindo a hipertrofia dos condrócitos perto das extremidades articulares dos ossos em desenvolvimento, mantendo assim o *pool* de células proliferativas (SHUM E NUCKOLLS, 2002).

O PTHrP é expresso em uma variedade de tecidos normais em fetos e adultos, desempenhando papéis autócrinos e parácrinos, acentuando a hipótese de que o PTHrP é uma molécula regulatória do desenvolvimento (WEIR et al, 1996).

SHUKUNAMI et al (1996), estudando a diferenciação dos condrócitos em clones de células carcinogênicas ATDC5 de embriões de ratos com propriedades de células condroprogenitoras, como modelo de condrogênese no desenvolvimento precoce do osso endocondral, descobriram que essas células expressam RNAm de PTH/PTHrP em níveis elevados comparados aos níveis de RNAm de colágeno tipo II, sugerindo que a expressão de receptor PTH/PTHrP está associada com o início da condrogênese, e sua ativação pelo PTH exógeno ou PTHrP interfere significativamente na condensação celular e na subsequente formação dos nódulos cartilaginosos, mostrando assim, um novo sítio de ação do PTHrP.

O *Ihh* é um membro da família *Hedgehog* de ligantes associados à superfície celular expresso nas células pré-mitóticas, pré-hipertróficas, e fornece sinais para manter a expressão de PTHrP nas extremidades dos ossos em

desenvolvimento, regulando vários aspectos da ossificação endocondral (MININA et al, 2001).

Por inibir a maturação dos condrócitos, PTHrP desregula *Ihh* nas células próximas às extremidades dos ossos. *Ihh* promove a proliferação dos condrócitos na linha central longa através dos mecanismos PTHrP-dependentes e PTHrP-independentes. A perda da função do *Ihh* pelo gene alvo em ratos, resulta em decréscimo da proliferação dos condrócitos, perda da expressão do PTHrP, e posicionamento anormal de condrócitos hipertrofiados próximos à superfície articular. *Ihh* também é necessário para a sinalização entre os condrócitos pós-mitóticos e o pericôndrio para estabilizar e progredir o colar ósseo (SHUM e NUCKOLLS, 2002).

No processo de ossificação endocondral, tanto as BMPs como a associação *Ihh*/PTHrP são vias de sinalização do processo de ossificação, e existe uma interação entre ambas como mostrado no esquema da figura 14.

Figura 14. Interação da sinalização de BMP e *Ihh*. Durante a ossificação endocondral *Ihh* é expressa na diferenciação dos condrócitos (vermelho). *Ihh* induz a expressão de PTHrP em condrócitos periarticulares (amarelo) independentemente da sinalização da BMP. A distância da sinalização do PTHrP leva os condrócitos em estado proliferativo e determina a distância da região articular na qual os condrócitos poderão sofrer diferenciação hipertrófica. Além disso, *Ihh* regula a expressão de genes *Bmp* no pericôndrio, periósteo e parte dos condrócitos em proliferação (verde). A sinalização conjunta das BMP e *Ihh* regula a proliferação dos condrócitos empurrando as células para fora da ação do PTHrP. Esses condrócitos são liberados do bloco de diferenciação e regulam a expressão de *Ihh* que está em contato com a sinalização de BMP. A sinalização da BMP por sua vez, regula negativamente o desenvolvimento dos condrócitos hipertróficos diferenciados terminalmente (azul). Pela regulação da proliferação dos condrócitos, a expressão do *Ihh* e diferenciação terminal dos condrócitos, a sinalização da BMP integra passos diferentes na ossificação endocondral (Fonte: MININA et al. *Development* 128, 4523-34, 2001).

3.2.3.3. Fator de crescimento do fibroblasto (FGFs) e receptores (FGFRs)

Os fatores de crescimento do fibroblasto (FGFs), possuem 12 membros estruturais relacionados, e aproximadamente 12 genes FGF são conhecidos nos vertebrados, podendo gerar centenas de proteínas isoformes com variação de seu RNA e códon de iniciação em diferentes tecidos.

Os FGFs podem ativar uma gama de receptores tirosina-quinases chamados de receptores dos fatores de crescimento dos fibroblastos (FGFRs), proteínas que se localizam na superfície da membrana celular (figura 14).

Estruturalmente, o FGF possui uma parcela de proteínas que se liga ao fator parácrino do lado externo da membrana celular e um domínio tirosina quinase interno à membrana que fosforiliza outra proteína quebrando adenosina tri-fosfato (ATP). Quando o FGFR se liga ao FGF, o domínio quinase é ativado, e determinadas proteínas na célula de resposta se fosforilizam. As proteínas estão agora ativadas e podem desenvolver novas funções. FGFs são associados a várias funções de desenvolvimento, incluindo angiogênese (FGF2), e formação mesodérmica. O FGF8 é importante no desenvolvimento dos membros e do mesencéfalo (GILBERT, 2000).

Figura 15. Expressão do FGF. Estrutura do receptor de tirosina quinase. O domínio tirosina quinase é ativado pela ligação do FGF pela porção extracelular do receptor de proteína de tirosina quinase. Esta atividade da enzima fosforiliza resíduos específicos de tirosina de certas proteínas. **(Fonte:** GEILBERT, SF. *Developmental Biology*. 6th edition, EUA, Sinauer, 2000).

BARON et al (1994), em experimentos com coelhos, realizaram uma infusão de FGFb diretamente na placa de crescimento da tíbia desses animais, e observou que, onde havia sido feita a infusão, houve uma aceleração da ossificação da placa de crescimento, alterando a arquitetura da mesma e a morfologia dos condrócitos, e uma aumento acentuado da vascularização do local, sugerindo que o FGFb favorecia a invasão vascular da metáfise adjacente, acelerando a invasão de células precursoras de osso e da ossificação da placa de crescimento da cartilagem da metáfise, modulando a diferenciação dos condrócitos.

Os FGFs possuem 5 membros da família FGFR, sendo que 3 deles controlam o desenvolvimento do esqueleto (FGFR1, FGFR2 e FGFR3).

O FGFR3 regula a proliferação e maturação dos condrócitos. Estudos com esses receptores revelaram que mutações nos FGFRs causa defeito na ossificação endocondral pela inibição da proliferação dos condrócitos. (SHUM e NUCKOLLS, 2002).

O FGFR2 possui o maior papel no desenvolvimento, e possui duas variantes, IIIb e IIIc. A variante IIIc é expressa precocemente nos condensados mesenquimais e no colar ósseo ao redor dos modelos de cartilagem; mais tardiamente, é expresso tanto em sítios de ossificação endocondral como em sítios de ossificação intramembranosa.

Em experimentos com a variação IIIc de FGFR2 de camundongos, VERERAGAVAN et al. (2002), reportaram, via isolamento de genes, que este é uma regulador positivo de ossificação, não somente para osteoblastos, como também para as linhagens condrocíticas.

Em humanos, mutações nos FGFRs podem ativá-los prematuramente causando anomalias como por exemplo, acondroplasias, dwarfismos (FGFR3), síndrome de Pfeiffer (FGFR1), anormalidades dos membros e da face (FGFR2) (GILBERT, 2000).

3.2.3.4. Cbfa1 (referência: OMIM600211)

É também chamado de Runx2, PEBP2A ou Osf2.

É um gene crítico na regulação do desenvolvimento esquelético porque é necessário para a formação endocondral e intramembranosa do osso, e é suficiente para induzir hipertrofia prematura nos condrócitos. É essencial na diferenciação do osteoblasto e também na maturação dos condrócitos.

DUCY et al. (1997) encontraram que Cbfa1 é o componente homólogo de um componente de camundongo, o PEBP2, e demonstraram que o Cbfa1 é um fator de transcrição osteoblasto-específico e um regulador da diferenciação desta célula.

É um regulador direto da osteocalcina e de outros genes nos osteoblastos, e pode regular de forma direta os genes que caracterizam a hipertrofia dos condrócitos.

A expressão do VEGF é acentuada pela presença do Cbfa1 em fibroblastos na cultura do tecido, sugerindo que este gene é um regulador importante da ossificação endocondral controlando a maturação dos condrócitos, a diferenciação dos osteoblastos e a angiogênese no osso em formação.

KOMORI et al. (1997), e posteriormente OTTO et al. (1997), geraram um camundongo com uma mutação no *locus* do Cbfa1 e verificaram que os camundongos homozigóticos morriam de falta de ar após o nascimento. Avaliações mostravam que havia uma grande ossificação do esqueleto. Embora houvesse a presença de osteoblastos imaturos, que expressassem fosfatase alcalina, poucos osteoclastos imaturos apareciam na região do pericôndrio, e nenhuma invasão vascular ou de células mesenquimais foram observadas, sugerindo que as ossificações intramembranosa e endocondral foram bloqueadas e que o Cbfa1 possui papel essencial na osteogênese.

A expressão deste gene e a formação do colar ósseo são dependentes da expressão do *lhh* nos condrócitos pré-hipertróficos.

YOSHIDA et al. (2004) encontraram que camundongos “knockout” para Runx2, expressavam níveis reduzidos de *Ihh*, no qual regula a proliferação e maturação dos condrócitos. A introdução de Runx2 nos camundongos Runx2-deficientes reestabelecia a expressão de *Ihh*. O Runx2 se ligava diretamente a região promotora do gene *Ihh* e induzia a expressão de um gene dirigido pelo promotor do *Ihh*.

As vias de sinalização acima citadas possuem papéis fundamentais no processo de ossificação, porém, com o advento da Biologia Celular, outros fatores e vias de sinalização estão surgindo e ganhando destaque dentro do processo de desenvolvimento da cartilagem e dos ossos.

CROWE, ZIKHERMAN e NISWANDER (1999), em estudos utilizando com vias de sinalização Delta/Notch com hibridização, onde Delta-1 é expresso especificamente nos condrócitos hipertróficos enquanto que o Notch-2 é expresso em todos os estágios dos condrócitos, demonstraram que em galináceos, esses genes regulam negativamente a progressão do estado de diferenciação pré-hipertrófico para o hipertrófico em condrócitos.

TSUMAKI et al. (1999), em estudo com camundongos transgênicos, identificou ainda que proteínas morfogenéticas derivadas de cartilagem (CDMP-1) na notocorda inibem a formação do corpo vertebral bloqueando a migração das células do esclerótomo para a notocorda, sugerindo o envolvimento desta proteína na formação, crescimento e diferenciação do esqueleto.

A gama de fatores endócrinos e genéticos envolvidos no processo da ossificação seja ela intramembranosa ou endocondral, é muito extensa. Além dos fatores anteriormente descritos, podemos ainda citar genes como *Pbx1* e *c-myc*, receptores para o hormônio tireóideo, fatores ciclina-quinase dependentes, que possuem importantes papéis também na proliferação e diferenciação dos condrócitos no processo de ossificação endocondral.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. O Equipamento de Ultra-Som

O equipamento utilizado neste trabalho foi desenvolvido no departamento de Bioengenharia da Escola de Engenharia de São Carlos - USP pelo Prof. Dr. Luiz Romariz Duarte. O aparelho utilizado neste trabalho foi o de modelo EUCO™, IMBRASOM.

Na tabela 7, estão mostrados os parâmetros físicos do ultra-som utilizados neste estudo.

TABELA 7. Parâmetros físicos do Ultra-som.

Forma da Onda	Pulsada
Largura do pulso	200 μ s
Intensidade acústica	30 mW.cm ⁻²
Frequência de repetição	1 kHz
Frequência do P.Z.T.	1,5 MHz
Área do transdutor	4,9 cm ²
Potência	114 mW

Como parte da metodologia, o equipamento de ultra-sonografia foi calibrado em balança de força de radiação (modelo UPM-DT 10, Ohmic Instruments, EUA), alocada no laboratório de bioengenharia, pelo menos uma vez por mês durante o período dos experimentos.

FIGURA 16. Ultra-som pulsado de baixa intensidade (EUCO™ modelo. 1131-G - Imbrasom, Brasil).

4.1.2. Animais de Experimentação

Para o estabelecimento e manutenção de linhagens isogênicas, acasalam-se irmãos, por pelo menos 20 gerações. Como resultado, algumas características parentais são fixadas e outras perdidas, os genes presentes em cada par cromossômico são idênticos (indivíduo homozigoto) e todos os indivíduos de uma linhagem são geneticamente iguais entre si. Através desse tipo de acasalamento quase toda a variabilidade genética é eliminada, resultando em indivíduos com características uniformes que podem ser mantidas. Para animais cruzados ao acaso é difícil avaliar as mudanças genéticas resultantes de cruzamentos direcionais ou de mutação, sendo o melhor controle genético o tamanho da população e a manutenção rígida de um bom esquema de acasalamento. Para animais isogênicos deve ser possível

avaliar o quanto eles são iguais entre si, dentro de uma mesma linhagem, e também comparar a mesma linhagem criada por diferentes biotérios. Existem poucas linhagens isogênicas de ratos, hamster, e cobaia, sendo o camundongo o animal de laboratório mais utilizado no estabelecimento de linhagens isogênicas.

Atualmente existem mais de 500 linhagens de camundongos. Cada linhagem apresenta um conjunto de características distintas de fundamental importância para a experimentação biológica. As linhagens mais utilizadas na pesquisa são BALB/c, C57BL/6, DBA/2, CBA/J, A/J, etc. Os princípios válidos para monitoramento genético de ratos, hamsters, e cobaias são os mesmos válidos para camundongos. (Biotério FMRP – comunicação pessoal).

