Humberto Stelita Vieira

Efeitos do ultra-som pulsado de baixa intensidade sobre a musculatura lisa e sobre o epitélio endometrial em úteros de ratas adultas, após uterotomia. Estudo experimental.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação Interunidades em Bioengenharia / 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 a obtenção do Título de Mestre em Bioengenharia.

Orientador: Prof. Dr. Affonso Luiz Ferreira

São Carlos
2007

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento
da Informação do Serviço de Biblioteca - EESC/USP

V658e Vieira, Humberto Stelita
Efeitos do ultra-som pulsado de baixa intensidade
Sobre a musculatura lisa e sobre o epitélio endometrial
em úteros de ratas adultas, após uterotomia : estudo
experimental / Humberto Stelita Vieira ; orientador
Affonso Luiz Ferreira. — São Carlos, 2007.

Dissertação (Mestrado-Programa de Pós-Graduação
Interunidades em Bioengenharia). Área de Concentração:
Agentes Físicos sobre o Sistema Biológico — Escola de
Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto s Instituto de Química de São Carlos da
Universidade de São Paulo.

1. Ultra-som pulsado de baixa intensidade. 2.
Endométrio miométrio. 3. Regeneração. I. Título.

Dedicatória

*Dedico este trabalho a **Professora MARIA ROSA COSTA**,
“Dona Rosinha”, que pela dedicação prestada a um pequeno aluno
fez nascer o amor aos livros.*

*A minha esposa **Andréia**,
pelo amor e cumplicidade em todos os momentos.*

Agradecimentos

*Agradecimento especial ao **Prof. Dr. Affonso Luiz Ferreira**,
por mostrar que a sabedoria ainda habita entre os homens.*

*Ao grande amigo **Ruberval Farias**,
pela persistência e apoio nas horas difíceis.*

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Muito obrigado!

*“Porque melhor é a sabedoria do que os rubis”;
e tudo o que mais se deseja não se pode comparar com ela”
(Provérbios 8 : 11)*

Resumo

VIEIRA, H. S. (2007). Efeitos do ultra-som pulsado de baixa intensidade sobre a musculatura lisa e sobre o epitélio endometrial em úteros de ratas adultas, após uterotomia. Estudo experimental. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, (2007).

Esta investigação experimental teve como finalidade de avaliar os efeitos do Ultra-som pulsado de baixa intensidade sobre a regeneração do miométrio e do endométrio de ratas submetidas à uterotomia.

Foram utilizadas neste experimento 20 ratas adultas da raça Wistar, submetidas a uma uterotomia mediante incisão longitudinal de 1,5cm total de uma das paredes do corno uterino. As ratas foram divididas em 2 grupos de 10 animais cada, sendo que um grupo foi submetido à estimulação ultra-sônica por 10 dias durante 15 minutos diários e outro grupo, chamado controle, foi submetido à estimulação fictícia pelo mesmo tempo e período. Seis horas antes do sacrifício, os animais receberam via intramuscular 0,10 mg de colchicina para cada 100 g de peso corporal com a finalidade de bloquear as mitoses em metáfase. A avaliação dos tecidos baseou-se na análise comparativa entre a contagem de células em mitose do endométrio e do miométrio de animais estimulados com o de animais controle. Os achados morfológicos foram analisados estatisticamente e são sugestivos de que o U.S.P. estimula a regeneração do miométrio bem como do endométrio de ratas.

Palavras-chaves: Ultra-som pulsado de baixa intensidade, endométrio, miométrio, regeneração.

Abstract

VIEIRA, H. S. (2007). Effects of the pulsed ultrasound of low intensity on the flat musculature and on the epithelium endometrial in uterus of adult female rats, after uterotomia. Experimental Study. M Sc. Dicertation - Escola de Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, (2007).

This experimental investigation had the purpose to evaluate the low-intensity pulsed ultrasound effects under the regeneration of the myometrium and the endometrium of the rats that were submitted to uterotomia.

It was used, in this experiment, twenty adult rats of the Wistar race, submitted to uterotomia beyond the longitudinal incision of total 1, 5 cm of one of the uterine horn walls. The rats were divided in two groups of ten animals each, the first group went through fifteen daily minutes ultra-sound stimulation during ten days, and the second group, called "control", went through fictional stimulation by the same time and period of the first group. Six hours before the sacrifice, the animals received, by intra muscular, 0, 10 mg of colchicine for each 100 g of body weight, with the intention to block the mitosis in metaphase. The evaluation of the tissue was based on the comparative analysis between the mitosis cell count of the stimulated animals' endometric tissue and the control animals' one. The morphologic findings were statistically analyzed.

Key Words: low-intensity pulsed ultrasound, endometrium, myometrium, regeneration.

Lista de Figuras

Figuras	Pág
1 Variação da intensidade acústica nos campos Ultra-sônicos próximos e distantes, em meio aquoso	21
2 Sinal senoidal pulsado	22
3 Fotomicrografias do ovário	37
4 Desenho mostrando a ultra-estrutura do ovócito	37
5 Fotomicrografia de tuba uterina	40
6 Micrografia eletrônica de varredura do revestimento da tuba uterina ..	40
7 Útero de rata	42
8 Estrutura da musculatura lisa	43
9 Estrutura química do princípio ativo Colchicina	50
10 Animal anestesiado, contido em prancha operatória tricotomizado na região ventral do abdome	54
11 Secção da parede abdominal	54
12 Corno uterino esquerdo pinçado	55
13 Seta indicativa do corte longitudinal de 1,5cm no cordão uterino esquerdo	55
14 Sutura do cordão uterino com fixação à parede muscular do abdome ..	56
15 Síntese dos diferentes planos	56
16 Aspecto final da sutura final da parede abdominal	57
17 Aparelho de Ultra-som Pulsátil de Baixa Intensidade	58
18 Diferença entre a célula normal e a célula com mitose interrompida	

	em metáfase devido ao uso da colchicina	63
19	Região do tecido endometrial do útero de rata estimulada com Ultra-som apresentando alto índice mitótico	64
20	Região do tecido endometrial do útero de rata com estimulação fictícia com Ultra-som apresentando baixo índice mitótico	65
21	Fotomicrografia ampliada das diferenças estruturais do epitélio endometrial	66
22	Região tecidual do miométrio uterino de rata estimulada com Ultra-som apresentando alto índice mitótico	67
23	Região tecidual do miométrio uterino de rata com estimulação fictícia com Ultra-som apresentando baixo índice mitótico	68
24	Fotomicrografia ampliada para melhor visualização das diferenças estruturais do miométrio	69

Lista de Tabelas

Tabelas	Pág
1 Parâmetros do Ultra-som utilizados em nosso experimento	59
2 Valores quantitativos do epitélio endometrial	70
3 Valores quantitativos do miométrio	71

Lista de Abreviaturas

cm - Centímetro

F - Resultado da Tabela ou Valor Estatístico

FMRP- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

GH - Hormônio de Crescimento

GL - Grau de Liberdade

GnRH - Hormônio Liberador de Gonadotrofinas

HE - Hemalumen e Eosina

Hz - Hertz - unidade de medida de frequência

kHz - Kilohertz

LH - Hormônio Luteinizante

MHz - Mega Hertz

MQ - Média dos Quadrados

m/s - Metros por segundo

mW/cm² - Miliwatt por centímetro quadrado

OV - Objetos Variáveis ou Origem de Variações

P - Probabilidade

pH - Potencial de Hidrogênio

PZT - Titanato zirconato de chumbo

RNA - Ácido Ribonucléico

SQ - Soma de Quadrados

SATA - Spatial average temporal average - média espacial, média temporal

U.S.P. - Ultra-som Pulsátil de Baixa Intensidade

VF - Valor F (Tabela) ou Valor Estatístico

VL - Velocidade da onda longitudinal

VT - Velocidade da onda transversal

W/cm² - Watt por centímetro quadrado

Lista de Gráficos

Gráficos

1	Índice mitótico do endométrio	70
2	Índice mitótico do miométrio	71

Sumário

1	Introdução	15
2	Objetivo ..	18
3	Revisão da Literatura	19
3.1	Bases Físicas do Ultra-som	19
3.1.1	Intensidade e Campo Acústico	20
3.1.2	Modos de Propagação	22
3.1.3	Mecanismo Térmico	23
3.1.4	Mecanismo não Térmico	24
3.1.4.1	Cavitação	24
3.1.4.2	Cavitação Transiente	24
3.1.4.3	Cavitação Estável	25
3.1.5	Fluxo e Microfluxo	26
3.1.6	Piezeletricidade	27
3.2	Efeitos do Ultra-som nas Diferentes Fases do Reparo Tecidual	28
3.3	Endocrinologia Reprodutiva da Fêmea	30
3.3.1	Aspectos Endocrinológicos	30
3.3.2	Sistema Genital Feminino	34
3.3.3	Os Ovários como Órgãos Endócrinos	34
3.3.4	Ovídutos	38
3.3.5	Útero	41
3.3.6	As Funções do Útero	47
3.3.7	Cérvix	48
3.4	Uso da Colchicina como Agente Mitostático	50

4	Materiais e Métodos	51
4.1	Animais de Experimentação	51
4.1.1	Padronização da Cirurgia	51
4.1.2	Grupos Experimentais	52
4.1.2.1	Grupo Experimental I	52
4.1.2.2	Grupo Experimental II	52
4.2	Procedimento Cirúrgico	53
4.3	Equipamento Gerador de Ultra-som e Parâmetros Usados	58
4.4	A Sonicação com U.S.P	59
4.5	Uso da Colchicina	60
4.6	Coleta de Material	60
4.7	Análise Morfométrica e Estatística	62
5	Resultados	63
6	Discussão	72
7	Conclusão	75
8	Referências Bibliográficas	76
9	Apêndice	80

1. Introdução

O ultra-som vem sendo intensamente utilizado em áreas médicas e industriais. Recentemente, nos últimos 10 anos, no setor de Bioengenharia da Universidade de São Paulo em São Carlos, numerosas experiências têm sido realizadas com a finalidade de esclarecer as ações do ultra-som pulsado de baixa intensidade, “U.S.P. “, sobre diferentes tecidos biológicos.

