

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA E DENSITOMÉTRICA DOS  
EFEITOS DO ULTRA-SOM TERAPÊUTICO DE 1 MHz,  
NA DOSE DE 0,5 OU 1 W/cm<sup>2</sup>, SOBRE O TECIDO  
ÓSSEO DE CÃES.**

**TESE DE DOUTORADO**

**Douglas Severo Silveira**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2007**

**AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA E DENSITOMÉTRICA DOS  
EFEITOS DO ULTRA-SOM TERAPÊUTICO DE 1 MHz, NA  
DOSE DE 0,5 OU 1 W/cm<sup>2</sup>, SOBRE O TECIDO ÓSSEO DE  
CÃES.**

**por:**

**Douglas Severo Silveira**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Cirurgia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Doutor em Medicina Veterinária.**

**Orientador: Prof. Dr. Ney Luis Pippi**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2007**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Rurais  
Programa de Pós-Graduação Em Medicina Veterinária**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Tese de Doutorado

**AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA E DENSITOMÉTRICA DOS EFEITOS DO  
ULTRA-SOM TERAPÊUTICO DE 1 MHz, NA DOSE DE 0,5 OU 1  
W/cm<sup>2</sup>, SOBRE O TECIDO ÓSSEO DE CÃES.**

elaborada por  
**Douglas Severo Silveira**

Como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Doutor em Medicina Veterinária**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

**Ney Luis Pippi, Phd. (UFSM)  
(Presidente/Orientador)**

**João Eduardo Wallau Schossler, Dr. (UFSM)**

**Carmen Lice Buchmann de Godoy, Dra. (UFSM)**

**Fabiano Sellos Costa, Dr. (UFES)**

**Lenir Cardoso Porfírio, Dra. (UFES)**

Santa Maria, 15 de março de 2007.

## **Dedicatória**

A Andréia Weiss, por todo amor,  
carinho, compreensão e amizade.

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Laboratório de Cirurgia Experimental, pela oportunidade de realizar mais uma etapa.

Ao Centro de Ciências Agrárias da Universidade do Espírito Santo, ao departamento de Medicina Veterinária e ao Hospital Veterinário, por me acolher de braços abertos e disponibilizar os meios para a realização da parte experimental e intelectual.

Ao Prof. Dr. Ney Luis Pippi, pela orientação, amizade e toda a paciência dedicada a este longínquo orientado.

Ao Prof. Dr. Alceu Gaspar Raiser, que me iniciou na nobre arte cirúrgica e de reabilitação, e fez despertar em mim o interesse pelo meio científico e pela docência.

Ao Prof. Dr. Fabiano Sellos Costa, pela co-orientação e grande auxílio no desenvolver desta tese e também pela moradia.

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Vulcano pela disponibilidade na realização dos exames densitométricos.

Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária que fizeram parte de minha formação e enriqueceram minha experiência clínico-cirúrgica.

Aos docentes diretamente envolvidos no decorrer deste trabalho: Prof. MSc. Jair da Costa Jr.; Prof. MSc. Evandro Favarato; Prof. Dr. Gilson Fernandes da Silva; Prof. MSc. Romildo Azevedo Jr.; Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lenir Porfírio e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Louisiane Nunes.

Às eternas monitoras, estagiárias dedicadas e amigas queridas, Laura Conti e Lorena Vescovi, pelo empenho e dedicação no decorrer deste e de outros trabalhos, pela amizade e pelo carinho.

Aos estagiários: Guilherme Cabral Morais, Manuela Aleluia Drago, Mayarah Gross Fregona, Pricila Aparecida Grasse Pietralonga, Sheila Nogueira Ribeiro, Thiago Casagrande Trabach e Poliana Cassago pela ajuda no decorrer da experimentação.

Ao doutorando e amigo Fabrício Braga pela amizade, paciência, convívio distante e por toda a burocracia enfrentada em meu lugar.

## RESUMO

Tese de Doutorado  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária  
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil.

### **AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA E DENSITOMÉTRICA DOS EFEITOS DO ULTRA-SOM TERAPÊUTICO DE 1 MHz, NA DOSE DE 0,5 OU 1 W/cm<sup>2</sup>, SOBRE O TECIDO ÓSSEO DE CÃES.**

Autor: Douglas Severo Silveira  
Orientador: Ney Luis Pippi  
Local e Data da Defesa: Santa Maria, 15 de março de 2007.