No presente estudo, foram utilizados camundongos isogênicos recém-nascidos e adultos das linhagens C57BL6 e BALB/C, de ambos os sexos, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

Esses animais foram transportados para o biotério do “Centro Universitário Barão de Mauá”, onde permaneceram pelo menos 24 horas para aclimação e posterior realizações dos experimentos.

Foram utilizados 60 animais entre adultos com aproximadamente 30g de peso, e recém nascidos com aproximadamente 1,5g de peso. Os animais adultos, antes e durante o período experimental, ficaram confinados em gaiolas coletivas (5 animais por gaiola) em ambiente climatizado, recebendo ração adequada e água à vontade, enquanto que os animais recém nascidos eram mantido em gaiolas isoladas sob amamentação até o momento dos experimentos.

Figura 17. Grupo de animais utilizados no experimento. Em A, um grupo de camundongos da linhagem Balb/C isogênicos. B mostra o acondicionamento dos animais durante o período de experimento com água e ração à vontade. C, camundongo da linhagem C57BL/6. D, camundongos recém-nascidos.

4.2. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.2.1. Esterilização dos materiais cirúrgicos

Os materiais foram embrulhados em papel alumínio e colocados em uma caixa de alumínio. A caixa foi então embrulhada em papel “Kraft” e colocada em autoclave para esterilizar a 121°C, por 20 minutos. Após este período a caixa foi retirada do aparelho e colocada em estufa a 70°C por 24 horas para secagem completa do material.

4.2.2. Técnicas de Implantes

Para este trabalho, dois tipos de implantes foram realizados. Os camundongos isogênicos C57BL/6 sofreram implantes de cauda no subcutâneo, enquanto que, os camundongos isogênicos BALB/C, receberam implantes intramusculares. O material implantado constou de segmentos de caudas de animais recém-nascidos com aproximadamente 7,5 mm, inseridas no subcutâneo e no músculo dos animais adultos.

Os animais eram anestesiados com injeção de 200 mg/Kg de cloridrato de ketamina (Ketamina Agener®) e 100 mg/Kg de xilazina (Rompun®). A seguir, os animais eram colocados sobre uma prancha cirúrgica e imobilizados para realização dos atos operatórios.

Figura 18. Materiais cirúrgicos e anestésicos.

4.2.2.1. Implantes Subcutâneos

Após tricotomia da área dorsal do tórax dos camundongos C57BL/6 isogênicos, fez-se a anti-sepsia da área com algodão embebido em álcool iodado. Uma incisão mediana da região dorsal sobre a coluna vertebral, entre as duas escápulas de aproximadamente 1,0 cm de comprimento foi executada com lâmina de bisturi nº 20 (B.S. 2982 Sheffield® - England), expondo-se a seguir, o plano correspondente ao tecido da tela subcutânea.

Simultaneamente, os animais recém-nascidos C57BL/6 eram mortos por decapitação e, suas caudas, removidas cirurgicamente e de forma asséptica, e introduzidas na espessura da tela subcutânea do animal adulto receptor.

4.2.2.2. Implantes Intramusculares

Para o experimento com implantação intramuscular, o procedimento realizado foi similar ao do transplante subcutâneo.

Após tricotomia e assepsia da pele que recobre o músculo glúteo maior, fez-se secção dos planos superficiais e das fibras do músculo glúteo do camundongo isogênico BALB/C, receptor do implante intramuscular.

Simultaneamente, camundongos recém-nascidos BALB/C foram mortos por decapitação e tiveram suas caudas removidas como descrito para os implantes no subcutâneo. As caudas foram então implantadas por entre as fibras do músculo glúteo maior do animal receptor adulto.

Após a implantação da cauda quer no subcutâneo quer no músculo, a síntese da pele ou do músculo seccionado foi realizada mediante pontos separados com fio de nylon 3-0 (Polycot *ETHICON* Johnson & Johnson LTDA.). Após a sutura das incisões, uma nova assepsia do local foi realizada utilizando-se álcool iodado, e os animais foram recolocados no biotério.

4.2.3. Aplicações do U.S.P.

Após um período de 48 horas, os animais foram retirados do biotério e divididos em grupos. As linhagens de camundongos (BALB/C e C57BL/6), com seus respectivos implantes, foram subdivididas em grupos controles e grupos estimulados, que foram submetidos à ação do U.S.P. seguindo os parâmetros do U.S.P citados à tabela 7, por 10 minutos de duração, durante 5 dias consecutivos sempre no mesmo período circadiano.

Em ambos os grupos implantados, o grupo controle foi submetido a um estímulo fictício (“sham operation”).

Para a realização da aplicação do U.S.P., uma farta camada de gel acoplante (MedSystems - Flexor Indl. e coml. LTDA - Sertãozinho-SP) foi adicionada à pele sobre a região do transplante e o transdutor acoplado de maneira estacionária. Nos grupos controles, realizaram-se os mesmos procedimentos, porém sem a estimulação ultra-sônica (“sham operation”).

FIGURA 19. Aplicação do ultra-som pulsado de baixa intensidade. No detalhe o gel acoplante.

4.2.4. Morte dos animais e coleta do material

Após 7 dias de implante das caudas dos recém-nascidos, os animais foram mortos mediante dose excessiva de hidrato de cloral, e os implantes foram retirados cirurgicamente de forma asséptica.

As caudas implantadas foram removidas com auxílio de pinça oftálmica e tesoura, e imediatamente colocadas em recipientes de vidro devidamente identificados, contendo solução fixadora de formol tamponado a 10% por um período de 48 horas.

4.2.5. Análise Histopatológica

Os segmentos de caudas, após fixação, foram incluídos em parafina segundo técnicas rotineiras e após, cortados em micrótomo para a confecção dos cortes com 6 μ m de espessura.

Os segmentos da cauda de ambos os grupos, incluídos em parafina foram cortados em micrótomo, obtendo-se cortes com a espessura de 6 μ m.

Os cortes provindos de caudas implantadas no subcutâneo foram submetidos à coloração de Ácido Periódico e Reativo de Schiff associado ao azul de Alcian (PAS/AB), e os cortes provindos de caudas implantadas intramuscularmente, foram submetidos a coloração de Tricrômico de Masson (TM), de acordo com técnicas padronizadas.

Após montagem entre lâminas e lamínulas, passou-se a observação sob microscópio de luz comum (Lambda®).

Figura 20. Resumo esquemático do procedimento experimental.

4.2.6. Avaliação Microscópica e Estatística dos Implantes

Campos aleatórios, diferentes entre si, dos cortes foram fotografados com auxílio de um fotomicroscópio *Axiophot Carl Zeiss* em objetivas de 10X e 40X, em filme Kodak ULTRA 35mm (Kodak da Amazônia Ind. e Com. Ltda, Brasil) e revelados posteriormente.

Para se determinar o aumento final dos cortes utilizou-se uma escala padronizada de aumento para revelação associada ao aumento do microscópio de luz comum.

As fotomicrografias foram então varridas por um Scanner (CanoScan modelo FB320P, CanonTM) e armazenadas em um diretório do computador para análise das áreas de interesse por um programa de computador específico para tal finalidade, o ImageJ 1,33m (Wayne Rasband – National Institutes of Health, USA). Essas fotomicrografias foram também utilizadas para análise morfológica das caudas implantadas, uma vez que se puderam visualizar diferenças entre o material controle e estimulado quanto à coloração e morfologia das células.

Para análise estatística, as fotomicrografias foram analisadas da seguinte forma: as áreas do corpo vertebral, dos centros de ossificação da vértebra, disco intervertebral e seus componentes individuais, anel fibroso e núcleo pulposo, foram delimitadas manualmente por uma ferramenta de polígono livre e então o programa fornecia a medida da área relativa a este polígono e o desvio padrão correspondente em micrometros (figura 21). Essas medidas foram então armazenadas em outro programa, o Excel (Office 2003 – Service Pack 2, Microsoft).

Figura 21. Marcação das áreas pelo programa ImageJ 1,33m. Em pontilhados a delimitação do núcleo pulposo. A janela acima representa a barra de ferramentas do programa e abaixo a representação da janela de resultados mostrando as medias da área delimitada e o desvio padrão fornecido pelo programa dados em μm .

Para avaliação estatística e gráficos, os dados armazenados em planilhas do programa Excel foram transportados para um programa específico para análises estatísticas, o Microcal™ Origin™ versão 5.0 (Microcal Software Inc., Northampton, MA 01060, USA), e os testes de escolha para esta avaliação foram o *Teste de Fisher* seguido pelo *Teste t de Student*, utilizando-se 5% de nível de significância.

5. RESULTADOS

Os resultados deste estudo serão baseados no estudo da morfologia e da quantificação dos componentes estruturais dos segmentos de camundongos recém-nascidos implantados em camundongos isogênicos adultos das linhagens BALB/C e C57BL/6, que foram ou não submetidos à aplicação do U.S.P..

A análise morfológica dos cortes histológicos dos segmentos dos implantes demonstra diferenças na ação do U.S.P. em relação às estruturas da coluna vertebral, tanto no grupo de animais que recebeu o implante subcutâneo como no que recebeu o implante intramuscular.

As figuras 22A, 22C e 22B, 22D correspondem respectivamente a cortes de 6µm das caudas implantadas no subcutâneo dos animais adultos controles e após 5 dias de aplicação do U.S.P., corados pelo PAS/AB. Nota-se uma desorganização dos condrócitos situados próximos ao disco intervertebral no animal submetido à ação do U.S.P. na região anular da superfície do corpo vertebral (epífises anulares), indicando hipertrofia destas células em crescimento, enquanto no animal controle, essa hipertrofia se restringiu a um pequeno espaço localizado na região central da epífise anular, próximo ao disco intervertebral. Além disso, o disco intervertebral sofreu uma grande diminuição em relação ao seu tamanho, principalmente em relação à porção do núcleo pulposos, que no animal sob ação do U.S.P., quase desapareceu. A porção correspondente ao anel fibroso do disco intervertebral tornou-se mais densa após a aplicação do U.S.P..

Figura 22. Implante de cauda de recém nascido no subcutâneo do receptor adulto. A e C representam o animal controle e B e D o animal sob efeito do U.S.P. Notar acima comparativamente a diminuição do tamanho relativo ao disco intervertebral ( ); as áreas de ossificação das epífises anulares das vértebras com aproximação dos condrócitos hipertrofiados ao centro do disco intervertebral ( ); aumento da densidade da fibrocartilagem na porção do anel fibroso do disco intervertebral ( ). As áreas intensamente coradas em azul representam áreas em ossificação, determinada pela reação do PAS/AB. Coloração de PAS/AB. Aumentos finais de Ca de 1600x e 6400x.

Ainda em relação aos implantes no subcutâneo pôde-se observar nas caudas, aumentos significativos das áreas de ossificação no centro dos corpos vertebrais nos animais submetidos ao U.S.P., indicando maior atividade de ossificação nesses locais, como mostra a figura 23.

Ainda diante a coloração do PAS/AB, pôde-se observar tanto na figura 22 quanto na figura 23B, um predomínio da cor azul em relação à vermelha nos cortes, indicando a presença de mucopolissacarídeos ácidos (reação de azul de Alcian), em relação à cor vermelha relativa aos mucopolissacarídeos neutros (reação de PAS positiva) nesses locais, indicando uma precocidade no processo de ossificação.

Figura 23. Caudas de recém nascidos implantados no subcutâneo dos animais adultos. A representa o animal controle e B o animal submetido à ação do U.S.P. ➡ Mostra o aumento das áreas de ossificação na região do disco intervertebral; note que o espaço relativo ao núcleo pulposos quase desapareceu e possui também células em ossificação indicado pela cor azul da reação do Alcian. ➡ Mostra a área de ossificação no centro do corpo vertebral, indicando aceleração do crescimento ósseo quando o animal foi submetido à aplicação do U.S.P. Coloração de HE e PAS/AB respectivamente. Aumentos finais de Ca de 1600x.

As figuras 24 e 25 mostram os cortes de 6µm de caudas implantadas em músculos de animais adultos. A e C representam cortes de implantes de animais controles e B e D representam cortes de implantes de animais após 5 dias de aplicação do U.S.P. Os cortes foram corados com Tricrômico de Masson.

Nos animais que receberam 5 dias de aplicação do U.S.P., nota-se um aumento aparente do tamanho do corpo vertebral em relação aos dos animais controles, que sofreram “sham-operation”. Ainda em relação ao corpo vertebral, os animais controles apresentaram um resquício de notocorda passando pelo centro do corpo vertebral, enquanto que os animais sob estímulo do U.S.P. apresentaram uma diminuição ou ausência deste resquício. As áreas de ossificação localizadas no centro do corpo vertebral mostraram-se aumentadas nos animais submetidos à ação do U.S.P., apresentando uma área de condrócitos hipertrofiados, indicando etapas de ossificação acentuada mais adiantadas nesses locais. Em relação às áreas de ossificação nas epífises anulares das vértebras, a hipertrofia dos condrócitos ficou bem menos evidenciada (figura 24).

As regiões relativas ao anel fibroso do disco intervertebral se apresentaram mais densas e aparentemente com maior número de fibras (fibrocartilagem) nos animais sob ação do U.S.P. Nota-se ainda nesses animais, um afrouxamento no aspecto das células presentes na matriz de ácido hialurônico no interior do núcleo pulposo, enquanto que nos animais controles essa matriz ainda permanece em grande quantidade e suas células se apresentam de aspecto mais denso no interior do mesmo (figuras 24B e 24D, e 25B e 25D).