A partir de experiências pioneiras em nosso meio, capaz de produzir efetivamente a formação de “osso novo” no tratamento de fraturas experimentais ou clínicas e na pseudoartrose, (DUARTE e XAVIER 1983). Esses achados foram pioneiros quanto à capacidade da interferência de ondas ultra-sônicas promoverem a aceleração no reparo de pseudoartroses formando tecido ósseo primário. Assim, (TANZER *et al.* 1996), demonstraram os efeitos do U.S.P. em implantes ósseos sob a forma de placas porosas; (KRISTIANSEN *et al.* 1997), demonstraram seus efeitos no reparo de fraturas no osso do rádio humano mediante avaliações radiológicas; (CARRO, 1998), investigou o efeito do U.S.P. na aceleração do princípio indutor de matriz óssea desmineralizada, no preenchimento de falhas ósseas; (ZORLU *et al.* 1998), admitem que o U.S.P. acelera o reparo de fraturas e a eletro estimulação também o faz e não há diferenças estatísticas entre os dois métodos no reparo de fraturas; (BRAND *et al.* 1999), demonstraram o efeito benéfico do U.S.P. no reparo de fraturas por estresse; (KOKUBU *et al.* 1999), demonstraram que a prostaglandina E2 (PGE2) e a estimulação com o U.S.P. aceleram o reparo de fraturas; (GUIRRO *et al.* 1999), procuraram investigar a ação do U.S.P. no

reparo de falhas ósseas experimentais preenchidas previamente com hidroxiapatita.

Uma seqüência de trabalhos demonstrou de maneira efetiva que o U.S.P. repara tecido ósseo, embora se discuta ainda hoje os mecanismos que seriam os responsáveis por essa resposta dos tecidos.

Recentemente pesquisadores do grupo da Bioengenharia da E. E. de são Carlos da Universidade de São Paulo contribuíram de maneira significativa na avaliação do U.S.P. também sobre outras variedades de tecidos.

O emprego do U.S.P. foi também avaliado quanto ao processo de cicatrização bem como sobre o crescimento de ossos longos, (SILVA, 1987); Na regeneração da pele submetida a queimaduras por calor, (ALVES 1988); Na cicatrização de queimaduras padronizadas na pele de ratos diabéticos, (NOLASCO 1993); No reparo de úlceras varicosas crônicas, (HILÁRIO 1993); Na resolução do processo inflamatório crônico, (PIRES 1994); Na regeneração de nervos de ratos após neurotomia, (CRISCI et al., 2002) e mais recentemente, sobre o crescimento de vértebras de animais de experimentação (CRUZ, A. F. 2005).

MCLEOD *et al.* (1995), investigaram as alterações *in-vivo* da variação da temperatura em ossos e tecidos moles adjacentes e observaram que, em média, as alterações de temperatura foram inferiores a 0,2°C. Esse achado mostra que a aplicação do USP de baixa intensidade não produz aumento significativo na temperatura de tecidos adjacentes à sua aplicação, sendo mínima essa influencia de temperatura nos tratamentos eventualmente utilizados. Diferentemente do Ultra-som terapêuticos o qual, comprovadamente aumenta a temperatura sobre a área de aplicação e áreas adjacentes, sendo

usado rotineiramente por fisioterapeutas, em aplicações para tratamento de patologias específicas, utilizando a sua capacidade na geração de calor.

2. Objetivo

Não obstante, inúmeros trabalhos já realizados utilizando o U.S.P. de baixa intensidade terem mostrado comprovadamente sua ação benéfica no reparo do tecido ósseo e de outros tecidos ou mesmo atuando sobre o processo cicatricial, poucos ou nenhum trabalho foram destacados na literatura que estivesse relacionado com a regeneração de fibras musculares lisas ou do epitélio de mucosas, mediante o emprego do U.S.P. de baixa intensidade.

O presente trabalho tem como objetivo, estimar experimentalmente a ação do U.S.P. de baixa intensidade sobre fibras musculares do miométrio de ratas adultas bem como sobre epitélio endometrial, estimando-se os índices mitóticos de células musculares lisas do miométrico e do epitélio endometrial, após uterotomias experimentais.

3. Revisão da Literatura

3.1 Bases físicas do Ultra-som

No conceito da física, onda é uma perturbação mediante a qual pode haver transporte de energia de um ponto a outro de um material.

As ondas se classificam em mecânicas e eletromagnéticas. As ondas mecânicas diferem das eletromagnéticas por necessitarem de um meio material para se propagar.

As ondas ultra-sônicas são ondas mecânicas e transmitem energia através da matéria causando uma oscilação nas posições de equilíbrio das suas partículas.

Estes movimentos oscilatórios são resistidos por forças elásticas de acordo com a estrutura molecular do meio (FREDERICK, 1965).

Nos meios sólidos podem ser produzidas ondas de três tipos: longitudinal, transversal e superficial. A onda longitudinal ou de pressão se caracteriza por causar oscilações nas partículas na mesma direção de propagação da onda.

A onda transversal causa oscilações nas partículas em direção perpendicular à direção de propagação da onda, e a onda superficial causa oscilações elipsoidais nas partículas.

Nos meios líquidos e gasosos podem ser propagadas ondas apenas do tipo longitudinal (WELLS, 1977).

3.1.1 Intensidade e Campo Acústico.

A energia fornecida pelas ondas ultra-sônicas ao atravessar um meio é medida pela intensidade acústica. Esta é definida como a razão média do fluxo de energia que atravessa uma unidade de área pela unidade de tempo (watts/cm²).

Os valores de intensidade referem-se geralmente a intensidade transmitida pelo transdutor e não a intensidade "in si tu", pois esta é difícil de ser medida (ZISKIN, 1985).

A intensidade que caracteriza o campo acústico transmitido pelo transdutor é obtida através de dosímetros de ultra-som em meio de baixa atenuação, normalmente em água. Esses dosímetros medem a "força de radiação" (F), possibilitando assim o cálculo da potência acústica (P), pela equação:

$$F = \frac{P}{C} \quad (1)$$

A intensidade apresenta características diferentes no campo acústico, caracterizando no campo duas regiões distintas: o campo próximo ou zona de Fresnel e o campo distante ou zona de Fraunhofer.

No campo próximo a intensidade é disforme, enquanto no campo distante a onda decresce suavemente com a distância da fonte, como ilustra a figura 2.

Figura 1 - Variação da intensidade acústica (I) nos campos ultra-sônicos próximos e distantes, em meio aquoso. Na parte a tem-se a variação de I ao longo do eixo x , na parte b tem-se a variação de I ao longo do eixo y (perpendicular à página); e na parte c, o valor da intensidade média ao longo do eixo y , para uma determinada posição (ALVES, 1998 adaptados).

3.1.2 Modos de Propagação

As ondas ultra-sônicas podem se geradas de dois modos, o contínuo e o pulsado. A diferença entre estes dois modos está na interrupção da geração de energia.

No modo contínuo não ocorre esta interrupção, havendo, portanto um depósito ininterrupto de energia sobre os tecidos irradiados.

No modo pulsado, no entanto, há interrupções freqüentes na geração de energia. Na utilização do modo pulsado há dois tipos de freqüência a serem consideradas: a freqüência da onda (f) citada anteriormente, e a freqüência de repetição de pulsos (FRP).

Figura 2 - Sinal senoidal pulsado. (HIKES *et al.*, 1985)

3.1.3 Mecanismo Térmico

A elevação da temperatura tecidual produzida através da absorção da energia ultra-sônica pode trazer benefícios através de um vaso dilatação local ou até queimar os tecidos irradiados.

O aumento da temperatura em um tecido irradiado com ultra-som é determinado por diversos fatores, dos quais os mais importantes são:

- O coeficiente de absorção do tecido;
- A taxa de energia ultra-sônica depositada, a qual depende da intensidade ultra-sônica, da distribuição de energia no campo e do modo de propagação da onda;
- A frequência da onda ultra-sônica;
- O tempo de irradiação local;
- A técnica de aplicação: estacionária ou móvel;
- As dimensões do corpo aquecido;
- A presença ou ausência de superfícies refletoras na frente ou atrás do tecido de interesse (WILLIANS, 1983).

O aumento local da temperatura, com os parâmetros usado no presente trabalho e considerado desprezível (DUARTE, 1977; HADDAD, 1992).

3.1.4 Mecanismo não térmico

3.1.4.1 Cavitação

Cavitação é o termo usado em geral para descrever as atividades de micro bolhas em um meio contendo líquido, quando estimulado acusticamente. A cavitação engloba formação, crescimento, colapso e efeitos (físicos, químicos e biológicos) associados as bolhas gasosas (FRIZZEL e DUNN, 1984).

Essas bolhas de gás, formadas no tecido biológico com a passagem de ondas-sônicas podem permanecer intactas por muitos ciclos (cavitação estável) ou entrar em colapso liberando grande quantidade de energia (cavitação transiente) (WELLS, 1977).

3.1.4.2 Cavitação Transiente

O colapso das bolhas de gás na cavitação transiente libera energia suficiente para romper ligações moleculares, provocando a decomposição térmica da água e produzindo radicais livres H e OH, altamente reativos, podendo causar alterações químicas indesejáveis e lesão nos tecidos adjacentes.

No entanto, a cavitação transiente requer intensidades muito mais altas do que aquelas usadas terapeuticamente de aproximadamente 10 W/cm^2 (LEITE, 1989), desta forma sua ocorrência em tecidos biológicos é bastante improvável.

3.1.4.3 Cavitação Estável

Há evidências experimentais consideráveis de que níveis terapêuticos de ultra-som podem induzir a cavitação estável "in vivo" (TER HAAR, 1982), mas seus efeitos ainda não estão bem estabelecidos. Alguns autores acreditam que a cavitação estável é responsável, pelo menos em parte, pelas alterações na permeabilidade da membrana celular, a íons de cálcio (Ca) e sódio (Na), tendo assim um papel terapêutico importante na reparação tecidual, (MORTIMER *et al.*, 1988).