As lesões tendíneas nas extremidades distais dos membros, estão entre as mais freqüentes alterações do aparelho locomotor da rotina clínico-cirúrgica humana e animal e, não raro, necessitam de terapias adjuvantes para seu completo retorno às funções fisiológicas. O ultra-som terapêutico (UST) é a modalidade mais utilizada nas clínicas de reabilitação para tratar lesões tendíneas, mas devido à falta ou a divergências de estudos específicos sobre seus efeitos no tecido ósseo, sua utilização sobre as regiões distais dos membros, ricas em protuberâncias ósseas e áreas desprovidas de cobertura muscular, sempre preocuparam os profissionais da área médica. No intuito de esclarecer os efeitos do UST sobre o tecido ósseo, 18 cães foram divididos aleatoriamente em três grupos, onde receberam tratamento ultra-sônico contínuo, de 1MHz, durante 5 minutos diários, por um período de 20 dias sobre a região crânio-distal do rádio e ulna. De acordo com os grupos pré-determinados, a freqüência do UST aplicada foi de 0,5 ou 1 W/cm<sup>2</sup>. Foram mensurados os níveis séricos de proteínas totais, albumina, cálcio total, cálcio iônico, fósforo, fosfatase alcalina e fosfatase alcalina óssea no momento anterior ao começo da terapia e após 4, 7, 11, 14 e 20 dias de tratamento. Também foram radiografadas as regiões tratadas, para análise de densitometria óssea em imagens radiográficas, antes da terapia e ao final do tratamento. Os exames laboratoriais detectaram níveis séricos normais para os principais itens pesquisados, apenas a albumina foi inferior aos valores de referência. As análises estatísticas dos resultados obtidos evidenciaram que o UST causou alterações no metabolismo mineral ósseo e na atividade dos osteoblastos, principalmente nos primeiros 7 dias de aplicação, porém não alteraram a densidade mineral óssea, não importando a dose utilizada (0,5 ou 1 W/cm<sup>2</sup>). Conclui-se que dentro dos parâmetros utilizados no experimento, a utilização do UST em regiões ósseas protuberantes ou desprovidas de cobertura muscular pode ser feita com segurança.

Palavras-chave: reabilitação; fisioterapia veterinária; densidade mineral óssea.

## **ABSTRACT**

Tese de Doutorado  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária  
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil.

### **BIOCHEMICAL AND DENSITOMETRIC EVALUATIONS OF THE EFFECTS OF THE THERAPEUTIC ULTRASOUND OF 1 MHz IN THE DOSAGE OF 0.5 OR 1 W/cm<sup>2</sup> ON THE BONE TISSUE OF DOGS.**

Autor: Douglas Severo Silveira  
Orientador: Ney Luis Pippi  
Local e Data da Defesa: Santa Maria, 15 de março de 2007.

Tendineous injuries on distal extremity of members are among the most frequent alterations of the locomotor system in both human and animal clinic-surgical routine and frequently adjuvant therapies are needed for the complete return of the physiological functions. The Therapeutic Ultrasound (TUS) is the most commonly used mode of treating tendineous injuries in rehabilitation clinics. However, due to the lack or the disagreements on specific studies about its effects on bone tissues, the use of TUS on distal regions of members, rich in bone protuberances and areas without muscular covering, always worries the professionals of the medical area. With the intention of clarifying the effects of TUS on bone tissue, 18 dogs were separated randomly into 3 groups, in which they received continuous ultrasonic treatment of 1 MHz for 5 minutes during 20 days on the cranium-distally region of the radio and ulna. According to the pre-determined groups, the frequency of TUS applied was of 0.5 or 1 W/cm<sup>2</sup>. The serum levels of total proteins, albumin, total calcium, ionic calcium, phosphates, alkaline phosphatase and bone alkaline phosphatase, were measured before the beginning of the therapy and after days 4, 7, 11, 14 and 20 of the treatment. The treated regions were also radiographed for analysis of bone densitometry in radiographic images before the therapy and at the end of the treatment. The laboratory exams detected normal serum levels for the main items researched, excepted for albumin which was inferior to the reference values. The statistic analysis of the results obtained show that the TUS caused alteration on the mineral bone metabolism and on the activity of the osteoblasts, especially on the first 7 days of the application, but did not alter the mineral bone density, no matter what dose was used (0.5 or 1 W/cm<sup>2</sup>). One can conclude that for the parameters in the experiment, TUS in regions of bone protuberances or deprived of muscular covering can be applied with safety

Keywords: rehabilitation, veterinary physiotherapy, bone mineral density.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Profundidade média em que a intensidade do feixe é reduzida em 50% nos diferentes meios biológicos.....	22
Tabela 2 – Porcentagem da onda incidente refletida pelas várias interfaces teciduais .....	23
Tabela 3 – Valores médios obtidos nos exames bioquímicos do Grupo 1. Comparativo entre o início do tratamento (T0) e os demais tempos de coletas (T1 a T5).....	48
Tabela 4 – Valores médios obtidos nos exames bioquímicos do Grupo 2. Comparativo entre o início do tratamento (T0) e os demais tempos de coletas (T1 a T5).....	49
Tabela 5 – Valores médios obtidos nos exames bioquímicos do Grupo 3. Comparativo entre o início do tratamento (T0) e os demais tempos de coletas (T1 a T5).....	49
Tabela 6 – Valores médios obtidos na densitometria óptica em imagem radiográfica (mmAl) dos Grupo 1, 2 e 3. Comparativo entre o momento inicial do tratamento (T0) e o momento final do tratamento (T5).....	50
Tabela 7 – Valores médios obtidos nos exames bioquímicos. Comparativo entre o grupo 1 (G1) e o grupo 2 (G2) no 7º dia de tratamento (T2).	51
Tabela 8 – Valores médios obtidos nos exames bioquímicos. Comparativo entre o grupo 1 (G1) e o grupo 3 (G3) no 11º dia de tratamento (T3). .....	51
Tabela 9 – Valores médios obtidos nos exames bioquímicos. Comparativo entre o grupo 1 (G1) e o grupo 3 (G3) no 14º dia de tratamento (T4). .....	52