Não foi realizada nos implantes intramusculares a coloração de PAS/AB, não sendo, portanto, possível visualizar-se a presença de mucopolissacarídeos ácidos e neutros presentes na ossificação como fora realizado nos implantes subcutâneos de caudas.

Figura 24. Implante de cauda de camundongo recém-nascido no músculo glúteo maior do camundongo adulto. A e C representam os animais controles e B e D os animais sob efeito do U.S.P. Observar o aspecto do núcleo pulposo com as células da matriz de ácido hialurônico mais espaçadas no animal sob ação do U.S.P. ➡ ; No que diz respeito a região ossificação no centro do corpo vertebral, esta é bem maior no animal sob efeito do U.S.P. ➡ ; Há um aumento discreto da densidade de fibrocartilagem no anel fibroso do disco intervertebral nos animais submetidos ao U.S.P. ➡ ; A seta ➡ indica a presença nítida de notocorda nos animais controles, note a diminuição ou a ausência desta nos animais tratados. Coloração de Tricrômico de Masson. Aumentos finais de Ca de 1600x.

Figura 25. Caudas implantadas no músculo de camundongos adultos. A e C são animais controles e B e D são animais submetidos à ação do U.S.P. As setas ➡ indicam a porção do anel fibroso do disco intervertebral. Note o aumento do número de células cartilaginosas no interior das fibras do animal sob efeito do U.S.P. ; A seta ➡ indica a presença da notocorda no animal controle, note que no animal onde fora aplicado o U.S.P. esse resquício não aparece; Os animais controles apresentam uma organização dos condrocitos comparados aos submetidos a ação do U.S.P, as células estão desorganizadas e os condrocitos com maior hipertrofia ➡ ; **Coloração de Tricrômico de Masson. Aumentos finais de Ca de 6400x.**

Para confirmação dos efeitos do U.S.P. sobre os blastemas de cauda implantados em camundongos isogênicos adultos foram ainda, quantificadas as áreas relativas ao tamanho do corpo vertebral, área do centro de ossificação localizado no centro do corpo vertebral, área total do disco intervertebral bem como seus componentes separadamente, anel fibroso e núcleo pulposo, comparando-se as áreas dos animais sob efeito ou não do U.S.P.

Utilizando-se o teste de *Fisher* para análise de variâncias, seguido do teste *t de Student*, fez-se uma análise comparativa dos cortes obtidos dos animais submetidos ou não a ação do U.S.P. dentro de cada grupo de implante, subcutâneo e intramuscular, separadamente.

Não foi realizada a análise comparativa da ação do U.S.P. entre o grupo de implante intramuscular e o grupo de implante subcutâneo, pelos testes estatísticos utilizados, já que foram utilizadas linhagens diferentes de animais isogênicos, não sendo, portanto, indicada este tipo de análise. Os gráficos a seguir mostram apenas a diferença de médias entre os grupos.

A área relativa ao corpo vertebral não se mostrou com diferenças significativas em ambos os testes aplicados entre os animais controles e àqueles submetidos à ação do U.S.P. tanto no implante subcutâneo, quanto no implante intramuscular. Pôde-se apenas observar um discreto aumento das médias do grupo submetido ao U.S.P. em relação ao controle ($0,02 \leq p \leq 0,05$).

A tabela 8 mostra os valores de área do corpo vertebral expressos pelas médias das áreas, desvios padrões e erros padrões das médias relativos aos implantes subcutâneos e intramusculares.

Tabela 8. Valores descritivos das áreas relativas ao Corpo Vertebral em mm².

CORPO VERTEBRAL				
Tipo de Implante	Tratamento	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão da Média
Subcutâneo	Controle	191,335	97,316	28,093
	U.S.P.	196,512	84,643	24,434
Intramuscular	Controle	100,509	27,418	12,262
	U.S.P.	128,196	30,067	13,446

A figura 26 trás a representação gráfica das médias das áreas de corpo vertebral relativas aos implantes subcutâneo e intramuscular.

Figura 26. Representação gráfica das médias das áreas relativas aos corpos vertebrais.

Ainda em relação ao corpo vertebral, verificou-se também a área de ossificação da parte central do corpo das vértebras.

Para as áreas de ossificação central do corpo da vértebra, a análise da variância pelo teste de Fisher não mostrou diferença entre as amostras controles e as amostras sob o efeito do U.S.P., em ambos os tipos de implantes, porém ao aplicar-se o teste t, houve uma diferença significativa entre as médias das amostras submetidas ao U.S.P. em relação ao controle ($p \leq 0,05$).

A tabela 9 informa os dados de médias, desvios padrões e erros padrões da média para os implantes subcutâneo e intramuscular para áreas dos centros de ossificação do interior dos corpos vertebrais.

Tabela 9. Valores descritivos das áreas relativas à Ossificação do Corpo Vertebral em mm².

OSSIFICAÇÃO DO CENTRO DO CORPO VERTEBRAL				
Tipo de Implante	Tratamento	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão da Média
Subcutâneo	Controle	23,040	15,236	7,618
	U.S.P.	19,092	10,301	5,151
Intramuscular	Controle	24,144	8,190	3,663
	U.S.P.	22,426	7,869	3,519

A figura 27 trás a representação gráfica das médias das áreas dos centros de ossificação do corpo vertebral relativas aos implantes subcutâneo e intramuscular.

Figura 27. Representação gráfica das médias das áreas relativas aos centros de ossificação dos corpos vertebrais.

Em relação ao disco intervertebral, houve diferença entre o grupo controle e o estimulado, nas amostras relativas ao implante subcutâneo em ambos os testes aplicados.

No implante intramuscular, não foram observados diferenças no tamanho do disco intervertebral, entre os animais controles e os tratados com o U.S.P. tanto no teste de Fisher como no teste t de Student.

A tabela 10 informa os dados de médias, desvios padrões e erros padrões da média para os implantes subcutâneo e intramuscular para áreas do disco intervertebral.

Tabela 10. Valores descritivos das áreas relativas aos discos intervertebrais em mm².

DISCO INTERVERTEBRAL				
Tipo de Implante	Tratamento	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão da Média
Subcutâneo	Controle	46,855	53,991	17,997
	U.S.P.	26,119	11,534	3,845
Intramuscular	Controle	20,246	6,779	3,032
	U.S.P.	27,806	6,217	2,780

A figura 28 trás a representação gráfica das médias das áreas do disco intervertebral relativas aos implantes subcutâneo e intramuscular.

Figura 28. Representação gráfica das médias das áreas relativas aos discos intervertebrais.

Em relação aos componentes do disco intervertebral, não houve diferença significativa no núcleo pulposo entre os animais controles e os submetidos à ação do U.S.P. em ambos os tipos de implante, quando analisados pelo teste de Fisher, porém, ao aplicar-se o teste t de Student, pôde-se observar uma diminuição significativa nas médias das áreas apenas no implante subcutâneo ($p \leq 0,05$).

A análise pelo teste de Fisher revelou que houve uma mudança na área relativa ao anel fibroso do disco intervertebral no implante subcutâneo, mas nenhuma modificação no implante intramuscular. Ao realizar-se o teste t foi detectada uma diferença significativa entre as amostras controles e às submetidas ao U.S.P., em ambos os tipos de implantes.

A tabela 11 informa os dados de médias, desvios padrões e erros padrões da média para os implantes subcutâneo e intramuscular para áreas do núcleo pulposo.

Tabela 11. Valores descritivos das áreas relativas ao núcleo pulposo em mm².

NÚCLEO PULPOSO				
Tipo de Implante	Tratamento	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão da Média
Subcutâneo	Controle	15,680	14,357	4,785
	U.S.P.	10,072	8,397	2,799
Intramuscular	Controle	11,088	3,099	1,386
	U.S.P.	15,844	6,187	2,767

A figura 29 trás a representação gráfica das médias das áreas do núcleo pulposo relativas aos implantes subcutâneo e intramuscular.

Figura 29. Representação gráfica das médias das áreas relativas aos núcleos pulposos.

A tabela 12 informa os dados de médias, desvios padrões e erros padrões da média para os implantes subcutâneo e intramuscular para áreas do anel fibroso do disco intervertebral.

Tabela 12. Valores descritivos das áreas relativas aos Anéis Fibrosos em mm².

ANEL FIBROSO				
Tipo de Implante	Tratamento	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão da Média
Subcutâneo	Controle	30,939	40,738	13,579
	U.S.P.	16,603	6,454	2,151
Intramuscular	Controle	9,158	3,94353	1,7636
	U.S.P.	15,026	3,17118	1,41819

A figura 30 trás a representação gráfica das médias das áreas do anel fibroso relativas aos implantes subcutâneo e intramuscular.

Figura 30. Representação gráfica das médias das áreas relativas aos anéis fibrosos.

Os dados das amostras e as análises estatísticas pelo *teste de Fisher* e pelo teste *t de Student* estão demonstradas nos Anexos C e D.

6. DISCUSSÃO

O ultra-som é uma forma de energia mecânica que é transmitida ao corpo através de ondas de pressão acústica de alta frequência. O U.S.P. pode ser usado para produzir tensões e deformações micromecânicas em tecidos, promove formação óssea por produzir uma força de natureza mecânica e esta tem ação sobre o metabolismo ósseo como previsto pela lei de Wolf (GAMA, 2002).

Embora se tenha muito pesquisado não foram encontradas referências em relação à utilização do U.S.P. em cultivos de blastemas em modelos *in vivo*, senão por um trabalho onde os autores utilizam o U.S.P. para analisar a maturação dos condrócitos *in vivo* dos implantes de células no subcutâneo de camundongos. Nenhum trabalho utilizando implantes intramusculares foi encontrado.

O objetivo deste estudo foi determinar se o U.S.P. é capaz de atuar no processo de ossificação de blastemas da coluna vertebral. Como em camundongos, modelo experimental utilizado neste trabalho, a cauda é um prolongamento da coluna vertebral, implantes de caudas de animais isogênicos recém-nascidos foram realizados em dois locais diferentes, na tela subcutânea, e por entre as fibras do músculo glúteo maior de camundongos isogênicos adultos, seguidos de aplicações do U.S.P..

Para tal, foram realizados cortes histológicos das caudas implantadas seguidos pela determinação das áreas dos componentes da coluna vertebral, vértebra e disco intervertebral, dos animais submetidos e não submetidos à ação do U.S.P.

O fato de terem sido utilizadas duas linhagens diferentes de camundongos, não permitindo assim, a avaliação estatística comparativa entre os implantes subcutâneos e intramusculares, se deu devido ao fato de que, ao se realizar o implante subcutâneo da cauda no animal da linhagem Balb/C, esta se aderiria ao tecido e o material era perdido completamente com 5 dias de aplicação do U.S.P., ao contrário dos animais C57BL/6. Por outro lado, não conseguiu-se realizar o implante intramuscular nos camundongos da linhagem C57BL/6, que talvez por sua menor estrutura, expelia a cauda implantada no 2º dia de aplicação do U.S.P.

Desse modo, as comparações entre os implantes serão realizadas apenas com base nos cortes histológicos de 6 µm das caudas dos recém nascidos implantadas, em colorações específicas, PAS/AB e Tricrômico de Masson.

Analisando as lâminas histológicas relativas aos experimentos de implantes subcutâneos e intramusculares, observou-se um discreto aumento do corpo vertebral nos animais, que tiveram aplicação do U.S.P. em relação aos controles. Porém, ao analisar-se as áreas dos centros de ossificação vertebral, estas se mostraram significativamente aumentadas quando se aplicou o U.S.P., em ambos os experimentos. Nos implantes intramusculares, essas áreas se mostraram muito mais delimitadas, e a hipertrofia dos condrócitos ficou muito mais visível, quase formando um polígono perfeito na região central do corpo vertebral, enquanto que, nos implantes subcutâneos, essas áreas eram bem menos delimitadas e os condrócitos hipertrofiados bem menos organizados.

Em relação à epífise anular das vértebras, os implantes subcutâneos que sofreram aplicação do U.S.P. tiveram áreas de ossificação com hipertrofia de condrócitos maiores em relação aos animais que sofreram implantes intramusculares também seguidos de aplicação do U.S.P., além de uma maior aproximação desses condrócitos hipertrofiados em direção ao núcleo pulposo no centro do disco intervertebral.

As vértebras se formam por um processo de ossificação endocondral, a partir de um modelo cartilaginoso. Os condrócitos hipertróficos aparecem durante a fase de maturação da cartilagem, e é bem conhecido que esses

condrócitos fazem parte de um passo crítico na formação óssea, embora o processo não seja ainda bem estabelecido (ZHANG, 2002).

A resposta fisiológica do osso a forças mecânicas inclui a formação, deposição e reabsorção do mesmo. Como um resultado, não é de se surpreender que em nível celular o U.S.P. tenha mostrado aumentar a captura do cálcio em culturas de cartilagem e de células ósseas, e desempenhe um papel na modulação da síntese do TGF- β e resposta do hormônio paratireoideo em células mesenquimais e osteoblastos (RYABY et al, 1989, 1992). Em condrócitos, o ultra-som regula a expressão de proteínas de matriz extracelular e fenótipos do colágeno, precursores na formação do osso endocondral. (PARVISI et al, 1999). Assim, o U.S.P. pode ter tido maior efeito nas regiões das epífises anulares, onde existe mais matriz extracelular nos implantes subcutâneos, o que explicaria a aproximação dos condrócitos ao núcleo pulposo do disco intervertebral. Nas vértebras, funcionariam como a cartilagem de crescimento dos ossos longos garantindo o aumento do tamanho dos corpos vertebrais.