Entretanto, sabe-se que a cavitação estável "*in vitro*" pode produzir efeitos irreversíveis em suspensão celular, como a ruptura de membranas e de macromoléculas, a desnaturação de enzimas, etc., dependendo dos parâmetros usados (LEITE, 1989).

A intensidade limiar a partir da qual pode ocorrer cavitação foi determinada em meio aquoso por (HILL, 1971) em 0,1 W/cm², e "in vivo" (TER HAAR *et al.*, 1982) em 0,2 W/cm².

3.1.5 Fluxo e micro fluxo

Fluxo (streaming) e micro fluxo (microstreaming) e correspondem a movimentos unidirecionais que ocorre em fluídos submetidos a um campo ultra-sônico.

Esses movimentos originam forças e tensões que podem modificar a posição de partículas intra e extracelulares ou mesmo a configuração normal das células, e conseqüentemente podem afetar a atividade celular (OKUNO, 1986).

Diversos experimentos têm sugerido que o micro fluxo causado em tecidos submetidos a níveis terapêuticos de ultra-som é um dos mecanismos responsáveis pela regeneração de tecidos lesados (HADAAD, 1992).

3.1.6 Piezeletricidade

A piezeletricidade é um dos principais mecanismos a que se atribuem os efeitos ultra-sônicos, produzidos na reparação do tecido ósseo.

Este mecanismo se deve a propriedade piezelétrica da molécula de colágeno. Supõe-se que a energia mecânica das ondas seja convertida em energia elétrica pelas unidades de tropocolágeno, criando assim um campo elétrico na superfície do osso fraturado, o que estimularia a proliferação de células. (XAVIER e DUARTE, 1983).

SILVA, (1987) demonstrou teoricamente 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 deve ocorrer em todos os tecidos que contém colágeno. O que pode ser uma explicação para o efeito do ultra-som sobre a pele.

3.2 Efeitos do Ultra-Som nas diferentes fases do processo de cicatrização

Fase inflamatória – O Ultra-Som Pulsado de Baixa Intensidade interage com os macrófagos, mastócitos e neutrófilos, acelerando a fase celular na resolução normal da inflamação. Este aumento ocorreria devido à suave movimentação do líquido intersticial que pode aumentar a taxa de fagocitose, o movimento de partículas e células, aumentando a liberação de mediadores químicos do processo inflamatório como a histamina e a serotonina. É importante notar que o Ultra-Som tem ação pró-inflamatória e não antiinflamatória. (LEFAUCHER e SÉBILLE, 1995; KOKUBU et al., 1999).

Fase proliferativa – Tecidos submetidos ao estímulo com Ultra-Som Pulsado de Baixa Intensidade apresentam um aumento significativo no número de células no leito da ferida. Os fibroblastos podem ser estimulados a produzir um aumento na síntese de colágeno devido ao aumento na permeabilidade da membrana celular. O Ultra-Som estimula também a angiogênese, estimulando assim o reparo das feridas. (DYSON, 1987; SILVA, 1987; HUME e KALIMO, 1992).

Fase de remodelamento – O Ultra-Som Pulsado de Baixa Intensidade tem a capacidade de interagir com o colágeno maduro, aumentando sua extensibilidade, a resistência tênsil da cicatriz também pode ser aumentada quando é submetida ao estímulo, sendo também responsável pela deposição do colágeno com uma arquitetura tridimensional semelhante a da pele não lesionada. (HILL, 1971; DYSON 1987).

Admite-se que a ação benéfica do Ultra-som sobre diferentes tecidos decorra do estímulo na formação de tecido de granulação; proliferação epitelial como o observado na epiderme; além do aumento na síntese do RNA e síntese protéica, (KOKUBU et al., 1999).

3.3 Endocrinologia Reprodutiva da Fêmea

3.3.1 Aspectos Endocrinológicos

A puberdade na fêmea pode representar tanto o primeiro cio, quanto a primeira menstruação, eventos que geralmente não ocorrem simultaneamente. A rigor, a puberdade é definida como a época em que a fêmea está apta à fertilização, o que compreende tanto o aspecto comportamental (libido) como a formação de gametas e de capacidade de manter e desenvolver o embrião e o feto até o parto. A primeira ovulação costuma ser "silenciosa", isto é, sem precedência de libido, (GONZALES F. H. D. 2002)

Somente a segunda ou terceira ovulações vêm acompanhadas de sinais evidentes de estro. O início da puberdade vem precedido por um pico de LH (Hormônio Luteinizante), seguido de uma pequena elevação do progesterona circulante. No segundo pico de LH marca a apresentação da primeira ovulação, que é silenciosa. É só no terceiro pico de LH que se caracteriza a puberdade completa, ou seja, sintomas de cio junto com ovulação.

Durante o período da pré-puberdade ocorrem pulsos de LH com amplitude similar às observadas na puberdade, porém com frequência bem menor (2-3 h). Durante a puberdade ocorre uma pronunciada diminuição da sensibilidade de inibição dos esteróides as gonadotrofinas, rompendo o forte "feedback negativo" entre estradiol e LH.

Este é o fundamento da hipótese gonadostática para explicar o início da puberdade, a qual sugere que o eixo hipotálamo-pituitário-ovariano estaria já

maduro desde antes da puberdade, porém sem funcionar de forma adulta devido ao mencionado efeito feedback. A hipótese gonadostática está sustentada nas seguintes considerações:

(a) O mecanismo de secreção de LH em resposta à ação estimulatória exógena de estradiol é observado desde antes da puberdade. Esta resposta aumenta com a idade, o que supõe que a falta de uma produção permanente de estradiol é o que impede uma secreção de LH no período da pré-puberdade;

(b) O ovário tem a capacidade de produzir níveis foliculares de estradiol em resposta a pulsos horários de LH desde antes da puberdade, o que é coerente com o fato de que o ovário possui folículos terciários, portanto está relativamente maduro desde antes da puberdade. Portanto, a falta de produção de estradiol não seria devido à imaturidade do ovário, mas à falta de estímulo gonadotrófico.

(c) Existe potencial de produzir picos de LH com alta frequência desde antes da puberdade. Entretanto, a frequência é pouca, não por insuficiente desenvolvimento pituitário, mas porque o sistema é muito sensível à ação inibitória do estradiol;

(d) A inibição da secreção de LH em resposta a estradiol diminui no período da puberdade permitindo a secreção da gonadotrofina e, conseqüentemente, estimulando o ovário para funcionar de forma adulta.

A inibição da secreção de LH por parte do estradiol antes da puberdade pode estar mediada por neurotransmissores como dopamina. Essa inibição diminuiria quando se aproxima a puberdade. A progesterona de origem ovárica secretada antes da puberdade, embora em baixos níveis, pode também estar afetando o padrão de secreção de LH.

O mecanismo controlador da secreção de LH inclui um efeito feedback inibitório sobre sua própria secreção determinada pela secreção pulsátil de GnRH (hormônio liberador de gonadotrofinas) hipotalâmico. Portanto, cada pulso de LH está associado com um pulso de GnRH. Assim, o hipotálamo pode ser visto como a via final que comanda os vários estágios da atividade reprodutora. O ritmo gerador de pulsos de GnRH está afetado pelo estradiol de forma que durante períodos de alta sensibilidade feedback, a atividade do gerador está diminuída.

Depois da puberdade ocorrem várias mudanças no controle da secreção de LH. O sistema hipotálamo-hipofisário diminui sua capacidade para ser inibido por estradiol. O novo esteróide inibitório passa a ser a progesterona e o novo mecanismo que determina os intervalos entre os ciclos ovulatórios é a duração do corpo lúteo. A fase luteínica ocorre após a ovulação.

Esta fase dura aproximadamente 14 dias, exceto quando ocorre a fertilização, e termina imediatamente antes da menstruação.

Na fase luteínica, o folículo roto fecha após haver liberado o óvulo e forma um corpo lúteo que secreta quantidade crescente de progesterona, o aumento de progesterona durante a fase luteínica diminui a frequência dos pulsos de LH, inibindo o desenvolvimento dos folículos pré-ovulatórios.

Com a regressão do corpo lúteo e a queda nos níveis de progesterona, a frequência de pulsos de LH aumenta e começa a fase folicular.

A possível explicação dos cios silenciosos no início da puberdade está no fato de que a progesterona tem um papel importante como "iniciador" da ação estrogênica sobre o comportamento sexual. A sequência para a indução do estro seria a seguinte: aumento de progesterona, diminuição de progesterona e aumento de estradiol. Antes da primeira ovulação não há formação de corpo lúteo e, portanto, não se produz progesterona. A fase luteínica subsequente é muito curta e não produz progesterona suficiente, de forma que o estradiol circulante não consegue fazer expressar o comportamento sexual do estro.

Finalmente, após a exposição do cérebro a altas concentrações de progesterona durante a primeira fase luteal normal, correspondente à segunda ovulação, o cio pode ocorrer com os níveis de estradiol circulantes durante a terceira fase folicular (terceira ovulação). Contudo, os primeiros cios podem ser curtos e pouco expressivos. O nível nutricional baixo aumenta a idade na qual se atinge a puberdade, talvez para aumentar a pulsatilidade do LH.

O mecanismo do efeito retardante da subnutrição sobre a época da puberdade não está esclarecido. De qualquer maneira, seja qual for o mecanismo, tais sinais devem provocar aumento da sensibilidade ao feedback negativo do estradiol causando inibição da secreção de GnRH e produzindo insuficiente LH para desenvolver os folículos. O ambiente social é outro fator que afeta o início da puberdade. Outro mecanismo pode ser através dos ferormônios da urina do macho que estimulariam o sistema feedback

desencadeante da puberdade. Finalmente, temperaturas extremas ou stress inespecíficos também são causas de retardo ao início da puberdade.