Outro fato importante a se observar é a presença da notocorda em alguns corpos vertebrais de animais que sofreram implantes intramusculares. Em implantes subcutâneos não foi observado nenhum resquício de notocorda nos corpos vertebrais dos animais.

A notocorda é um conglomerado colunar de células, que constituem o esqueleto axial e mesenquimal primitivo no embrião e a base do esqueleto axial adulto (coluna vertebral, costelas, esterno e crânio). É a estrutura em torno da qual se constituirá a coluna vertebral e a notocorda integrando o elemento funcional importante, o núcleo pulposo.

Geralmente, a notocorda degenera e desaparece nos locais onde fica rodeada pelos esclerótomos dos futuros corpos vertebrais em desenvolvimento. Entre as vértebras, parte dela permanece para formar o centro gelatinoso do disco intervertebral, o núcleo pulposo, que mais tarde é envolvido pelo anel fibroso, para constituir o disco intervertebral (MOORE & PERSAUD, 1995).

Resquícios desta notocorda podem persistir, dando origem a um *cordoma*, que ocorre mais freqüentemente na região do crânio e na região

lombosacra, e que pode ser visto nos animais controles do grupo de implante intramuscular. Quando se aplicou o U.S.P. esse cordoma entrou em processo de degeneração e se não desapareceu completamente, restou apenas um resquício visto por uma linha no centro da vértebra, o que pode sugerir que o U.S.P. acelerou a evolução da mesma.

Em relação ao disco intervertebral, pôde-se observar que nos implantes subcutâneos, diminuiu substancialmente nos animais sob efeito do U.S.P. em relação aos controles, enquanto nos implantes intramusculares, pôde-se observar um pequeno aumento do disco intervertebral.

Analisando separadamente os componentes do disco intervertebral, no implante subcutâneo houve uma diminuição da matriz de ácido hialurônico nos animais onde se aplicou o U.S.P., além de uma diminuição da quantidade de células no interior dessa matriz, células essas que se mostram mais densas nos controles. No que diz respeito aos implantes intramusculares, houve uma modificação da forma do núcleo pulposo nos animais sob efeito do U.S.P., além de um pequeno aumento de tamanho do mesmo. Além disso, as células da matriz de ácido hialurônico diminuem em quantidade nos animais que sofreram ação do U.S.P., enquanto nos controles isso não ocorre. Em relação à porção do anel fibroso do disco intervertebral, a fibrocartilagem aparece mais densa no animal que recebeu aplicação do U.S.P. em ambos os experimentos, porém está aparentemente mais visível nos implantes subcutâneos.

A formação do disco intervertebral se dá a partir de condensações de células mesenquimais em torno da notocorda, chamadas de esclerótomo. Esse esclerótomo consiste em células organizadas de maneira frouxa cefalicamente e de maneira densa caudalmente. Algumas dessas células na porção do esclerótomo segmentar deslocam-se caudalmente para o segmento cefálico do metâmero inferior. Os miótomos que se relacionavam com os metâmeros inicialmente segmentares passaram a se relacionar com os intersegmentares constituídos das fusões, e dá origem ao disco intervertebral (MOORE & PERSAUD, 1995).

Quando o núcleo pulposo é formado no centro do disco intervertebral, o restante da notocorda entra em degeneração e desaparece, porém, algumas vezes, elas permanecem como no caso do cordoma.

A diminuição das células da matriz de ácido hialurônico foi mais bem visualizada nos implantes subcutâneos, onde em alguns pontos do núcleo pulposo, quase não se observam células. Nos implantes intramusculares houve uma diminuição das células na substância do núcleo pulposo.

Além de promover a degeneração dessas células no interior da matriz de ácido hialurônico, o U.S.P. modificou a morfologia do núcleo pulposo e do anel fibroso, em ambos os tipos de implantes.

A modificação da morfologia do núcleo pulposo no implante intramuscular poderia ser explicada pelo fato de que o U.S.P. acelerou a involução da notocorda para a constituição do núcleo pulposo do disco intervertebral definitivo.

O comportamento do anel fibroso nos discos intervertebrais dos animais submetidos à ação do U.S.P. parece ter acelerado mostrando maior densidade da fibrocartilagem tanto nos implantes subcutâneos, quanto nos implantes intramusculares. No implante subcutâneo, as células da fibrocartilagem se mostraram mais organizadas, com núcleos bem delimitados comparados aos controles. No implante intramuscular as células da fibrocartilagem nos animais submetidos a ação do U.S.P. se apresentaram em maior número, mas não tão organizadas como ocorrera no implante subcutâneo, além do que, nos animais controles, embora se encontrasse aparentemente menor número de células, em alguns casos, não se conseguia diferenciar essa observação.

As modificações na definição da morfologia do núcleo pulposo e conseqüentemente, de maturidade do disco intervertebral, com o aumento da densidade dos componentes do anel fibroso, ocasionadas pela aplicação do U.S.P., poderiam ser explicadas por uma propriedade física da onda acústica emitida pelo U.S.P.

Conforme a distância em que o transdutor ultra-sônico é colocado da sua fonte, a intensidade da onda diminui, devido ao espalhamento e à absorção do meio em que ela é aplicada, é a chamada *atenuação* da onda. A atenuação é dependente de um coeficiente e da espessura do meio. Na pele, este coeficiente tem um valor menor do que no músculo, ou seja, essa perda de intensidade é menor. Desse modo, o U.S.P. poderia ser mais efetivo nos implantes subcutâneos.

Outra característica de relevância é a histoquímica aplicada aos cortes das caudas provindos dos implantes subcutâneos. A coloração do Azul de Alcian associada ao Reativo de Schiff (PAS/AB), tem a capacidade de corar os mucopolissacarídeos ácidos em azul e neutros em vermelho.

FERREIRA e LISON (1964), estudando os mucopolissacarídeos ácidos e neutros presentes nas cartilagens da laringe humana, determinaram que com o passar dos anos, os mucopolissacarídeos neutros substituem os ácidos no processo de envelhecimento da laringe, que em alguns casos tendem à ossificação.

O predomínio da cor azul nos cortes histológicos dos implantes corados com PAS/AB indicaria que há um predomínio de mucopolissacarídeos ácidos nos animais controles. A cor azul nos cortes histológicos dos animais onde se aplicou o U.S.P. é menos intensa, indicando um início de substituição dos mucopolissacarídeos ácidos corados em azul pelos neutros, corados em púrpura. Segundo a proposta dos autores acima citados, isso significaria que o U.S.P. acelerou o processo de maturidade dos condrócitos no sentido da constituição da ossificação.

Os resultados obtidos aqui vão de encontro aos resultados obtidos por DUDA et al (2004). Um modelo de cartilagem articular constituído de células cartilaginosas de úmero de bois adicionadas a fibrinogênio e trombina foi criado, e implantado no subcutâneo de camundongos homozigóticos atímicos nus (nude mice). Um tratamento com o U.S.P. de 20 minutos diários, 7 vezes por semana, foi aplicado nos camundongos implantados. Este estudo demonstrou que não houve efeito do U.S.P. nas células cartilaginosas do

modelo, ou que o U.S.P. só atuaria em fases iniciais da ossificação, embora, quando aplicado em fraturas, apresente efeitos benéficos acelerando o reparo das fraturas.

Em experimentos pilotos anteriormente realizados, foram aplicados o U.S.P. diretamente na cauda dos animais com 7 dias de vida. A análise histológica das caudas proporcionou um resultado diferente do obtido quando se realizou o implante intramuscular e subcutâneo. Ao contrário da desorganização dos condrócitos hipertrofiados apresentada em ambos os tipos de implantes, há divisão das zonas de ossificação da cartilagem, onde se visualizam as espículas ósseas, as zonas de cartilagem calcificada organizada, e as zonas de cartilagem hipertróficas. A aplicação do U.S.P. diretamente na cauda aumenta visivelmente a zona de cartilagem hipertrofiada da epífise anular da vértebra. Além disso, a aplicação direta nas caudas aumenta sensivelmente as células de fibrocartilagem do anel fibroso, envolvendo todo o núcleo pulposo, o que não ocorre quando se faz os implantes.

Esses achados, juntamente àqueles encontrados nos implantes subcutâneos e intramusculares, indicam que o U.S.P. não atua somente nas fases iniciais da condrogênese, e sim, em fases mais adiantadas do processo também.

7. CONCLUSÃO

O estudo comparativo de implantes subcutâneos e intramusculares, estimulados ou não pelo U.S.P. permite concluir que a irradiação ultra-sônica de baixa intensidade promove mais rapidamente a diferenciação ontogenética dos constituintes estruturais da coluna vertebral de camundongos, mediante a avaliação da ossificação endocondral das vértebras e a diferenciação dos componentes do disco intervertebral, segundo a metodologia empregada.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZUMA, Y. et al. (2001). Low intensity pulsed ultrasound accelerates rat femoral fracture healing by acting on the various cellular reactions in fracture callus. *Journal of Bone and Mineral Research*.v.16, p.671-680, abr.

ALVARENGA, A.V., MACHADO, J.C., PEREIRA, W.C.A. (2001) Implementação do protocolo para obtenção de parâmetros do feixe acústico de transdutores ultra-sônicos usados em medicina. *Revista Brasileira de Engenharia Biomédica*. v. 17, nº 3, p.151-153. Out/Dez.

BASSOLI, D.A. (2001). *Avaliação dos Efeitos do Ultra-som pulsado de baixa intensidade na regeneração de músculos esqueléticos com vistas à aplicabilidade em clínica fisioterapêutica*. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo – USP. São Carlos.

BARON, J., KLEIN, K.O., YANOVSKI, J.A. et al. (1994) Induction of Growth Plate Cartilage Ossification by Basic Fibroblast Growth Factor. *Endocrinology*. v. 135, nº.6, p 2790-2793. may.

BIANCO, P., CANCEDDA, F.D., RIMINUCCI, M., CANCEDDA R. (1998) Bone formation via cartilage models: the “borderline” chondrocyte. *Matrix Biology*. v.17, nº 3. p. 185-92. jul.

BIOTÉRIO CENTRAL DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO. Obtenção de camundongos isogênicos. Comunicação pessoal.

BLOOM, W., FAWCETT. (1986) *A Textbook of Histology*. 11th ed. Filadélfia: WB Saunders.

CAMPOS JR, A. (2004) Informações Científicas sobre as Proteínas Morfogenéticas Ósseas. IBAP, Instituto de Tecnologia Aplicada. Disponível em <http://www.bmp.com.br/bmp/main>. Acesso em 23 de novembro de 2004.

CARBONARI, R.C. (2003) *Projeto de atuadores piezelétricos flexionais usando o método de otimização topológica*. Dissertação (Mestrado). Escola Politécnica. Universidade de São Paulo – USP. São Paulo, 2003.

CARVALHO, D.C.L. (2001) *Ação do Ultra-som de baixa intensidade em ossos de ratas osteopênicas*. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo – USP. São Carlos, 2001.

COOK, D.C. et al. (2001) Improved Cartilage Repair after treatment with low-intensity pulsed ultrasound. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. n°.391S, pp. S231-S243. oct.

COOK, D.C. (1999) Treatment of osteochondral defects with low-intensity pulsed ultrasound. In: ANNUAL MEETING OF AMERICAN ACADEMY OF ORTHOPAEDIC SURGEONS. Poster Exhibits. 1999.

CRISCI, A.R. (2001) *Estudo experimental dos efeitos do ultra-som pulsado de baixa intensidade sobre a regeneração do nervo ciático de ratos após neurotomia, mediante avaliações morfológicas e morfométricas*. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo – USP. São Carlos, 2001.

CROWE, R. ZIKHERMAN, J. NISWANDER, L. (1999) Delta-1 negatively regulates the transition from prehypertrophic to hypertrophic chondrocytes during cartilage formation. *Development*. v. 126. p. 987-998.

DUARTE, L.R. (1977) *Estimulação Ultra-Sônica do Calo Ósseo*. Tese de Livre Docência, Escola de Engenharia de São Carlos, USP, 1977.

DUARTE, L.R. (1983) The stimulation of bone growth by ultrasound. *Archives of Orthopaedics and Traumatology Surgery*. v.101, p. 153-159.

DUDA, G.N., KLISHE, A., KLEEMANN, R. et al. (2004) Does Low-Intensity Pulsed Ultrasound Stimulate Maturation of Tissue-Engineered Cartilage? *Journal of Biomechanical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. v.68B, n°1, p. 21-28.

DUCY, P.; ZHANG, R.; GEOFFROY, V.; RIDDALL, A. L.; KARSENTY, G. (1997) *Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. Cell* . v. 89, p 747-754.

DYSON, M. Mechanisms Involved in Therapeutic (1987). *Ultrasound Physiotherapy*. v. 73, n.3, p.116-120. mar.

ENOMOTO-IWAMOTO, M. et al. (1998) Bone Morphogenetic Protein Signaling Is Required for Maintenance of Differentiated Phenotype, Control of Proliferation, and Hipertrophy in Chondrocytes. *The Journal of Cell Biology*. v.140. n°2. p. 409-419. jan.

FERREIRA, A.L., LISON, L. (1964) *Determinação quantitativa dos mucopolissacárides ácidos e neutros em cartilagens da laringe humana em diferentes idades (Estudo histofotométrico em dois comprimentos de ondas)*. Apresentado à XVI Reunião da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência. Ribeirão Preto, jul. 1964.

FREDERICK, J.R. (1965). *Ultrasound Engineering*. New York: John Willey & Sons. 379p.

FUKADA & YASUDA. (1957) On piezeletric effect of bone. *Journal of Physical Society of Japan*. v. 12, n.10, p.1152-1162.

GAMA, L.O.R. (2002) *Artrodese Atlanto-axial em cães tratada por ultra-som de baixa intensidade*. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos. São Carlos, 2002.

GARTNER, L.P., HIATT, J.L. (1997) *Color Textbook of histology*. Saunders Company: Philadelphia, Pennsylvania.

GILBERT,S.F. (2000) Osteogenesis: the development of bones – Endochondral ossification. *In: Developmental Biology*, 6th ed. Sunderland: Sinauer. Eletronic Book. Disponível em: www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=books

GUIRRO, R. GUIRRO, E. (2002). Ultra-som. *In: Fisioterapia Dermatofuncional – Fundamentos, Recursos, Patologias*. 3^a ed. São Paulo: Manole. 560p.

HADDAD, S. (1992) *Estímulo do testículo de ratos pré-púberes, púberes e adultos com ultra-som pulsado de baixa intensidade*. Ribeirão Preto. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo – USP, 1992.

HALL, B.K., MIYAKE, T. (1995) Divide, accumulate, differentiate: cell condensation in skeletal development revisited. *Int. J. Dev. Biol*, v. 39, n°.6., p. 881-93. dec.

HILL, C.R. Ultrasonic Exposure Threshold for Changes in Cells and Tissues. *The Journal of the Acoustical Society of America*. v. 52. p. 667-72.

ITO, M., AZUMA, Y., OHTA, T., KOMORIYA K. (2000) Effects of ultrasound and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on growth factor secretion in co-cultures of osteoblasts and endothelial cells. *Ultrasound in Medicine & Biology*. v.26, n.1, pp 161-166.

KOMORI, T. et al. (1997) Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell*. v. 89. p. 755-764.

KRISTIANSEN, T.K., THOMAS K., BURLINGTON, M.D., et al. (1997) Accelerated Healing of distal radial fractures with the use of specific, low-intensity ultrasound. A multicenter, prospective, randomized, double-blind,

placebo-controlled study. *Journal of Bone and Joint Surgery American*. v. 79-A, nº 7, p. 961-73.

LEITE, A. J. (1989) *Quantificação da ruptura celular produzida por ultra-som em eritrócitos do sangue humano*. Ribeirão Preto. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Filosofia, Ciência e Letras. Universidade de São Paulo. 1989.

MAXWELL, L. (1995) Therapeutic Ultrasound and tumor mutagenesis. *Physiotherapy*. v. 81 (5), p. 272-5.

McGROUTHER, R.A. (1994). Hypertrophic or Keloid scars? *Eye*. v. 8, p. 200-3.

MININA, E. et al. (2001) BMP and Ihh/PTHrP signaling interact to coordinate chondrocytes proliferation and differentiation. *Development*. v. 128, p. 4523-4534, aug.

MOORE, KL & PERSAUD, TVN. (1995) *Embriologia Básica*. 4ª ed. Filadélfia: WB Saunders, 1995

NOLTE, P.A. et al. (1999) Low intensity pulsed ultrasound stimulates in vitro endochondral ossification. *Calcified Tissue International*, v.64 (Suppl.1), p.552, may.

NYBORG, W.L. (2000) Biological effects of ultrasound: Development of safety guidelines. Part I: Personal Histories. *Ultrasound in Med. & Biol.* v. 26, n° 6. pp 911-964.

OBERLENDER, S.A., TUAN, R.S. (1994) Expression and functional involvement of N-cadherin in embrionic limb chondrogenesis. *Development.* v. 120, n° 1, p. 177-87.

OKUNO, E., CALDAS, I.L., CHOW, C. (1986). *Física para Ciências Biológicas e Biomédicas*. São Paulo: Harba, 490p.

OMIM™ and Online Mendelian Inheritance in Man™. *Runt-Related Transcription Factor 2 - Runx2*. Johns Hopkins University. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispmim.cgi?id=600211>> Acesso em 06/12/2004.

OTTO, F. et al. (1997) Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell.* v. 89, p.765-771.

PARVISI, J., WU, C.C., LEWALLEN, D.G., et al. (1999) Low intensity pulsed ultrasound stimulates proteoglycan synthesis in rat chondrocytes by increasing aggrecan gene expression. *J. Orthop. Trauma*. v.4. p. 246-253.

RICHARDSON, P.D. (1989) Piezoelectric Polymers. IEEE. *Medicine and Biology Magazine*. jun.

ROSEMBERG, A. (2000) Ossos, Articulações e Tumores de Partes Moles. In: COTRAM, S.R., KUMAR, V., COLLINS, T. Robbins, Patologia Estrutural e Funcional, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

RYABY, J.T., BACHNER, E.J., BENDO, J.A. et al. (1989) Low-intensity pulsed ultrasound increases calcium incorporation in both differentiating cartilage and bone cell cultures. *Transaction of the Orthopedic Research Society*. p. 14-15.

RYABY, J.T., MATHEW, J., DUARTE-ALVES, P. (1992) Low intensity pulsed ultrasound affects adenylate cyclase and TGF- β synthesis in osteoblastic cells. *Transaction of the Orthopedic Research Society*. n°.17, p.590.

SAKURAKICHI, K. TSUCHIRA H, UEHARA K., et al. (2004) Effects of timing of low-intensity pulsed ultrasound on distraction osteogenesis. *Orthopedics Research*, v.22, n°2., p. 395-403, mar.

SILVA, O.L. (1987) *Estudo do Mecanismo da ação do ultra-som na estimulação do crescimento ósseo*. São Carlos, 1987. 209p. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo – USP, 1987.

SHUKUNAMI, C. et al. (1996) Chondrogenic Differentiation of Clonal Mouse Embryonic Cell Line ATDC5 In Vitro: Differentiation-dependent Gene Expression of Parathyroid Hormone (PTH)/PTH-related Peptide Receptor. *The Journal of Cell Biology*, v. 133, n.º 2, p. 457-468. Apr.

SHUM, L., NUCKOLLS, G. (2002) The life cycle of chondrocytes in the developing skeleton. *Arthritis Research*. v. 4. p.94-106.

TER HAAR, G., DANIELS, S., EASTAUGH, K.C., HILL, C.R. (1982) Ultrasonically induced cavitation. *British Journal of Cancer*, v. 45. suppl. 5, n.º. 151

TER HAAR, G. (1987) Tissue regeneration. In: REPACHOLI, M.H. et al. *Ultrasound medical applications, biological effects and hazard potencial*. New York: Plenum Press, 1987.

TER HAAR, G. *Physic of therapeutic ultrasound*. London. *Physiotherapy*. v. 73, n.3, mar., 1987.

TSUMAKI, N. et al. (1999) Role of CDMP-1 in Skeletal Morphogenesis: Promotion of Mesenchymal Cell Recruitment and Chondrocyte Differentiation. *The Journal of Cell Biology*, v. 144, n°1, jan.

UGLOW, M.G., et al. (2003) Low intensity ultrasound stimulation in distraction osteogenesis in rabbits. *Clinical Orthopaedics*. n.º 417, pp. 303-12, dec.

URIST, M.R. (1965) Bone: Formation by autoinduction. *Science*. v. 12 n.º 150 (698), p. 893-9. nov.

VERERAGAVAN, P.E., EFRAT, M.O., PINES, M. et al. (2002) The IIIc alternative of Fgfr2 is a positive regulator of bone formation. *Development* v. 129, p. 3783-3793.

WEIR, E.C. et al. (1996) Targeted overexpression of parathyroid hormone-related peptide in chondrocytes causes chondrodysplasia and delayed endochondral bone formation. *Developmental Biology*. v.93. p. 10240-10245, sep.

WEISS, R.E., REDDI, A.H. (1981) Appearance of fibronectin during the differentiation of cartilage, bone, and bone marrow. *Journal of Cell Biology*. v.88, n°. 3, p. 630-6.

WELLS, P.N.T. (1977). *Velocity, absorption and attenuation biological materials*. In: *Biomedical Ultrasonics*. London: Academic Press, 635p, 1977.

WILLIAMS, R.A. (1983) *Ultrasound: biological effect and potential hazards*. London: Academic Press, 1983.

YAMAGUSHI, A., KOMORI, T., SUDA, T. (2000) Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morfogenetic proteins, Hedgehog e Cbfa1. *Endocrine Reviews*. v. 21, n°.4, p. 393-411. aug.

YASODA. A., OGAWA, Y., SUDA, M. et al. (1998) Natriuretic Peptide Regulation of Endochondral Ossification. *The Journal of Biological Chemistry*. v.273, n.19, p.11695-11700, may.

YASUI, N. et al. (1997) Three modes of ossification during distraction osteogenesis in the rat. *Journal of Bone and Joint Surgery*. v. 79. n°. 5. p 824-30.

YOSHIDA, C. A et al. (2004) Runx2 and Runx3 are essential for chondrocyte maturation, and Runx2 regulates limb growth through induction of Indian hedgehog. *Genes Development*. v.18. p. 952-963.

YOUNG, S.R. & DYSON, M. (1978) Macrophage responsiveness to therapeutic ultrasound. *Ultrasound in Medicine and Biology*. v. 16, n. 8, p. 809-816.

YOUNG, S.R. (1990) *The effect of therapeutic ultrasound on the biological mechanisms involved in dermal repair*. London Thesis (PhD): University of London, 1990.

ZISKIN, M.C. (1989) *Report on Safety of the therasonics medical systems*. (Exogen. Inc) SAPHs Unit, Model 2A. PMA 8900009, v. 3, VI. A, -234, 1989.

ZISKIN, M.C., LEWIN P.A. (1993) Physical of Ultrasound. In: *Ultrasonic Exposimetry*. Boca Ranton: Academic Press. Cap.1, p.37, 1993.

APÊNDICE - Colorações e Soluções Utilizadas

1. Coloração Simultânea Azul de Alcian - Ácido Periódico de Schiff (PAS/AB)

Freqüentemente o mesmo tecido tem células ou material intercelular com polissacarídeos que apresentam os grupos 1-2 glicol e polissacarídeos ácidos e neste caso, esta técnica é muito útil. Há também algumas células que apresentam esses dois tipos de polissacarídeos co-existindo no seu citoplasma. Esta técnica consiste em corar primeiro os polissacarídeos ácidos com o Alcian. Nesta etapa, os polissacarídeos ácidos que contém os grupos 1-2 glicol não vão mais se corar com o PAS. Tratam-se, a seguir, os cortes pelo PAS que corará os polissacarídeos neutros.

Procedimento

1. Fixar em formol 10%. Incluir em parafina, cortar a 7 µm, desparafinar os cortes e lavar em água.
2. Corar na solução de Alcian Blue a 1% em ácido acético a 3%, durante 30 minutos.
3. Lavar em água destilada.
4. Ácido periódico 1% por 5 minutos.
5. Lavar em água destilada.
6. Reagente de Schiff por 15 minutos.
7. Água corrente de 5 a 10 minutos.
8. Corar rapidamente com hematoxilina (metade do tempo usual).
9. Lavar.
10. Desidratar, diafanizar e montar em resina (Entellan[®] - Merck).

Resultados: polissacarídeos ácidos em azul celeste, polissacarídeos neutros com grupamento 1-2 glicol em vermelho. Núcleos corados em azul forte ou preto.

Reativos

Azul de Alcian pH 2,5

Solução aquosa a 1% de Alcian Blue 8GX em ácido acético 3% que resultarão pH 2,5.

Reagente de Schiff

Dissolver 1,0g de fucsina básica em 200ml de água destilada. Levar à fervura e deixar esfriar até 50°C. Filtrar. Adicionar 1g de metabissulfito de potássio (ou sódio), dissolver e depois acrescentar 20 ml de ácido clorídrico 1N. Guardar a solução no escuro por 24h e depois usar. Esta solução deve ter descorado para uma cor vermelha pálido ou palha.

Atenção: o metabissulfito deve ser ativo. Conhece-se isto pelo seu forte cheiro característico. Para testar, pingam-se gotas dele em mm de formol 10%. Se ficar vermelho púrpuro está boa.

2. Coloração de Tricrômico de Masson – “tempo rápido”

Procedimento

1. Desparafinar e hidratar
2. Tratamento prévio com Solução de Dubosq-Brasil, em estufa por 30 minutos.
3. Retirar o excesso do ácido pícrico em Carbonato de Lítio (solução saturada).

4. Lavar em água corrente.
5. Corar pela hematoxilina de Groat por 10 minutos.
6. Lavar em água corrente.
7. Lavar em água acética 1%.
8. Rouge Mallory por 10 minutos ou menos.
9. Lavar em água acética 1%.
10. Ácido fosfomolibdico 10% por 10 minutos.
11. Lavar em água acética 1%.
12. Verde Luz – Vert Lumieri 1% ou Azul Anilina 1% – Light Green por 10 minutos.
13. Lavar em água acética 1%.
14. Desidratar, diafanizar e montar.

Resultados: os tecidos musculares ficarão corados em vermelho; tecido conjuntivo corado em verde ou azul, e os núcleos ficarão arroxeados.