3.3.2 Sistema Genital Feminino

Os órgãos reprodutores da fêmea compreendem os órgãos genitais internos como os ovários, as tubas uterinas, útero e a vagina e órgãos genitais externos.

3.3.3 Os Ovários como Órgãos Endócrinos.

As funções do ovário são produzir ovócitos (gametogênese) e produzir esteróides sexuais femininos (esteroidogênese). A unidade estrutural e funcional do ovário que garante essas funções é o folículo ovárico.

Os folículos contêm em seu interior as células germinativas ou ovócitos. A cada ciclo estral, vários folículos crescem e se desenvolvem, sendo que somente um folículo, nas espécies uníparas, ou alguns deles, nas espécies multíparas amadurecem e serão ovulados. Os folículos são responsáveis pela produção de estrógenos e o corpo lúteo pela produção de progesterona. O ovário também é responsável pela produção de hormônios peptídicos, tais como a inibina, o fator de inibição de maturação do ovócito, a relaxina e a gonadocrinina.

Os dois ovários funcionam alternativamente a cada ciclo. Diferentemente dos testículos, os ovários são intraperitoniais e permanecem na cavidade abdominal. A forma do ovário varia em função da espécie e da fase do ciclo estral.

A estrutura do ovário compreende um córtex externo uma medula interna. No córtex está localizado o epitélio que recobre o ovário e contém uma

camada única de células cubóides ou colunares baixas, chamada incorretamente de epitélio germinativo. Esta camada recobre a superfície do ovário completamente. Abaixo do epitélio, está a túnica albugínea, tecido fibroso e depois a grande massa de folículos pré-formados durante a vida embrionária da fêmea, que se encontra em diferentes estágios de desenvolvimento.

O epitélio superficial do ovário penetra na túnica albugínea formando cordões no córtex ovárico. Entretanto, esses cordões não contribuem para a formação de ovócitos, idéia que originou o nome de epitélio germinativo, embora contribuam com células da granulosa para os folículos em crescimento.

A medula do ovário está formada por tecido conectivo contendo os vasos sanguíneos e linfáticos e os nervos. É diferente do estroma ovárico, o qual tem células capazes de sofrer alterações durante a vida reprodutiva da fêmea, podendo originar as células da teca interna e as células intersticiais. Entremeadado com o estroma existem ainda fibras musculares lisas que são importantes na contração do folículo maduro durante a ovulação.

O desenvolvimento dos folículos pode ser avaliado em função do seu tamanho, o número de camadas de células granulosas, o folículo modifica-se para formar as tecas foliculares, com duas camadas, a teca interna e a teca externa. As células da teca interna, quando completamente diferenciadas das células produtoras de esteróides. Estas células sintetizam estrógenos, um dos hormônios do ovário. As células da granulosa são mais numerosas em determinado ponto da parede folicular, formando um espessamento, o *cumulus oophorus* onde está localizado o ovócito. Em função desses fatores, os folículos podem ser classificados em:

(a) Folículos primários ou primordiais, que são ovócitos envolvidos por uma única camada de células foliculares planas ou cubóides, rodeadas de tecido intersticial;

(b) Folículos secundários, nos quais o número de células foliculares aumenta e passam a serem chamadas de células granulosas, com aparência irregular poliédrica;

(c) Folículos terciários ou vesiculares, quando as células granulosas começam a secretar o líquido folicular que se acumula nos espaços intercelulares, formando um antro. Nesse ponto, os capilares do estroma invadem a camada fibrosa de células que rodeiam o folículo e formam uma camada vascular chamada de teca interna. Contudo, as células granulosas dentro do folículo estão privadas de suprimento sanguíneo pela membrana basal. A zona pelúcida que contorna o ovócito está rodeada por uma massa sólida de células granulosas radiais que formam a corona radiata.

(d) Folículo de Graf ou folículo maduro, no qual as células da granulosa aumentam de tamanho, o antro aumenta em função da maior secreção de líquido folicular e o ovócito é pressionado pelo líquido para um extremo do folículo. O ovócito agora é rodeado de mais células foliculares e forma o *cumulus oophorus*. As células deste folículo se diferenciam, portanto nas células granulosas, sob a membrana basal, e as células das tecas interna e externa. O ovócito apresenta duas membranas distintas, a membrana vitelina ou membrana plasmática, e a zona pelúcida, membrana homogênea composta de proteínas suscetíveis de serem dissolvidas por enzimas proteolíticas.

Figura 3: Fotomicrografias do ovário, em aumentos diferentes. Em **A**, observa-se o estroma, folículos primordiais e folículos em crescimento primários. Em **B**, (um folículo em crescimento secundário com antro); a seta aponta a teca interna. O folículo da fotomicrografia C é maior do que as das outras fotos, parecendo menor devido ao menor aumento da fotografia. (JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO J. S. F. 1990).

Figura 4: Desenho mostrando a ultra-estrutura do ovócito, da zona pelúcida e das células foliculares. (JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO J. S. F. 1990).

3.3.4 Ovidutos

Os ovidutos são dois, ou também chamados de tubas uterinas, estão presos ao mesosalpinge. O comprimento do oviduto varia nas diferentes espécies, bem como sua disposição e formas. Funcionalmente o oviduto pode ser dividido em três segmentos:

(a) O infundíbulo que contém as fimbrias e o óstio abdominal, próximo ao ovário;

(b) A ampúla, porção mais dilatada que corresponde cerca da metade do comprimento do oviduto, onde geralmente ocorre a fecundação do óvulo;

(c) O istmo, porção proximal geralmente retilínea que liga ao útero;

(d) Porção intersticial, abrindo-se na cavidade uterina;

O oviduto é o local onde normalmente ocorre à fertilização dos gametas. As fimbrias captam os óvulos desde a superfície do ovário até o infundíbulo, ocorrendo a fertilização na ampúla, onde o zigoto sofre os primeiros estágios de clivagem. Os embriões ainda ficam por alguns dias percorrendo o oviduto antes de se implantarem na mucosa uterina.

O epitélio ciliado e o fluído do oviduto confluem para garantir a função de transporte e sobrevivência dos gametas masculino e feminino. A mucosa do epitélio tubárico possui células ciliadas, cujos movimentos são afetados

hormonalmente, sendo maior a atividade logo após a ovulação. O número de cílios, que é maior no infundíbulo, diminui no segmento entre a âmpula e o istmo. Outros tipos de células chamadas de secretoras são mais abundantes nesse último segmento. Os cílios batem em direção ao útero e sua atividade, junto com as contrações tubáricas, mantém os óvulos no oviduto em permanente rotação, efeito necessário para a aproximação espermatozóide-óvulo e para impedir a implantação tubárica. A perda dos cílios pode ocorrer como consequência de infecções no trato genital. O que pode levar à acumulação de fluídos no oviduto e salpingite.

A atividade das células secretoras também está sob controle hormonal. A secreção é máxima na época da ovulação, enquanto que na fase luteínica ocorre armazenamento, mas não secreção de substâncias. O fluido tubárico contém proteínas, a maioria extraída do sangue, mas algumas produzidas pelo próprio oviduto. Entre outras proteínas estão a transferrina e a pré-albumina.

O complexo padrão de contractilidade do oviduto está sob controle hormonal. As fibras musculares lisas longitudinais e circulares presentes em sua parede possuem receptores para os esteróides ováricos e algumas prostaglandinas. A frequência e a amplitude das contrações variam com a fase do ciclo estral, de forma que antes da ovulação são suaves e com a ovulação tornam-se mais vigorosas. As prostaglandinas E1 e E2 causam aumento do tonus muscular das fibras longitudinais.

Figura 5: Fotomicrografia de tuba uterina: corte transversal na região do istmo. Observar as dobras da mucosa, a camada de músculo liso e o tecido conjuntivo da camada serosa, que é mais externa. Pequeno aumento. (JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO J. S. F. 1990).

Figura 6: Micrografia eletrônica de varredura do revestimento da tuba uterina. Observa-se cílios abundantes. (JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO J. S. F. 1990).

3.3.5 Útero

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO J. S. F. (1990); O útero tem a forma de uma pêra na mulher, com uma porção dilatada, **corpo**, e uma parte inferior, cilíndrica, que se abre na vagina, a **cérvix** ou **colo uterino**. A cérvix é a porção do colo uterino que faz saliência na luz da vagina e uma parte do colo fica fora da vagina que é chamada porção supra vaginal do colo.

O útero da rata tem a forma de um **V** invertido e cujo vértice se alonga em uma porção comum, chamada de corpo e os dois ramos do **V**, afastam-se constituindo em 2 pequenos cilindros ou cornos correspondendo ao corpo do útero (figura 7).

A parede do útero é relativamente espessa e constituída por três túnicas, que, de fora para dentro, são:

1ª **serosa** (tecido conjuntivo e mesotélio), ou **adventícia** (somente tecido conjuntivo) conforme a região do órgão considerada;

2ª **miométrio** formado de músculo liso;

3.ª **endométrio** que é uma mucosa.

Figura 7: Fotografia de útero de rata. Observa-se que o útero da rata é formado por dois cornos longos divergentes e a porção correspondente a confluência dos cornos, constitui o corpo.

O **miométrio**, constituído por tecido muscular liso, é a túnica mais espessa do útero. Os feixes de músculo liso formam três camadas de limites imprecisos: o *stratum submucosum*, o *stratum vasculare* e o *stratum subserosum*. O primeiro e o último dos estratos musculares são formados principalmente por fibras dispostas no sentido longitudinal, isto é, paralelas ao maior eixo do corpo do órgão. O *stratum vasculare* é a camada mais espessa do miométrio e recebe este nome por sua riqueza em vasos sanguíneos calibrosos. Neste *stratum* predominam feixes musculares entrelaçadas entre si em feixes perpendiculares.