Soluções e Reativos

Rouge Mallory:

Fucsina ácida	1,0 g
Ácido acético	0,4 g
Orange G.....	3,0 mL
Água destilada	300 mL

Vert Lumiere – Light Green

Light Green	1,0 g
Água destilada	100 mL
Ácido acético	1,0 mL

Hematoxilina de Groat

Solução A:	Álcool 95° ou 100°	50 mL
	Hematoxilina	0,5 g
Solução B:	Água destilada	50 mL
	Ácido sulfúrico concentrado	0,8 mL
	Alúmen de ferro e amônio	1,0 g

Misturar solução A e B em partes iguais e depois dobrar o volume com água destilada.

Obs.: Essa solução dura até 60 dias.

Fixador Bouin - Alcoólica ou Dubosq - Brasil

Álcool 80%	600 mL
Ácido pícrico	4,0 g
Formol 40%	240 mL

Fixação: Duas horas para fragmento pequeno.

Nota: Para cada 35 mL desta solução, acrescentar 2,5 mL de ácido acético glacial na hora do uso.

3. Coloração de Hemalumen - Eosina - Floxina

A hematoxilina não age como corante, mas sim o seu produto de oxidação, a hemateína. A oxidação natural produz-se pela exposição à luz e ao ar, e a oxidação química pela ação do iodato de potássio e o óxido de mercúrio. Por sua vez, para corar o tecido a hemateína necessita de um mordente (sais de alumínio, ferro e tungstênio) prévio ou incorporado na própria solução de hematoxilina.

Solução Hematoxilina de Harris

Cristais de hematoxilina.....	5,0 g
Álcool absoluto.....	50 mL
Aluimen de potássio ou amônio.....	100 g
Água destilada.....	1000 mL
Óxido vermelho de mercúrio.....	2,5 g

Dissolver a hematoxilina no álcool absoluto e o alúmen de potássio na água destilada e quente. Em seguida, misturar ambas as soluções lentamente e ferver aproximadamente um minuto. Quando abrir fervura, retirar o balão do fogareiro e acrescentar óxido vermelho mercúrio lentamente. Tornar a colocar o balão no fogareiro e aquecer até abrir fervura. Retirar imediatamente e esfriar rapidamente a solução colocando o balão dentro de um recipiente com água. Logo que estiver fria a solução estará pronta para uso.

Nota: quando se deseja ressaltar por menores nucleares é conveniente adicionar 2 mL de ácido acético glacial para cada 100 mL de solução de hematoxilina.

Solução estoque de eosina a 1%

Eosina (amarela).....	1 g
Água destilada	100 mL

Solução alcoólica de eosina-floxina

Solução estoque de Eosina a 1%.....	50 mL
Solução estoque de Floxina a 1%.....	5 mL
Álcool 95%.....	380 mL
Ácido acético glacial.....	2 mL

Fazer a solução corante quando necessário. Deve-se ser trocada pelo menos de 7 a 15 dias, devido ao ácido acético.

Solução de álcool-ácido

Álcool 70%..... 100 mL

Ácido clorídrico..... 1 mL

Solução de água amoniacal 0,5%

Água destilada..... 500 mL

Hidróxido de Amônio..... 2,5 mL

Nota: Usa-se também corar pela solução de eosina a 0,5% ou a 1% (solução aquosa) em vez de solução alcoólica de eosina-floxina. Quando se utiliza a solução aquosa de eosina não se deve passar pelo álcool 80% antes, só pela água.

Procedimento:

As secções de tecido devem estar nas lâminas e secas durante pelo menos 20 minutos à 56°C. As lâminas devem estar colocadas nos suportes próprios para coloração. Preparar a bateria da coloração na seguinte seqüência e nos determinados tempos consecutivos:

1. Xilol I - 15 minutos
2. Xilol II - 15 minutos (os xilóis têm como objetivo desparafinar as lâminas).
3. Álcool absoluto.

4. Álcool 95%.
5. Álcool 70%.
6. Água destilada.
7. Corar na hematoxilina de Harris aproximadamente 3 a 5 minutos, quando a solução estiver nova e 7 minutos ou mais, quando a solução estiver velha.
8. Lavar em água corrente.
9. Diferenciar pela solução álcool-ácido rapidamente.
10. Lavar em água corrente.
11. Azular os cortes pela solução de água amoniacal a 0,5% por aproximadamente 1 minuto.
12. Lavar em água corrente.
13. Colocar as lâminas no álcool 80%.
14. Corar pela solução de Eosina-Floxina por no máximo 40 segundos.

Em seguida, iniciaremos a desidratação imergindo rapidamente as lâminas nas seguintes soluções:

1. Álcool 70%.
2. Álcool 95%.
3. Álcool 100%. (3 tempos)
4. Xilol I.
5. Xilol II.
6. Xilol III (este permanece até a montagem com Entellan ou bálsamo do Canadá).

Resultados: núcleos em azul; citoplasma, fibras colágenas e elásticas e neurofibrilas em vermelho.

**ANEXO A - Representação das Áreas das Estruturas da Coluna Vertebral
para Implante Subcutâneo.**

Implante Subcutâneo - Áreas em mm ²									
<i>Área Total ± SD*</i>									
Corpo Vertebral		OCCV**		Disco Intervertebral		Núcleo Pulposo		Fibrocartilagem	
Controles	U.S.P.	Controles	U.S.P.	Controles	U.S.P.	Controles	U.S.P.	Controles	U.S.P.
363,04 ± 0,11	361,33 ± 0,06	16,68 ± 0,01	17,40 ± 0,04	133,52 ± 0,03	39,24 ± 0,03	36,47 ± 0,04	11,60 ± 0,03	97,05 ± 0,04	27,64 ± 0,03
258,52 ± 0,10	345,51 ± 0,06	15,52 ± 0,02	12,81 ± 0,02	138,64 ± 0,03	29,29 ± 0,03	35,97 ± 0,04	5,60 ± 0,03	102,67 ± 0,04	23,69 ± 0,03
351,72 ± 0,12	226,77 ± 0,08	14,12 ± 0,01	12,03 ± 0,01	13,83 ± 0,03	19,79 ± 0,03	2,55 ± 0,06	5,97 ± 0,03	11,40 ± 0,03	13,82 ± 0,03
264,90 ± 0,10	199,36 ± 0,06	45,84 ± 0,03	34,13 ± 0,01	11,14 ± 0,06	22,70 ± 0,02	8,36 ± 0,06	5,02 ± 0,02	2,78 ± 0,06	17,68 ± 0,02
146,61 ± 0,06	122,45 ± 0,02			9,15 ± 0,02	15,93 ± 0,03	2,43 ± 0,02	6,22 ± 0,04	7,51 ± 0,03	9,71 ± 0,04
141,33 ± 0,07	123,18 ± 0,02			8,04 ± 0,02	13,76 ± 0,03	1,64 ± 0,05	4,39 ± 0,03	6,36 ± 0,02	9,37 ± 0,03
116,39 ± 0,03	113,06 ± 0,04			69,65 ± 0,06	14,39 ± 0,02	29,12 ± 0,03	4,07 ± 0,01	40,53 ± 0,04	10,32 ± 0,02
98,45 ± 0,02	142,34 ± 0,03			17,49 ± 0,03	34,92 ± 0,03	11,12 ± 0,02	19,74 ± 0,01	6,37 ± 0,03	20,18 ± 0,02
74,97 ± 0,01	110,07 ± 0,03			20,24 ± 0,04	45,06 ± 0,03	13,46 ± 0,02	28,04 ± 0,01	3,78 ± 0,03	17,02 ± 0,02
210,41 ± 0,02	209,23 ± 0,02								
136,95 ± 0,02	207,66 ± 0,02								
132,73 ± 0,01	197,19 ± 0,02								

* Áreas e desvios padrões fornecidos pela análise do programa ImageJ.

**Área de ossificação central do corpo vertebral

**ANEXO B - Representação das Áreas das estruturas da coluna vertebral para
o Implante intramuscular.**

Implante Intramuscular - Áreas em mm ²									
<i>Área Total ± SD *</i>									
Corpo Vertebral		HCCV		Disco Intervertebral		Núcleo Pulposos		Fibrocartilagem	
Controles	U.S.P.	Controles	U.S.P.	Controles	U.S.P.	Controles	U.S.P.	Controles	U.S.P.
65,85 ± 0,03	138,66 ± 0,04	23,08 ± 0,02	34,34 ± 0,03	16,88 ± 0,04	22,28 ± 0,05	8,44 ± 0,03	19,65 ± 0,03	8,44 ± 0,04	15,94 ± 0,04
114,55 ± 0,02	100,64 ± 0,06	19,77 ± 0,03	21,70 ± 0,03	16,56 ± 0,04	20,12 ± 0,05	9,16 ± 0,03	9,44 ± 0,03	7,40 ± 0,04	19,84 ± 0,04
136,95 ± 0,02	100,46 ± 0,03	27,14 ± 0,02	13,30 ± 0,04	31,95 ± 0,04	34,33 ± 0,05	15,91 ± 0,03	9,12 ± 0,03	16,04 ± 0,04	14,89 ± 0,04
83,78 ± 0,02	172,67 ± 0,02	36,23 ± 0,01	18,25 ± 0,04	15,56 ± 0,04	30,95 ± 0,04	9,48 ± 0,02	22,62 ± 0,02	6,08 ± 0,03	11,70 ± 0,03
101,42 ± 0,04	128,55 ± 0,04	14,50 ± 0,02	24,54 ± 0,02	20,28 ± 0,04	31,35 ± 0,04	12,45 ± 0,02	18,39 ± 0,03	7,83 ± 0,03	12,76 ± 0,04

* Áreas e desvios padrões fornecidos pela análise do programa ImageJ.

**Área de ossificação central do corpo vertebral.

ANEXO C - Análises Estatísticas para o Grupo de Implante Subcutâneo.

1. Análise de Variância das Amostras: Teste de Fisher

Corpo Vertebral (Controle)		Corpo Vertebral (U.S.P.)	
x_i	x_i^2	x_i	x_i^2
363,04	131798,0416	361,33	130559,3689
258,52	66832,5904	345,51	119377,1601
351,72	123706,9584	226,77	51424,6329
264,9	70172,01	199,36	39744,4096
146,61	21494,4921	122,45	14994,0025
141,33	19974,1689	123,18	15173,3124
116,39	13546,6321	113,06	12782,5636
98,05	9613,8025	142,34	20260,6756
74,97	5620,5009	110,07	12115,4049
210,41	44272,3681	209,23	43777,1929
136,95	18755,3025	207,66	43122,6756
132,73	17617,2529	197,19	38883,8961
$\Sigma x_i = 2.295,62$	$\Sigma x_i^2 = 543404,1204$	$\Sigma x_i = 2.358,15$	$\Sigma x_i^2 = 542.215,2951$

$$H_0: s_1^2 = s_2^2$$

$$H_A: s_1^2 \neq s_2^2$$

$$n_1 = 12$$

$$v = 11$$

$$SS_1 = 543404,1204 - \frac{(2295,62)^2}{12} = 104.248,19 \text{ mm}^2$$

$$s_1^2 = SS_1 / v$$

$$s_1^2 = 104.248,19 / 11 = 9.477,11 \text{ mm}^2$$

$$n_2 = 12$$

$$v = 11$$

$$SS_2 = 542215,2951 - \frac{(2358,15)^2}{12} = 78.809,34 \text{ mm}^2$$

$$s_2^2 = SS_2 / v$$

$$s_2^2 = 78.809,34 / 11 = 7164,48 \text{ mm}^2$$

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} = \frac{9.477,11}{7.164,48} = 1,32$$

$$F_{0,05(2),11,11} \sim 3,28 \text{ (tabela F)} \rightarrow F < F_{0,05(2),11,11}$$

Portanto, aceita-se H_0 ($s_1^2 = s_2^2$)

Melhor estimador da variância desta população é:

$$S_p^2 = \frac{104248,19 + 78809,34}{11 + 11} = 8320,80 \text{ mm}^2$$

Ossificação Centro Vértebra (Controle)		Ossificação Centro Vértebra (U.S.P.)	
xi	xi ²	xi	xi ²
16,68	278,2224	17,4	302,76
15,52	240,8704	12,81	164,0961
14,12	199,3744	12,03	144,7209
45,84	2101,3056	34,13	1164,8569
$\Sigma x_i = 92,16$	$\Sigma x_i^2 = 2819,7728$	$\Sigma x_i = 76,37$	$\Sigma x_i^2 = 1776,4339$

$$H_0: s_1^2 = s_2^2$$

$$H_A: s_1^2 \neq s_2^2$$

$$n_1 = 4$$

$$v = 3$$

$$SS_1 = 2819,7728 - \frac{(92,16)^2}{4} = 696,41 \text{ mm}^2$$

$$s_1^2 = SS_1 / v$$

$$s_1^2 = 696,41 / 3 = 232,13 \text{ mm}^2$$

$$n_2 = 4$$

$$v = 3$$

$$SS_2 = 1776,4339 - \frac{(76,37)^2}{4} = 318,34 \text{ mm}^2$$

$$s_2^2 = SS_2 / v$$

$$s_2^2 = 318,34 / 3 = 106,11 \text{ mm}^2$$

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} = \frac{232,13}{106,11} = 2,19$$

$$F_{0,05(2),3,3} = 15,44 \text{ (tabela F)} \rightarrow F < F_{0,05(2),3,3}$$

Portanto, aceita-se H_0 ($s_1^2 = s_2^2$)