Durante a gravidez o miométrio cresce acentuadamente, sofrendo regressão após o parto. Esse crescimento deve-se à **hipertrofia** (aumento de

volume) e à **hiperplasia** (aumento do número) das fibras musculares lisas e a um aumento do material extracelular, principalmente colágeno. As novas fibras musculares que surgem na gravidez resultam da divisão por mitoses de fibras preexistentes e da diferenciação de células mesenquimatosas quiescentes e presentes no miométrio.

As fibras colágenas que aparecem no útero grávido são sintetizadas por células do conjuntivo e também pelas fibras musculares lisas do miométrio. Estudos de microscopia eletrônica mostraram que, durante a gravidez, muitas fibras musculares lisas se apresentam com características ultra-estruturais de células secretoras de proteínas e incorporam ativamente precursores de colágeno (prolina- H^3).

Após a gravidez ocorre destruição de algumas fibras musculares lisas, redução no tamanho das que persistem e uma degradação enzimática do colágeno, de modo que o útero reduz seu tamanho, quase voltando às suas dimensões de pré-gravidez.

Figura 8: Esquema tridimensional ilustrando a estrutura da musculatura lisa. Entre as células correm delgadas fibras reticulares. Observar que, no corte transversal, as células têm diâmetros variáveis e que em grande parte delas não aparecem núcleos.

(JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO J. S. F. 1990)

A célula muscular lisa também é revestida externamente por uma camada de glicoproteína amorfa (glicocálix). Seu sarcolema apresenta, como característica, uma grande quantidade de vesículas de pinocitose em diferentes estágios de formação. Frequentemente, os sarcolemas de duas células musculares adjacentes se aproximam muito, formando uniões estreitas, do tipo zônula de oclusão e "gap". Essas estruturas não somente participam na transmissão do impulso de célula para célula, como também mantêm a união entre as células. Existe um núcleo longo e central por célula. Podemos observar, numa zona justanuclear do sarcoplasma, algumas mitocôndrias, elementos do retículo endoplasmático granular e grânulos de glicogênio. Também se encontra presente o aparelho de Golgi, pouco desenvolvido. A atividade contrátil característica do músculo liso está relacionada com a estrutura e organização de seus filamentos de actina e de miosina, que não exibem a mesma organização paracristalina encontrada nas fibras estriadas. A célula muscular lisa apresenta feixes de miofilamentos que se cruzam em todas as direções, formando uma trama tridimensional. Estes feixes pareciam conter apenas filamentos finos, de 5-7 nm formados de actina, até que estudos de difração de raios-X realizados em células vivas mostraram a presença de filamentos grossos, de miosina, com 16 nm de diâmetro.

Além dos filamentos de actina e de miosina, a célula muscular lisa exibe uma trama de filamentos intermediários que constituem uma espécie de matriz, participando do cito esqueleto. Nos locais onde estes filamentos se ligam à membrana celular existem corpos densos, alongados, presentes também no interior do citoplasma, unindo os filamentos uns aos outros.

As células musculares lisas não possuem sistema T e seu retículo sarcoplasmático (regulador do fluxo de cálcio) é extremamente reduzido. As vesículas de pinocitose são numerosas e desempenham um papel na entrada e saída do íon cálcio.

A célula muscular lisa, além da sua capacidade contrátil, pode também sintetizar colágeno do tipo III, fibras elásticas e proteoglicanas, atividade esta considerada até recentemente exclusiva dos fibroblastos. Esta atividade foi bem demonstrada nas paredes arteriais e uterina, mas é provavelmente generalizada no tecido muscular liso. As células musculares em atividade sintética mostram o retículo endoplasmático granular desenvolvido.

Existem terminações nervosas no músculo liso, mas o grau de controle da contração muscular pelo sistema nervoso varia. Em alguns casos, como, por exemplo, no músculo liso de dutos deferentes, o estímulo nervoso é intenso, enquanto o músculo liso de outros órgãos como o da parede intestinal, têm um ritmo inerente que, o qual, pode ser modificado por impulsos nervosos. Neste último órgão, as junções musculares são importantes na transmissão do estímulo de célula para célula.

O músculo liso recebe fibras do sistema nervoso simpático e do parassimpático e não exibe junções neuromusculares elaboradas (placas motoras) as quais ocorrem apenas no músculo esquelético. Frequentemente os axônios terminam formando dilatações no tecido conjuntivo localizado entre as fibras musculares lisas. Estas dilatações contêm vesículas sinápticas com os neurotransmissores acetilcolina (terminações colinérgicas) ou noradrenalina (terminações adrenérgicas). Algumas destas dilatações axônicas estão muito próximas (10-20 nm) da superfície da célula muscular,

porém há dilatações localizadas a uma distância de 100 nm ou mais. Neste último caso o neurotransmissor terá de se difundir através do tecido conjuntivo, para atingir os receptores da membrana da célula muscular lisa. As terminações nervosas adrenérgicas e colinérgicas atuam de modo antagônico, estimulando ou deprimindo a atividade contrátil do músculo. Em alguns órgãos as terminações colinérgicas estimulam e as adrenérgicas inibem a contração, enquanto em outros ocorre o contrário.

O **endométrio** é formado por um epitélio e sua lâmina própria contendo glândulas tubulosas simples que às vezes se ramificam nas porções mais profundas (próximo ao miométrio).

O epitélio, ao mesmo tempo, reveste e secreta glicoproteínas (muco). Suas células são cilíndricas e algumas apresentam cílios. O epitélio das glândulas uterinas é semelhante ao epitélio superficial, porém, são raras as células ciliadas neste epitélio.

O tecido conjuntivo que constitui a lâmina própria é rico em células e apresenta abundantes materiais extracelular, sendo suas fibras conjuntivas principalmente do tipo reticular.

Sob a ação dos hormônios ovarianos (estrógenos e progesterona) produzidos por estímulo da adeno-hipófise, o endométrio sofre modificações estruturais cíclicas, constituindo o **ciclo menstrual**. A duração do ciclo estral é variável, mas freqüentemente cada ciclo se completa em 28 dias na mulher.

3.3.6 Funções do Útero

Transporte e capacitação dos espermatozóides no seu percurso até o oviduto preparando-os para a fertilização, mediante contrações da musculatura uterina e do oviduto e as respectivas secreções; (GONZALES F. H. D. 2002)

(a) Controle da função luteal, mediante mecanismos luteolíticos causados pela prostaglandina F, produzida pelas células endometriais. Estas são transportadas pela veia uterina, passando por um trajeto veno-arterial envolvendo as anastomoses com as artérias ováricas, para o corpo lúteo, provocando a regressão luteal;

(b) Favorecimento da implantação e do desenvolvimento inicial do embrião, bem como o crescimento do feto durante a gestação.

No útero gestante, vários mecanismos confluem para produzir um efeito anti-luteolítico e evitar que o corpo lúteo regrida.

3.3.7 Cérvix

A cérvix é a porção do colo uterino que se projeta na luz do fundo da vagina. Possui uma espessa parede e um canal de luz muito estreita.

A cérvix secreta um muco viscoso que contém mucina (glicoproteínas), além de enzimas específicas como glucuronidase, amilase, fosforilase, esterase e fosfatases. O muco cervical pode acumular fluído e restos celulares de todo o trato genital. A cérvix não possui glândulas.

Dois tipos de células são diferenciadas no epitélio da cérvix, as ciliadas e secretoras não ciliadas. A mucosa forma inúmeras criptas primárias e secundárias que aumentam a superfície secretora. O muco apresenta cristalização sob a forma de folhas de samambaia, particularmente nos períodos de estro e proestro. A secreção do muco cervical é estimulada pelos estrógenos e inibida pelo progesterona. As mudanças do muco cervical durante o estro tem como função facilitar a penetração dos espermatozóides. Na rata, no período do cio, ocorre aumento na quantidade e na cristalização do muco, bem como aumento do pH e diminuição da viscosidade e do conteúdo celular. Na fase luteínica, as características se invertem.

O tamanho da cérvix aumenta com a gestação e com o número de partos. Durante a gestação o muco cervical é viscoso, espesso e não cristaliza, servindo como barreira contra o trânsito de espermatozóides e possíveis infecções (rotulado como rolha mucóide).

As funções da cérvix podem ser resumidas em:

(a) Transporte de espermatozóides mediante o muco cervical secretado para o interior do útero; o muco guia e nutre os espermatozóides aumentando a sobrevivência;

(b) “Reservatório” de espermatozóides nas criptas cervicais;

(c) Participação na seleção dos espermatozóides;

(d) Proteção do útero contra infecções.

3.4 Uso da Colchicina como Agente Mitostático

A colchicina é um agente mitostático utilizado amplamente como substância experimental para estudar a divisão e a função celular e como medicamento em lesões de artrite reumatóide.

Em virtude de se ligar a tubulina, a colchicina interfere com a função dos fusos mitóticos e causa a despolimerização e desaparecimento dos microtúbulos fibrilares dos granulócitos, parando a fase da mitose em metáfase.

A colchicina pode interromper a divisão das células animais e vegetais “*in vitro*” e “*in vivo*”.

A mitose é interrompida na fase de metáfase, devido à impossibilidade de formar fusos.

O objetivo do uso da colchicina é de facilitar a avaliação quantitativa de células em divisão, pois haveria bloqueio das mitoses em metáfase.

Figura 9: Estrutura Química do princípio ativo COLCHICINA

4. Materiais e Métodos

4.1 Animais de Experimentação

Foram utilizadas neste trabalho 22 (vinte e dois) ratas adultas da raça Wistar cujos pesos variavam entre 300 a 350 gramas.

Os animais obtidos no biotério da F.M.R.P. foram colocados em gaiolas apropriadas e mantidos durante cinco dias antes do início dos experimentos, para uma total aclimação ao novo ambiente.

Durante a duração do experimento os animais receberam água e ração balanceada (Purina®) à vontade. Antes de serem submetidos às cirurgias, os animais foram manipulados o mínimo possível a fim de se evitar stress e deixados previamente 12 horas de jejum.

4.1.1 Padronização da Cirurgia

Dois animais foram utilizados na padronização dos procedimentos cirúrgicos: uterotomia a qual consta de uma secção longitudinal da espessura total de uma das paredes uterinas, estes animais foram excluídos quaisquer avaliações posteriores.

4.1.2 Grupos Experimentais

Utilizamos na presente pesquisa 22 animais, assim agrupados:

4.1.2.1 Grupo Experimental I

Um grupo experimental constou de 10 animais os quais foram submetidos à uterotomias, mediante a incisão longitudinal da espessura total da parede de um dos cornos uterinos. Estes animais foram estimulados durante 10 dias consecutivos, após 24 horas da cirurgia por 15 minutos com o U.S.P. de baixa intensidade.

O material colhido desses animais foram utilizados para posterior avaliação dos efeitos da estimulação e foram, daqui para frente, identificados como **estimulados**.

4.1.2.2 Grupo Experimental II

Um grupo experimental constou de 10 animais os quais foram submetidos à uterotomia, mediante a incisão longitudinal da parede de um dos cornos uterinos, da mesma maneira que os animais do grupo I, mas submetidos durante 10 dias a uma sonicação fictil e submetidos a idêntica manipulação aos animais do grupo experimental I, porem sem receber os estímulos do U.S.P.

O material colhido destes animais foi utilizado para uma posterior avaliação dos tecidos e rotulados como **não estimulados** ou **controle**.

4.2 Procedimento Cirúrgico

Os animais foram anestesiados mediante injeções intramusculares de **Rompum®** (cloridrato de xilazina) e **Ketalar®** (cloridrato de cetamina) em proporção equivalente, na quantidade de 0,10ml da solução para cada 100g de peso. A anestesia aplicada foi suficiente para o desenvolvimento temporal de todo o processo operatório.

Após a contenção dos animais em prancha operatória, fazia-se a tricotomia em toda a área inferior do abdome (fig. 10).

A assepsia da parede abdominal foi feita com álcool iodado 70° (2%), após, fazia-se uma laparotomia mediana de aproximadamente 5 cm de extensão. Com o auxílio de uma pinça anatômica, prendia-se um dos cornos uterinos do animal, (sempre o esquerdo), fazendo uma secção longitudinal de aproximadamente 1 cm de comprimento de toda espessura da parede uterina, com o auxílio de uma tesoura oftálmica. Em sequência, suturava-se a parede uterina com fios de sutura (mononyion 6-0) com pontos separados. A seguir, prendia-se o corno uterino operado com um ponto de sutura na face interna da parede do abdome para manter, relação mais próxima da área da parede abdominal a ser estimulada com o U.S.P. O transdutor era acoplado sempre com a interposição de gel acoplante à porção da parede abdominal na qual fora fixado o corno uterino operado.

Em sequência fez-se a síntese, por planos, da parede abdominal com o mesmo tipo de fio.

Figura 10: Animal após anestesia, contido em prancha operatória com a região ventral do abdome tricotomizado.

Figura 11: Secção da parede abdominal, mostrando a cavidade abdominal.

Figura 12: Corno uterino esquerdo pinçado e exposto.

Figura 13: Seta indicativa da extensão da uterotomia de aproximadamente 1,5 cm no corno uterino esquerdo.

Figura 14: Sutura do cordão uterino com fixação à parede muscular do abdome.

Figura 15: Síntese em diferentes planos, da parede abdominal.

Figura 16: Aspecto final da sutura final da parede abdominal.

Após a cirurgia os animais permaneceram isolados no biotério, por 12 horas, até total recuperação do anestésico.

4.3 Equipamento Gerador de Ultra-som e Parâmetros Usados

O equipamento utilizado neste experimento foi um estimulador ultra-sônico, cujo circuito eletrônico e o transdutor foram projetados elaborados e montados no setor de Pós Graduação Interunidades Bioengenharia-USP, com sede na Escola de Engenharia da Universidade de São Paulo na cidade de São Carlos no estado de São Paulo.

Figura 17: Aparelho de Ultra-som Pulsátil de Baixa Intensidade.

Durante todo o processo de sonicação, o U.S.P. operou com os parâmetros físicos abaixo relacionados:

Tabela 1- Parâmetros do U.S.P. utilizados neste experimento.

Forma de onda:	pulsada
Largura do pulso:	200 us
Amplitude:	25 v (pico a pico)
Intensidade Acústica	16mw/cm ²
Frequência de repetição:	1 kHz
Frequência do PZT-4:	1.5MHz
Área do transdutor:	3,8cm ²

Dosimetrias avaliadas mediante dosímetro de Ultra-Som de precisão (modelo UPM-DT10 - OHNIC) foram executadas com a finalidade de estimar a constância (calibragem) dos parâmetros citados durante o período de sonicação (VALENTINI, E,A 2006).

4.4 A Sonicação com U.S.P.

A sonicação iniciava-se sempre, 24 horas após a cirurgia, com aplicações diárias, por via transcutânea de maneira estacionaria; por 15 minutos diários, por 10 dias consecutivos, com um intervalo de cerca de 24 horas entre as sonicações. Cuidou-se sempre de se fazer as sonicações no mesmo período do dia.

O transdutor era posicionado e acoplado com auxílio de um gel hidrossolúvel (GEL CONTACT), sobre a área da parede abdominal correspondente à região na qual o útero fora anteriormente fixado.

4.5 Uso da Colchicina

Seis horas antes do sacrifício, os animais de ambos os grupos experimentais receberam Colchicina via intramuscular, na dose de 0,10 miligramas de Colchicina para cada 100 gramas de peso corpóreo com o objetivo de bloquear as divisões celulares em metáfase, a fim de facilitar a avaliação quantitativa das mesmas, quando para o cálculo do índice mitótico.

A colchicina foi diluída previamente na proporção de 1 parte de colchicina para 10 partes de soro fisiológico e administrada pela via intramuscular.

4.6 Coleta do Material

Decorrido o tempo convencionado para a aplicação dos estímulos com o U.S.P. de baixa intensidade, fazia-se a retirada total dos úteros, para posterior processamento.

Os animais foram sacrificados sem sofrimento, mediante a aplicação excessiva de anestésico, permaneciam contidos na prancha cirúrgica. Após ampla secção da parede do abdome, localizava-se o corno uterino operado e fixado internamente à parede abdominal. Processava-se cuidados na dissecação para a retirada do corno uterino operado.

Exposto o útero procedia-se de imediato o gotejamento da solução fixadora, iniciando-se uma fixação precoce com a finalidade de preservar ao máximo a integridade do material a ser utilizado.

Cada corno de útero retirado era dissecado sob lupa com aumento final de 16X, para retirar o excesso de tecido conjuntivo e/ou gorduroso.

A seguir, cada seguimento do corno uterino operado era seccionado em fragmentos, os quais após identificação eram colocados em frascos separados contendo fixador.

Segmentos das áreas a serem analisadas foram fixados em formol tamponado a 10% por 48 horas para proceder a seguir, à inclusão rotineira em parafina.

Blocos e cortes de 7 μ m foram obtidos e corados com Hemalum (Hemaloxitina®) e Eosina para observação e avaliação histopatológica, sob microscopia de luz.

Procurou-se analisar, sempre que possível, cortes no sentido transversal do corno operado.

4.7 Análise Morfométrica e Estatística

Para a análise estatística, fizemos à contagem de mitoses em úteros de animais estimulados bem como de animais controles.

Os cortes foram analisados sob microscopia de luz sob aumento de 40x. O exame não ficou restrito a células do miométrio, mas estendeu-se também ao epitélio endometrial analisando-se o número de mitoses de células em metáfase, dessas estruturas.

Assim, quase toda a extensão do corte transversal de cada útero foi examinada para o estudo morfométrico do epitélio endometrial e da musculatura lisa do miométrio.

Quantificaram-se células do epitélio endometrial em metáfase para estabelecer-se o índice mitótico em relação à células endometriais quiescentes. Foram feitas essas contagens desses dois tipos de células, em cada um dos campos observados em cortes de úteros dos animais deste grupo.

Da mesma maneira foram contadas as células do miométrio bloqueadas em metáfase bem como as células quiescentes.

As contagens dessas células foram feitas em cada um dos campos dos cortes observados ao microscópio de luz, de cada útero dos animais deste grupo para o cálculo do índice mitótico.

Para levantamento do índice mitótico, foi aplicada a seguinte fórmula ($NM/NT \times 100$) sendo NM “número de células em metáfase”, NT “número de células totais”.

5. Resultados

A exposição dos nossos resultados foi ordenada de acordo com a proposta inicial do trabalho.

Com a administração da colchicina, os núcleos das células em processo de divisão foram bloqueados em metáfase. Este procedimento facilitou a diferenciação e a contagem dessas células, pelas características morfológicas dos núcleos e para a determinação do índice mitótico das estruturas avaliadas.

Apresentamos na **figura 18**, microfotografias de núcleos do epitélio endometrial normal e em metáfase.

Figura 18: Fotomicrografia dos aspectos dos núcleos de uma célula epitelial do endométrio normal e de uma célula cujo núcleo foi bloqueado em metáfase pela colchicina. (Aumento de 100x)

Após estímulo pelo U.S.P., pode ser observado que a irradiação sônica acelerou a divisão celular, tanto no **miométrico** quanto no **epitélio endometrial** traduzida pelo grande número de núcleos em metáfase.

Figura 19: Fotomicrografia de diferentes regiões do epitélio endometrial estimulado com Ultra-som pulsátil de baixa intensidade apresentando numerosas mitoses. Setas indicam núcleos de células em mitose bloqueadas em metáfase. (Aumento de 40x)

Figura 20: Fotomicrografia de diferentes regiões do epitélio endometrial de ratas após estimulação fictícia apresentando poucas mitoses. Setas indicam núcleos de células em mitose interrompidas em metáfase. (Aumento de 40x)

Figura 21: Fotomicrografias em maior aumento para melhor visualização das diferenças estruturais entre núcleos do epitélio endometrial estimulado pelo U.S.P. à esquerda e controle à direita. (Aumento de 80x)

Figura 22: Fotomicrografias de diferentes regiões do miométrio estimulado com Ultrassom pulsátil de baixa intensidade. Nota-se grande número de núcleos das células musculares lisas, em mitoses, interrompidas em metáfase (setas). (Aumento de 40x)

Figura 23: Fotomicrografias de regiões do miométrio submetido à estimulação fictícia mostrando poucos núcleos de células musculares lisas em metáfase. (Setas indicam células bloqueadas em metáfase) (Aumento de 60x)

Figura 24: Fotomicrografias em maior aumento de regiões do miométrio mostrando diferenças estruturais entre animais estimulados pelo U.S.P., à esquerda e controles a direita. (Aumento de 80x).