Melhor estimador da variância desta população é:

$$S_p^2 = \frac{696,41 + 318,34}{3 + 3} = 123,39 \text{ mm}^2$$

Disco Intervertebral (Controle)		Disco Intervertebral (U.S.P.)	
x_i	x_i^2	x_i	x_i^2
133,52	17827,5904	39,24	1539,7776
138,64	19221,0496	29,29	857,9041
13,83	191,2689	19,79	391,6441
11,14	124,0996	22,7	515,29
9,15	83,7225	15,93	253,7649
8,04	64,6416	13,76	189,3376
69,65	4851,1225	14,39	207,0721
17,49	305,9001	34,92	1219,4064
20,24	409,6576	45,06	2030,4036
$\Sigma x_i = 421,70$	$\Sigma x_i^2 = 43079,05$	$\Sigma x_i = 235,08$	$\Sigma x_i^2 = 7204,6004$

$$H_0: s_1^2 = s_2^2$$

$$H_A: s_1^2 \neq s_2^2$$

$$n_1 = 9$$

$$v = 8$$

$$SS_1 = 43079,05 - \frac{(421,70)^2}{9} = 23.320,07 \text{ mm}^2$$

$$s_1^2 = SS_1 / v$$

$$s_1^2 = 23.320,07 / 8 = 2915,01 \text{ mm}^2$$

$$n_2 = 9$$

$$v = 8$$

$$SS_2 = 7204,60 - \frac{(235,08)^2}{9} = 1064,31 \text{ mm}^2$$

$$s_2^2 = SS_2 / v$$

$$s_2^2 = 1064,31 / 8 = 133,04 \text{ mm}^2$$

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} = \frac{2915,01}{133,04} = 21,91$$

$$F_{0,05(2),8,8} \sim 4,43 \text{ (tabela F)} \rightarrow F > F_{0,05(2),8,8}$$

Portanto, rejeita-se H_0 ($s_1^2 = s_2^2$)

Melhor estimador da variância desta população é:

$$S_p^2 = \frac{23.330,07 + 1064,31}{8 + 8} = 1524,65 \text{ mm}^2$$

Núcleo Pulposo (Controle)		Núcleo Pulposo (U.S.P.)	
xi	xi ²	xi	xi ²
36,47	1330,0609	11,6	134,56
35,97	1293,8409	5,6	31,36
2,55	6,5025	5,97	35,6409
8,36	69,8896	5,02	25,2004
2,43	5,9049	6,22	38,6884
1,64	2,6896	4,39	19,2721
29,12	847,9744	4,07	16,5649
11,12	123,6544	19,74	389,6676
13,46	181,1716	28,04	786,2416
Σxi =141,12	Σxi² = 3861,6888	Σxi =90,65	Σxi² =1477,1959

$$H_0: s_1^2 = s_2^2$$

$$H_A: s_1^2 \neq s_2^2$$

$$n_1 = 9$$

$$v = 8$$

$$SS_1 = 3861,6888 - \frac{(141,12)^2}{9} = 1648,93 \text{ mm}^2$$

$$s_1^2 = SS_1 / v$$

$$s_1^2 = 1648,93 / 8 = 206,12 \text{ mm}^2$$

$$n_2 = 9$$

$$v = 8$$

$$SS_2 = 1477,1959 - \frac{(90,65)^2}{9} = 564,15 \text{ mm}^2$$

$$s_2^2 = SS_2 / v$$

$$s_2^2 = 564,15 / 8 = 70,52 \text{ mm}^2$$

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} = \frac{206,12}{70,52} = 2,92$$

$$F_{0,05(2),8,8} = 4,43 \text{ (tabela F)} \rightarrow F < F_{0,05(2),8,8}$$

Portanto, aceita-se H_0 ($s_1^2 = s_2^2$)

Melhor estimador da variância desta população é:

$$s_p^2 = \frac{1648,93 + 564,15}{8 + 8} = 138,32 \text{ mm}^2$$

Anel Fibroso (Controle)		Anel Fibroso (U.S.P.)	
x_i	x_i^2	x_i	x_i^2
97,05	9418,7025	27,64	763,9696
102,67	10541,1289	23,69	561,2161
11,40	129,96	13,82	190,9924
2,78	7,7284	17,68	312,5824
7,51	56,4001	9,71	94,2841
6,36	40,4496	9,37	87,7969
40,53	1642,6809	10,32	106,5024
6,37	40,5769	20,18	407,2324
3,78	14,2884	17,02	289,6804
$\Sigma x_i = 278,45$	$\Sigma x_i^2 = 21891,9157$	$\Sigma x_i = 149,43$	$\Sigma x_i^2 = 2814,2567$

$$H_0: s_1^2 = s_2^2$$

$$H_A: s_1^2 \neq s_2^2$$

$$n_1 = 9$$

$$v = 8$$

$$SS_1 = 21.891,9157 - \frac{(278,45)^2}{9} = 13.276,98 \text{ mm}^2$$

$$s_1^2 = SS_1 / v$$

$$s_1^2 = 13276,98 / 8 = 1659,62 \text{ mm}^2$$

$$n_2 = 9$$

$$v = 8$$

$$SS_2 = 2814,2567 - \frac{(149,43)^2}{9} = 333,22 \text{ mm}^2$$

$$s_2^2 = SS_2 / v$$

$$s_2^2 = 333,22 / 8 = 41,65 \text{ mm}^2$$

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} = \frac{1659,62}{41,65} = 39,84$$

$$F_{0,05(2),8,8} = 4,43 \text{ (tabela F)} \rightarrow F > F_{0,05(2),8,8}$$

Portanto, rejeita-se H_0 ($s_1^2 = s_2^2$)

Melhor estimador da variância desta população é:

$$s_p^2 = \frac{13276,98 + 333,22}{8 + 8} = 850,64 \text{ mm}^2$$

2. Análise das Médias: teste t de Student

➤ CORPO VERTEBRAL

$$H_0: \mu_1 = \mu_2$$

$$H_A: \mu_1 \neq \mu_2$$

$$n_1 = 12$$

$$n_2 = 12$$

$$v = 11$$

$$v = 11$$

$$SS_1 = 104.248,19 \text{ mm}^2$$

$$SS_2 = 78.809,34 \text{ mm}^2$$

$$\bar{X}_1 = 191,335 \text{ mm}^2$$

$$\bar{X}_2 = 196,512 \text{ mm}^2$$

$$s_p^2 = \frac{104248,19 + 78809,34}{11 + 11} = 8320,80 \text{ mm}^2$$

$$s_{\bar{X}_1 - \bar{X}_2} = \sqrt{\frac{s_p^2}{n_1} + \frac{s_p^2}{n_2}} = \sqrt{\frac{8320,80}{11} + \frac{8320,80}{11}} = 38,895 \text{ mm}$$

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{s_{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}} = \frac{191,335 - 196,512}{38,895} = -0,133$$

$$t_{0,05(2), v} = t_{0,05(2), 22} = -2,074$$

Sendo t maior que -2,074 , **aceita-se H₀**.

➤ CENTRO DE OSSIFICAÇÃO DA VÉRTEBRA

$$H_0: \mu_1 = \mu_2$$

$$H_A: \mu_1 \neq \mu_2$$

$$n_1 = 4$$

$$v = 3$$

$$SS_1 = 696,41 \text{ mm}^2$$

$$\overline{X}_1 = 23,040 \text{ mm}^2$$

$$n_2 = 4$$

$$v = 3$$

$$SS_2 = 318,34 \text{ mm}^2$$

$$\overline{X}_2 = 19,092 \text{ mm}^2$$

$$s_p^2 = \frac{696,41 + 537,50}{3 + 7} = 123,39 \text{ mm}^2$$

$$s_{\overline{X}_1 - \overline{X}_2} = \sqrt{\frac{s_p^2}{n_1} + \frac{s_p^2}{n_2}} = \sqrt{\frac{123,39}{4} + \frac{123,39}{4}} = 5,554 \text{ mm}$$

$$t = \frac{\overline{X}_1 - \overline{X}_2}{s_{\overline{X}_1 - \overline{X}_2}} = \frac{23,040 - 19,092}{5,554} = 0,711$$

$$t_{0,05(2), v} = t_{0,05(2), 6} = 2,447$$

Sendo t menor que 2,447 , **rejeita-se H₀**.

➤ DISCO INTERVERTEBRAL

$$H_0: \mu_1 = \mu_2$$

$$H_A: \mu_1 \neq \mu_2$$

$$n_1 = 9$$

$$v = 8$$

$$SS_1 = 23.320,07 \text{ mm}^2$$

$$\overline{X}_1 = 46,855 \text{ mm}^2$$

$$n_2 = 9$$

$$v = 8$$

$$SS_2 = 1064,31 \text{ mm}^2$$

$$\overline{X}_2 = 26,119 \text{ mm}^2$$

$$s_p^2 = \frac{23.330,07 + 1064,31}{8 + 8} = 1524,65 \text{ mm}^2$$

$$s_{\overline{X}_1 - \overline{X}_2} = \sqrt{\frac{s_p^2}{n_1} + \frac{s_p^2}{n_2}} = \sqrt{\frac{1524,65}{9} + \frac{1524,65}{9}} = 18,407 \text{ mm}$$

$$t = \frac{\overline{X}_1 - \overline{X}_2}{s_{\overline{X}_1 - \overline{X}_2}} = \frac{46,855 - 26,119}{18,407} = 1,126$$

$$t_{0,05(2), v} = t_{0,05(2), 16} = 2,120$$

Sendo t menor que 2,120 , **rejeita-se H₀**.

➤ NUCLEO PULPOSO

$$H_0: \mu_1 = \mu_2$$

$$H_A: \mu_1 \neq \mu_2$$

$$n_1 = 9$$

$$v = 8$$

$$SS_1 = 1648,93 \text{ mm}^2$$

$$\overline{X}_1 = 15,680 \text{ mm}^2$$

$$n_2 = 9$$

$$v = 8$$

$$SS_2 = 564,15 \text{ mm}^2$$

$$\overline{X}_2 = 10,072 \text{ mm}^2$$

$$s_p^2 = \frac{1648,93 + 564,15}{8 + 8} = 138,32 \text{ mm}^2$$

$$s_{\overline{X}_1 - \overline{X}_2} = \sqrt{\frac{s_p^2}{n_1} + \frac{s_p^2}{n_2}} = \sqrt{\frac{138,32}{9} + \frac{138,32}{9}} = 5,544 \text{ mm}$$

$$t = \frac{\overline{X}_1 - \overline{X}_2}{s_{\overline{X}_1 - \overline{X}_2}} = \frac{15,680 - 10,072}{5,544} = 1,011$$

$$t_{0,05(2), v} = t_{0,05(2), 16} = 2,120$$

Sendo t menor que 2,120 , **rejeita-se H₀**.

➤ ANEL FIBROSO

$$H_0: \mu_1 = \mu_2$$

$$H_A: \mu_1 \neq \mu_2$$

$$n_1 = 9$$

$$v = 8$$

$$SS_1 = 13.276,98 \text{ mm}^2$$

$$\overline{X}_1 = 30,939 \text{ mm}^2$$

$$n_2 = 9$$

$$v = 8$$

$$SS_2 = 333,22 \text{ mm}^2$$

$$\overline{X}_2 = 16,603 \text{ mm}^2$$

$$s_p^2 = \frac{13276,98 + 333,22}{8 + 8} = 850,64 \text{ mm}^2$$

$$s_{\overline{X}_1 - \overline{X}_2} = \sqrt{\frac{s_p^2}{n_1} + \frac{s_p^2}{n_2}} = \sqrt{\frac{850,64}{9} + \frac{850,64}{9}} = 13,749 \text{ mm}$$

$$t = \frac{\overline{X}_1 - \overline{X}_2}{s_{\overline{X}_1 - \overline{X}_2}} = \frac{30,939 - 16,603}{13,749} = 1,043$$

$$t_{0,05(2), v} = t_{0,05(2), 16} = 2,120$$

Sendo t menor que 2,120 , **rejeita-se H₀**.

ANEXO D - Análises Estatísticas para o Grupo de Implante Intramuscular.