Optamos por apresentar a sequência de valores obtidos dos índices mitóticos do útero de animais estimulados e controles, representada pelo gráfico dos valores e respectivos dados numéricos.

Gráfico I

Na exposição gráfica dos valores do índice mitótico do epitélio endometrial nos animais submetidos à estimulação ultra-sônica mostra que nos animais estimulados houve aumento significativo do índice.

Os dados foram agrupados a intervalos de valores de 5 em 5 mitoses a cada grupo de 100 células analisadas e foram dispostos no eixo das abscissas do gráfico. O eixo das ordenadas está representando a percentagem de frequência com relação ao grupo analisado.

Tabela 2

Na tabela 2 constam valores quantitativos do epitélio endometrial

<i>Grupo</i>	<i>N</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>	<i>Desvio padrão</i>
Estimulado	30	705	23,5	89,98	9,48
Controle	30	136	4,53	11,77	3,43

Na **tabela 2** estão expressos os valores das médias, variâncias, e desvios padrão dos dois grupos, (estimulado e controle), para dados obtidos do epitélio endometrial.

A análise estatística pelo método da ANOVA mostrou diferenças significativas **P=<5**.

Gráfico II: Representação gráfica dos índices mitóticos do miométrio.

Gráfico II

Os achados para os índices mitóticos estão expressos no gráfico II mostrando um aumento significativo do índice mitótico na musculatura lisa do miométrio de animais submetidos à estimulação ultra-sônica.

Os dados foram dispostos a intervalos de valores no eixo das abscissas. No eixo das ordenadas estão os valores percentuais da frequência com relação aos grupos analisados.

Tabela 3

Na tabela 3 constam valores quantitativos da musculatura lisa.

Grupo	N	Soma	Média	Variância	Desvio padrão
Estimulado	30	158	5,26	14,40	3,79
Controle	30	67	2,23	2,52	1,59

Na **tabela 3** estão expressos os valores das médias, variâncias, e desvios padrão dos dois grupos, (estimulado e controle), para dados obtidos da musculatura lisa do miométrio.

A análise estatística pelo método da ANOVA mostrou diferenças significativas $P < 0,05$.

6. Discussão

Não foram encontrados na Literatura especializada trabalhos sobre o emprego do U.S.P. na regeneração de células musculares lisas e do epitélio endometrial. Os valores expressos nesta investigação sobre o índice mitótico das estruturas uterinas estudadas necessitariam de avaliação sobre os eventuais mecanismos de ação do U.S.P.

Os efeitos térmicos e não térmicos do ULTRA-SOM, e a variação de temperatura é proporcional ao pulso emitido, e numerosas pesquisas nesta área têm mostrado que o efeito da aplicação do Ultra-som pulsado de baixa intensidade não provoca *danos em tecidos animais* e sua ação biológica é atribuída a mecanismos não térmicos. (DYSON, 1987).

O resultado do tratamento das lesões em tecidos moles em animais é contraditório, alguns autores relatam um aumento na deposição do colágeno enquanto outros autores não relatam este fato (HILL, 1972). A diferença pode estar na freqüência utilizada na aplicação do U.S.P. em cada caso. Estudos indicam que altas freqüências são lesivas e podem danificar tecidos e células quando a intensidade utilizada ultrapassa o limiar de 100mW/cm² (HILL, 1972). Assim, este mesmo autor, considerou o limiar de 100mW/cm² de intensidade como não lesivo para os tecidos, com referência especial a desnaturação do colágeno.

HILL (1972), baseado nos achados do seu experimento *in vitro*, acredita que a atividade de cavitação seja difícil de ocorrer em tecidos de mamíferos.

HOGAN; BURKE; FRANKLIN (1982) investigaram o aumento do fluxo sanguíneo em tecido isquêmico de músculo de ratos submetidos à aplicação

do ultra-som pulsátil na frequência de 1 MHz, com intensidades que variavam entre 1,25 a 10,0 W/cm². A aplicação era por 5 minutos, em dias alternados, e por três semanas. Demonstraram uma melhora da circulação sanguínea nas arteríolas quando exposta a estímulos com à intensidade de 2,5 W/cm². Em curto prazo a estimulação dos músculos esqueléticos isquêmicos provocou ligeira constrição de arteríolas, porém quando estimuladas em longo prazo observaram uma melhora da perfusão do músculo isquemiado.

O ultra-som foi utilizado durante anos na prática clínica para o tratamento de lesões instaladas em tecidos moles (DYSON, 1987 – YOUNG, 1990) decorrentes de diferentes patologias em condições agudas ou crônicas (KITCHEN; PARTRIDGE, 1990). A imposição de tecidos a estímulos ultra-sônicos mostrou reações diferentes dependendo do estágio da lesão e dos parâmetros sônicos utilizados (MCDIARMID *et al.*, 1985).

BARNETTE *et al.* (1994), quanto aos eventuais mecanismos de ação do U.S.P., consideram a cavitação como o principal responsável pela maior parte dos efeitos biológicos. Relatando a possibilidade do Ultra-som pulsado na intensidade de 0.5W/cm² promover efeitos benéficos na reparação de tecidos moles.

BASSOLI, (2001); avaliou a regeneração de fibras musculares esqueléticas, mediante lesões produzidas experimentalmente no músculo glúteo de ratos adultos e verificou regeneração de fibras musculares estriadas bem como intensa formação neovascular, aumento do número de mitoses de células mioprecursoras, maior quantidade de miotubos e a formação de miofilamentos nas células estriadas em regeneração, estimuladas pelo USP.

ZI J. Z. *et al.* (2002), usaram cartilagem do externo de embriões de galinha e verificaram um retardo no progresso e na diferenciação hipertrófica do condrócito com o uso do ultra-som. Em outros experimentos destes mesmos autores, usando suspensões de células sanguíneas de galinhas, coelhos e de ratos expostas a um campo ultra-sônico calibrado com diferentes parâmetros, constataram, morfológicamente, a permeabilidade da membrana celular.

KOTARO *et al.* (2005), observaram aumento nos níveis de RNA mensageiro nas células osteoplásticas na medula óssea de ratos, após tratamento com ultra-som pulsado.

Os resultados apresentaram um significativo aumento no processo de multiplicação das células musculares lisas e do epitélio endometrial de animais submetidos à estimulação com o Ultra-som pulsado de baixa intensidade, em comparação ao epitélio e ao miométrio de animais controle, não estimulados.

Embora não tenha sido estabelecido o ciclo estral, que na rata é relativamente curto, seria interessante talvez, a avaliação desses achados sob eventuais influencias hormonais. Sabe-se que no epitélio vaginal humano a descamação do mesmo ocorre em consonância com a influência hormonal e as características das células descamadas permitem até o estabelecimento seguro do ciclo cito-hormonal da mulher. Isto seria a razão de imaginar que houvesse também influencias sobre o epitélio endometrial no sentido de modificar seu índice mitótico, como ocorre normalmente na mulher durante o ciclo hormonal.

7. Conclusão

Os resultados obtidos e demonstrados nesta pesquisa permitem admitir, mediante avaliações dos índices mitóticos, que o U.S.P. de Baixa Intensidade estimula intensa reprodução de células musculares lisas do miométrio bem como do epitélio endometrial, de úteros submetidos à uterotomias experimentais.

Nossos achados estimulam novas investigações, especialmente em animais pré-púberes ou quando animais adultos forem submetidos aos mesmos procedimentos, porem após ooforectomia prévia.

8. Referências Bibliográficas

ALVES, J.M. (1988). **Efeitos da energia ultra-sônica na regeneração da pele de animal com queimadura por calor**. 79p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Interunidades em Bioengenharia EESC/FMRP/IQSC, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1988.

BARNETTE, S.B. et al. (1994). Current status of reserch on biophysical effects of ultrasound. **Ultrasound in Medicine & Biology**, Elmsford, v.20, n.3, p.205-218.

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**. 93p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Interunidades em Bioengenharia EESC/FMRP/IQSC, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2001.

BRAND JR., J.C. et al. (1999). Does pulsed low intensity ultrasound allow early return to normal activities when treating stress fractures? A review of one tarsal navicular and eight tibial stress fractures. **Iowa Orthopaedic Journal**, Iowa, v.19, n., p.26-30, mês.

CARRO, A.P.M.C. (1998). **Uso da matriz óssea desmineralizada associada a estimulação ultra-sônica pulsada de baixa intensidade na correção óssea: estudo experimental em coelhos**. 49p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Interunidades em Bioengenharia EESC/FMRP/IQSC, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1998.

CRISCI, A.R. (2002). **Estudo experimental dos efeitos do ultra som pulsado de baixa intensidade sobre a regeneração de nervos ciático de ratos após neurotomia, mediante análise morfológica e morfométrica**. 75p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Interunidades em Bioengenharia EESC/FMRP/IQSC, Universidade de São Paulo, 2002.

CRUZ, A.F. (2005). **Estudo dos efeitos da irradiação ultrasônica pulsada de baixa intensidade sobre o desenvolvimento de segmentos de coluna vertebral implantadas em camundongos isogênicos**. 105p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Interunidades em Bioengenharia EESC/FMRP/IQSC, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

DUARTE, L.R. (1977). **Estimulação ultra-sônica do calo ósseo**. 109p. Tese (Livre Docência) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1977.