1. Análise de Variância das Amostras: Teste de Fisher

Corpo Vertebral (Controle)		Corpo Vertebral (U.S.P.)	
x_i	x_i^2	x_i	x_i^2
65,85	4.336,22	138,66	19226,5956
114,55	13.121,70	100,64	10128,4096
136,95	18.755,30	100,46	10092,2116
83,78	7.019,09	172,67	29814,9289
101,42	10.286,02	128,55	16525,1025
$\Sigma x_i = 502,55$	$\Sigma x_i^2 = 53.518,33$	$\Sigma x_i = 640,98$	$\Sigma x_i^2 = 85.787,25$

$$H_0: s_1^2 = s_2^2$$

$$H_A: s_1^2 \neq s_2^2$$

$$n_1 = 5$$

$$v = 4$$

$$SS_1 = 53.518,33 - \frac{(502,55)^2}{5} = 3007,03 \text{ mm}^2$$

$$s_1^2 = SS_1 / v$$

$$s_1^2 = 3.007,03 / 4 = 751,76 \text{ mm}^2$$

$$n_2 = 5$$

$$v = 4$$

$$SS_2 = 85.787,25 - \frac{(640,98)^2}{5} = 3616,18 \text{ mm}^2$$

$$s_2^2 = SS_2 / v$$

$$s_2^2 = 3616,18 / 4 = 904,04 \text{ mm}^2$$

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} = \frac{751,76}{904,04} = 0,83 \text{ mm}^2$$

$$F_{0,05(2),4,4} = 9,60 \text{ (tabela F)} \rightarrow F < F_{0,05(2),4,4}$$

Portanto, aceita-se H_0 ($s_1^2 = s_2^2$)

Melhor estimador da variância desta população é:

$$s_p^2 = \frac{3007,03 + 3616,18}{4 + 4} = 827,90 \text{ mm}^2$$

Ossificação Centro Vértebra (Controle)		Ossificação Centro Vértebra (U.S.P.)	
xi	xi ²	xi	xi ²
23,08	532,69	34,34	1.179,24
19,77	390,85	21,70	470,89
27,14	736,58	13,30	176,89
36,26	1.314,79	18,25	333,06
14,50	210,25	24,54	602,21
$\Sigma x_i = 120,75$	$\Sigma x_i^2 = 3.185,16$	$\Sigma x_i = 112,13$	$\Sigma x_i^2 = 2.762,29$

$$H_0: s_1^2 = s_2^2$$

$$H_A: s_1^2 \neq s_2^2$$

$$n_1 = 5$$

$$v = 4$$

$$SS_1 = 3.185,16 - \frac{(120,75)^2}{5} = 269,05 \text{ mm}^2$$

$$s_1^2 = SS_1 / v$$

$$s_1^2 = 269,05 / 4 = 67,26 \text{ mm}^2$$

$$n_2 = 5$$

$$v = 4$$

$$SS_2 = 2.762,29 - \frac{(112,13)^2}{5} = 247,66 \text{ mm}^2$$

$$s_2^2 = SS_2 / v$$

$$s_2^2 = 247,66 / 4 = 61,915 \text{ mm}^2$$

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} = \frac{67,26}{61,915} = 1,09 \text{ mm}^2$$

$$F_{0,05(2),4,4} = 9,60 \text{ (tabela F)} \rightarrow F < F_{0,05(2),4,4}$$

Portanto, aceita-se H_0 ($s_1^2 = s_2^2$)

Melhor estimador da variância desta população é:

$$s_p^2 = \frac{269,05 + 247,66}{4 + 4} = 64,59 \text{ mm}^2$$

Disco Intervertebral (Controle)		Disco Intervertebral (U.S.P.)	
xi	xi ²	xi	xi ²
16,88	284,93	30,95	957,90
16,56	274,23	34,33	1.178,55
31,95	1.020,80	22,28	496,40
15,56	242,11	20,12	404,81
20,28	411,28	22,28	496,40
Σxi=101,23	Σxi²=2.233,36	Σxi=129,46	Σxi²= 3534,06

$$H_0: s_1^2 = s_2^2$$

$$H_A: s_1^2 \neq s_2^2$$

$$n_1 = 5$$

$$v = 4$$

$$SS_1 = 2233,36 - \frac{(101,23)^2}{5} = 183,76 \text{ mm}^2$$

$$s_1^2 = SS_1 / v$$

$$s_1^2 = 183,76 / 4 = 45,94 \text{ mm}^2$$

$$n_2 = 5$$

$$v = 4$$

$$SS_2 = 3.534,06 - \frac{(129,06)^2}{5} = 153,14 \text{ mm}^2$$

$$s_2^2 = SS_2 / v$$

$$s_2^2 = 153,14 / 4 = 38,285 \text{ mm}^2$$

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} = \frac{45,94}{38,285} = 1,20$$

$$F_{0,05(2),4,4} = 9,60 \text{ (tabela F)} \rightarrow F < F_{0,05(2),4,4}$$

Portanto, aceita-se H_0 ($s_1^2 = s_2^2$)

Melhor estimador da variância desta população é:

$$S_p^2 = \frac{183,76 + 153,14}{4 + 4} = 42,11 \text{ mm}^2$$

Núcleo Pulposo (Controle)		Núcleo Pulposo (U.S.P.)	
xi	xi ²	xi	xi ²
8,44	71,23	19,65	386,12
9,16	83,91	9,44	89,11
15,91	253,13	9,12	83,17
9,48	89,87	22,62	511,66
12,45	155,00	18,39	338,19
Σxi =55,44	Σxi² =653,14	Σxi =79,22	Σxi² =1.408,25

$$H_0: s_1^2 = s_2^2$$

$$H_A: s_1^2 \neq s_2^2$$

$$n_1 = 5$$

$$v = 4$$

$$SS_1 = 653,14 - \frac{(55,44)^2}{5} = 38,42 \text{ mm}^2$$

$$s_1^2 = SS_1 / v$$

$$s_1^2 = 38,42 / 4 = 9,605 \text{ mm}^2$$

$$n_2 = 5$$

$$v = 4$$

$$SS_2 = 1.408,25 - \frac{(79,22)^2}{5} = 153,09 \text{ mm}^2$$

$$s_2^2 = SS_2 / v$$

$$s_2^2 = 153,09 / 4 = 38,27 \text{ mm}^2$$

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} = \frac{9,605}{38,27} = 0,25 \text{ mm}^2$$

$$F_{0,05(2),4,4} = 9,60 \text{ (tabela F)} \rightarrow F < F_{0,05(2),4,4}$$

Portanto, aceita-se H_0 ($s_1^2 = s_2^2$)

Melhor estimador da variância desta população é:

$$S_p^2 = \frac{38,42 + 153,09}{4 + 4} = 23,94 \text{ mm}^2$$

Anel Fibroso (Controle)		Anel Fibroso (U.S.P.)	
xi	xi ²	xi	xi ²
8,44	71,2336	15,94	254,0836
7,4	54,76	19,84	393,6256
16,04	257,2816	14,89	221,7121
6,08	36,9664	11,7	136,89
7,83	61,3089	12,76	162,8176
Σxi =45,79	Σxi² =481,5505	Σxi =75,13	Σxi² =1.169,13

$$H_0: s_1^2 = s_2^2$$

$$H_A: s_1^2 \neq s_2^2$$

$$n_1 = 5$$

$$v = 4$$

$$SS_1 = 481,5505 - \frac{(45,79)^2}{5} = 62,20 \text{ mm}^2$$

$$s_1^2 = SS_1 / v$$

$$s_1^2 = 62,20 / 4 = 15,55 \text{ mm}^2$$

$$n_2 = 5$$

$$v = 4$$

$$SS_2 = 1169,13 - \frac{(75,13)^2}{5} = 40,23 \text{ mm}^2$$

$$s_2^2 = SS_2 / v$$

$$s_2^2 = 40,23 / 4 = 10,06 \text{ mm}^2$$

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} = \frac{15,55}{10,06} = 1,545 \text{ mm}^2$$

$$F_{0,05(2),4,4} = 9,60 \text{ (tabela F)} \rightarrow F < F_{0,05(2),4,4}$$

Portanto, aceita-se H_0 ($s_1^2 = s_2^2$)

Melhor estimador da variância desta população é:

$$S_p^2 = \frac{62,20 + 40,23}{4 + 4} = 12,80 \text{ mm}^2$$

2. Análise das Médias: teste t de Student

➤ CORPO VERTEBRAL

$$H_0: \mu_1 = \mu_2$$

$$H_A: \mu_1 \neq \mu_2$$

$$n_1 = 5$$

$$v = 4$$

$$SS_1 = 3007,03 \text{ mm}^2$$

$$\overline{X}_1 = 100,509 \text{ mm}^2$$

$$n_2 = 5$$

$$v = 4$$

$$SS_2 = 3616,18 \text{ mm}^2$$

$$\overline{X}_2 = 128,196 \text{ mm}^2$$

$$s_p^2 = \frac{3007,03 + 3616,18}{4 + 4} = 827,90 \text{ mm}^2$$

$$s_{\overline{X}_1 - \overline{X}_2} = \sqrt{\frac{s_p^2}{n_1} + \frac{s_p^2}{n_2}} = \sqrt{\frac{827,90}{5} + \frac{827,90}{5}} = 18,19 \text{ mm}$$

$$t = \frac{\overline{X}_1 - \overline{X}_2}{s_{\overline{X}_1 - \overline{X}_2}} = \frac{100,509 - 128,196}{18,19} = -1,522$$

$$t_{0,05(2), v} = t_{0,05(2), 8} = -2,306$$

Sendo t maior que -2,074 , **aceita-se H₀**.

➤ CENTRO DE OSSIFICAÇÃO DA VÉRTEBRA

$$H_0: \mu_1 = \mu_2$$

$$H_A: \mu_1 \neq \mu_2$$

$$n_1 = 5$$

$$v = 4$$

$$SS_1 = 269,05 \text{ mm}^2$$

$$\overline{X}_1 = 24,144 \text{ mm}^2$$

$$n_2 = 5$$

$$v = 4$$

$$SS_2 = 247,66 \text{ mm}^2$$

$$\overline{X}_2 = 22,426 \text{ mm}^2$$

$$s_p^2 = \frac{269,05 + 247,66}{4 + 4} = 64,59 \text{ mm}^2$$

$$s_{\overline{X}_1 - \overline{X}_2} = \sqrt{\frac{s_p^2}{n_1} + \frac{s_p^2}{n_2}} = \sqrt{\frac{64,59}{5} + \frac{64,59}{5}} = 5,083 \text{ mm}$$

$$t = \frac{\overline{X}_1 - \overline{X}_2}{s_{\overline{X}_1 - \overline{X}_2}} = \frac{24,144 - 22,426}{5,083} = 0,338$$

$$t_{0,05(2), v} = t_{0,05(2), 8} = 2,306$$

Sendo t menor que 2,306 , **rejeita-se H₀**.

➤ DISCO INTERVERTEBRAL

$$H_0: \mu_1 = \mu_2$$

$$H_A: \mu_1 \neq \mu_2$$

$$n_1 = 5$$

$$v = 4$$

$$SS_1 = 183,76 \text{ mm}^2$$

$$\overline{X}_1 = 20,246 \text{ mm}^2$$

$$n_2 = 5$$

$$v = 4$$

$$SS_2 = 153,14 \text{ mm}^2$$

$$\overline{X}_2 = 27,806 \text{ mm}^2$$

$$s_p^2 = \frac{183,76 + 153,14}{4 + 4} = 42,11 \text{ mm}^2$$

$$s_{\overline{X}_1 - \overline{X}_2} = \sqrt{\frac{s_p^2}{n_1} + \frac{s_p^2}{n_2}} = \sqrt{\frac{42,11}{5} + \frac{42,11}{5}} = 4,104 \text{ mm}$$

$$t = \frac{\overline{X}_1 - \overline{X}_2}{s_{\overline{X}_1 - \overline{X}_2}} = \frac{20,246 - 27,806}{4,104} = -1,842$$

$$t_{0,05(2), v} = t_{0,05(2), 8} = -2,306$$

Sendo t maior que - 2,306 , **aceita-se H₀**.

➤ NUCLEO PULPOSO

$$H_0: \mu_1 = \mu_2$$

$$H_A: \mu_1 \neq \mu_2$$

$$n_1 = 5$$

$$v = 4$$

$$SS_1 = 38,42 \text{ mm}^2$$

$$\overline{X}_1 = 11,088 \text{ mm}^2$$

$$n_2 = 5$$

$$v = 4$$

$$SS_2 = 153,09 \text{ mm}^2$$

$$\overline{X}_2 = 15,844 \text{ mm}^2$$

$$s_p^2 = \frac{38,42 + 153,09}{4 + 4} = 23,94 \text{ mm}^2$$

$$s_{\overline{X}_1 - \overline{X}_2} = \sqrt{\frac{s_p^2}{n_1} + \frac{s_p^2}{n_2}} = \sqrt{\frac{23,94}{5} + \frac{23,94}{5}} = 3,094 \text{ mm}$$

$$t = \frac{\overline{X}_1 - \overline{X}_2}{s_{\overline{X}_1 - \overline{X}_2}} = \frac{11,088 - 15,844}{3,094} = -1,537$$

$$t_{0,05(2), v} = t_{0,05(2), 8} = -2,306$$

Sendo t maior que -2,120, **aceita-se H₀**.

➤ ANEL FIBROSO

$$H_0: \mu_1 = \mu_2$$

$$H_A: \mu_1 \neq \mu_2$$

$$n_1 = 5$$

$$v = 4$$

$$SS_1 = 62,20 \text{ mm}^2$$

$$\overline{X_1} = 9,158 \text{ mm}^2$$

$$n_2 = 5$$

$$v = 4$$

$$SS_2 = 40,23 \text{ mm}^2$$

$$\overline{X_2} = 15,026 \text{ mm}^2$$

$$s_p^2 = \frac{62,20 + 40,23}{4 + 4} = 12,80 \text{ mm}^2$$

$$s_{\overline{X_1} - \overline{X_2}} = \sqrt{\frac{s_p^2}{n_1} + \frac{s_p^2}{n_2}} = \sqrt{\frac{12,80}{5} + \frac{12,80}{5}} = 2,262 \text{ mm}$$

$$t = \frac{\overline{X_1} - \overline{X_2}}{s_{\overline{X_1} - \overline{X_2}}} = \frac{9,158 - 15,026}{2,262} = -2,594$$

$$t_{0,05(2), v} = t_{0,05(2), 8} = -2,306$$

Sendo t menor que -2,306 , **rejeita-se H₀**.