DYSON, M. (1987). Mechanisms involved in therapeutic ultrasound. **Physiotherapy**, London, v.73, n.3, p.116-120, Mar.

DYSON, M.; SUCKLING, J. (1978). Stimulation of tissue repair by ultrasound: a survey of the mechanisms involved. **Physiotherapy**, London, v.64, n.4, p.105-108, Apr.

FREDERICK, J.R. (1965). **Ultrasonic engineering**. New York: John Willey.

FRIZZEL, L.A.; DUNN, F. (1984). Biophysics of ultrasound. In: LEHMAN, J.F. **Therapeutic heat and cold**. 3.ed. London: Williams & Wilkins. Cap.8/10, p.353-562.

GONZALES, F.H.D. (2002). **Introdução à endocrinologia reprodutiva veterinária**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

GUIRRO, R.; FERREIRA, A.L.; GUIRRO, E. (1999). The use of hydroxyapatite associated with low intensity pulsed ultrasonic stimulation study with rabbits. **Journal Morph. Scz**, v.16, n.1, p.45-53.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. (1997). **Tratado de fisiologia médica**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

HADDAD, S. (1992). **Estímulo do testículo de ratos pré-púberes, púberes e adultos com ultra-som pulsado de baixa intensidade**. 93p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Interunidades em Bioengenharia EESC/FMRP/IQSC, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1992.

HILÁRIO, M. (1993). **Radiação ultra-sônica de baixa intensidade na reparação tecidual de úlceras tróficas de perna**. 153p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Interunidade em Bioengenharia EESC/FMRP/IQSC, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1993.

HILL, C.R. (1972). Ultrasonic exposure thresholds for changes in cells and tissues. **The Journal of the Acoustical Society of America**, New York, v.52, n.23, p.667-672, Aug.

HOGAN, R.D.; BURKE, K.M.; FRANKLIN, T.D. (1982). The effect of ultrasound on micro vascular hemodynamics in skeletal muscle: effects during ischemia. **Microvascular Research**, New York, v.23, n.3, p.370-379.

HURME, T.; KALIMO, H. (1992). Activation of myogenic precursor cells after muscle injury. **Medicine and Sciences in Sports and Exercise**, Madison, v.24, n.2, p.197-205.

JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J.S.F. (1990). **Histologia básica**. 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

KITCHEN, S.S.; PARTRIDGE, C.J. (1990). A review of therapeutic ultrasound - part 1: background and physiological effects. **Physiotherapy**, London.

KOKUBU, T. et al. (1999). Low intensity pulsed ultrasound exposure increases prostaglandin E_2 production via the induction of cyclooxygenase 2 mRNA in mouse osteoblasts. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v.256, n.2, p.284-287, Mar.

KOTARO, S. et al. (2005). **Early gene response to low-intensity pulsed ultrasound in rat osteoblastic cells**. Chicago: Department of Anatomy and Cell Biology, Rush University Medical Center.

KRISTIANSEN, T.K. et al. (1997). Accelerated healing of distal radial fractures with the use specific, low intensity ultrasound: a multicenter, prospective, randomized, double-blind, placebo- controlled study. **Journal of Bone Joint Surgery American**, Boston, v.79, n.7, p.961 -973, July.

LEITE, A.J. (1989). **Quantificação da ruptura celular produzida por ultra som em eritrócitos de sangue humano**. 125p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1989.

LEFAUCHER, J.P.; SÉBILLE, A. (1995). The cellular events of injured muscle regeneration depend on the nature of injury neuromusc. **Disord.**, v.5, n.6, p.501-509.

MCDIARMID, T. et al. (1985). Ultrasound and the treatment of pressure sores. **Physiotherapy**, London, v.71, n.2, p.66-67.

MCLEOD, K. (1995). Fracture healing using low-level ultrasound, Presented at the IEEE international Ultrasonic workshop, Seattle, 1995.

MORTIMER, A.J.; DYSON, M. (1988). The effect of therapeutic ultrasound on aucium uptake in fibroblasts. **Ultrasound in Medicine and Biology**, Elmsford, v.14, n.6, p.499-506.

NOLASCO, M.A. (1993). **Efeitos da estimulação ultra-sônica sobre a cicatrização da pele de ratos diabéticos**. 62p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Interunidades em Bioengenharia EESC/FMRP/IQSC, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1993.

OKUNO, E. et al. (1996). **Física para ciências biológicas e biomédicas**. São Paulo: Harba.

RICHARDSON, P.D. (1989). Piezoelectric polymers. **IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine**, New York, v.8, n.2, p.14-16, June.

SILVA, O.L. (1987). Estudo do mecanismo de ação do ultra-som na estimulação do crescimento ósseo. 215p. Dissertação (Mestrado), Escola de Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; Universidade de São Paulo.

TANZER, M. et al. (1996). Effect of noninvasive low intensity ultrasound on bone growth into porous- coated implants. **Journal of Orthopaedic Research**, New York, v.1, n.6, p.901-906, Nov.

TER HAAR, G. (1987). Basic physics of ultrasound. **Physiotherapy**, London, v.73, n.3, p.110-113.

TER HAAR, G. et al. (1982). Ultrasonically induced cavitation in vivo. **British Journal of Cancer**, London, v.45, n.5, p.151-155.

VALENTINI, E.A. (2006). **Avaliação do campo acústico gerado pelos aparelhos de ultra-som terapêutico do programa de pós-graduação interunidades em bioengenharia, de acordo com a norma NBR-IEC 1689**. 97p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Interunidades em Bioengenharia EESC/FMRP/IQSC, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

XAVIER, C.; DUARTE, L.R. (1983). Estimulação ultrasônica do calo ósseo. **Revista Brasileira de Ortopedia**, Belo Horizonte, v.18, n.3, p.73-80, maio/jun.

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

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

WELLS, P.N.T. (1977). **Biomedical ultrasonics**. London: Academic Press.

ZI, J.Z. et al. (2002). **The influence of pulsed low-intensity ultrasound on matrix production of chondrocytes at different stages of differentiation: an explant study**. Baltimore: National Institutes of Health, National Institute on Aging.

ZISKIN, M.C. (1985). Clinics in diagnostic ultrasound. In: NYBORG, W.L.; ZISKIN, M.C. **Biological effects so ultrasound**. New York: Churchill Livingston.

ZORLU, U. et al. (1998). Comparative study of the effect of ultrasound and electrostimulation on bone healing in rats. **American Journal of Physical & Rehabilitation**, Baltimore, v.77, n.5, p.427-432, Sept./Oct.

9. Apêndice

Índice Mitótico do Estimulado e Controle do Epitélio Endometrial

<i>Estimulado</i>	<i>Controle</i>	<i>SQ E</i>	<i>SQ C</i>
17	0	42,25	20,550809
18	1	30,25	12,484209
32	1	72,25	12,484209
33	1	90,25	12,484209
9	2	210,25	6,4176089
46	2	506,25	6,4176089
13	3	110,25	2,3510089
14	3	90,25	2,3510089
14	3	90,25	2,3510089
19	3	20,25	2,3510089
20	3	12,25	2,3510089
10	4	182,25	0,2844089
11	4	156,25	0,2844089
23	4	0,25	0,2844089
25	4	2,25	0,2844089
38	4	210,25	0,2844089
19	5	20,25	0,2178089
25	5	2,25	0,2178089
39	5	240,25	0,2178089
18	6	30,25	2,1512089
19	7	20,25	6,0846089
19	7	20,25	6,0846089
22	7	2,25	6,0846089
34	7	110,25	6,0846089
39	7	240,25	6,0846089
28	8	20,25	12,018009
19	1	20,25	12,484209
27	1	12,25	12,484209
30	12	42,25	55,751609
25	16	2,25	131,48521
705	136	2609,5	341,46667

Estimulado e Controle de Mitose do Endométrio

<i>Grupo</i>	<i>N</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>	<i>Desvio padrão</i>
Estimulado	30	705	23,5	89,98	9,48
Controle	30	136	4,53	11,77	3,43

ANOVA ($\alpha=0,05$) Estimulado e Controle de Mitose do Endométrio

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	5396,02	1	5396,01	106,05	1E-14	4,00
Dentro dos grupos	2950,97	58	50,87			
Total	8346,98	59				

Estimulado e Controle de Mitose Musculatura

<i>Estimulado</i>	<i>Controle</i>	<i>SQ Estimulado</i>	<i>SQ Controle</i>
6	1	0,5377777	1,521110289
4	3	1,6044445	0,587778289
3	2	5,1377779	0,054444289
1	0	18,204445	4,987776289
2	3	10,671111	0,587778289
9	4	13,937778	3,121112289
4	4	1,6044445	3,121112289
14	5	76,271111	7,654446289
10	2	22,404444	0,054444289
10	0	22,404444	4,987776289
8	2	7,4711109	0,054444289
5	3	0,0711111	0,587778289
16	1	115,20444	1,521110289
7	3	3,0044443	0,587778289
3	2	5,1377779	0,054444289
4	2	1,6044445	0,054444289
3	0	5,1377779	4,987776289
1	2	18,204445	0,054444289
3	4	5,1377779	3,121112289
1	5	18,204445	7,654446289
3	0	5,1377779	4,987776289
4	1	1,6044445	1,521110289
7	3	3,0044443	0,587778289
9	2	13,937778	0,054444289
5	2	0,0711111	0,054444289
7	0	3,0044443	4,987776289
3	2	5,1377779	0,054444289
3	4	5,1377779	3,121112289
1	5	18,204445	7,654446289
2	0	10,671111	4,987776289
158	67	417,86667	73,36666667

Estimulado e Controle de Mitose Musculatura

<i>Grupo</i>	<i>N</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>	<i>Desvio padrão</i>
Estimulado	30	158	5,26	14,40	3,79
Controle	30	67	2,23	2,52	1,59

ANOVA ($\alpha=0,05$) Estimulado e Controle de Mitose Musculatura

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	138,01	1	138,01	16,29	0,00016	4,00
Dentro dos grupos	491,23	58	8,46			
Total	629,25	59				