<b>Tabela 10 – Valores médios obtidos nos exames bioquímicos. Comparativo entre o grupo 1 (G1) e o grupo 3 (G3) no 20º dia de tratamento (T5).</b> .....	<b>52</b>
<b>Tabela 11 – Valores médios obtidos nos exames bioquímicos. Comparativo entre o grupo 2 (G2) e o grupo 3 (G3) no 4º dia de tratamento (T1).</b>	<b>52</b>
<b>Tabela 12 – Valores médios obtidos nos exames bioquímicos. Comparativo entre o grupo 2 (G2) e o grupo 3 (G3) no 11º dia de tratamento (T3).</b> .....	<b>53</b>
<b>Tabela 13 – Valores médios obtidos nos exames bioquímicos. Comparativo entre o grupo 2 (G2) e o grupo 3 (G3) no 14º dia de tratamento (T4).</b> .....	<b>53</b>
<b>Tabela 14 – Valores médios obtidos nos exames de densitometria óssea (mmAL). Comparativo entre os grupos 1, 2 e 2 (G1, G2 e G3), no momento inicial (T0), no momento final (T5) e entre o momento inicial e o momento final (T0-T5).</b> .....	<b>54</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Ultra-som terapêutico Sonopulse Special, de 1 e 3 MHz, e transdutor, da marca Ibramed®. ....38**
- Figura 2 – Detalhe do transdutor com duas áreas efetivas de radiação (ERA), de 1 e 3,5 cm<sup>2</sup>, e do visor de cristal líquido do ultra-som terapêutico.38**
- Figura 3 – Terapia ultra-sônica com 1MHz, modo contínuo, direto, não estacionário, com gel à base de água como meio acoplador, intensidade de 0,5 W/cm<sup>2</sup> ou 1 W/cm<sup>2</sup>. ....39**
- Figura 4 – Espectrofotômetro da marca Bioespectro®, modelo SP-22, utilizado para a leitura das absorvâncias das amostras de soros. ....41**
- Figura 5 - Chassis 24x30 cm, com marcações para o posicionamento padrão do membro anterior a ser radiografado, e fixado lateralmente ao centro do chassi uma escala densitométrica de alumínio (“phantom”). ....43**
- Figura 6 - Aparelho de raios-X da marca Omega®, modelo 100/100 T. ....44**
- Figura 7 – Posicionamento para projeção crânio-caudal da região distal do rádio e ulna. Distância foco-filme de 90 cm, quilovoltagem fixa 65 KVp e tempo de exposição entre 0,02 e 0,05 segundos. ....44**
- Figura 8 – Radiografia da extremidade distal do membro torácico esquerdo de um cão. Projeção crânio-caudal. Posicionado lateralmente ao membro encontra-se uma escala densitométrica de alumínio (“phantom”). ....45**
- Figura 9: Tela do programa computacional Cromox 3.1 Vet® para análise da densidade mineral óssea da extremidade distal do rádio. Fonte Brinholi (2004). ....46**

- Figura 10: Tela do programa computacional Cromox 3.1 Vet<sup>®</sup> para análise da densidade mineral óssea da extremidade distal do rádio: seleção da área óssea a ser analisada (área retangular selecionada ao centro). 46**
- Figura 11: Tela do programa computacional Cromox 3.1 Vet<sup>®</sup> para análise da densidade mineral óssea da extremidade distal do rádio: apresentação dos resultados.....47**
- Figura 12 – Oscilações das médias de cálcio total, cálcio iônico e fósforo nos grupos G1, G2 e G3, entre o momento inicial (T0) e o final do tratamento (T5). .....49**
- Figura 13 – Oscilações das médias de fosfatase alcalina (FA) e fosfatase alcalina óssea (FAO) nos grupos G1, G2 e G3, entre o momento inicial (T0) e o final do tratamento (T5).....50**

## LISTA DE APÊNDICES

- Apêndice A – Valores médios obtidos nos exames de proteínas totais e albumina do Grupo 1. Comparativo entre o início do tratamento (T0) e os demais tempos de coletas (T1 a T5).....70**
- Apêndice B – Valores médios obtidos nos exames de proteínas totais e albumina do Grupo 2. Comparativo entre o início do tratamento (T0) e os demais tempos de coletas (T1 a T5).....70**
- Apêndice C – Valores médios obtidos nos exames de proteínas totais e albumina do Grupo 3. Comparativo entre o início do tratamento (T0) e os demais tempos de coletas (T1 a T5).....70**
- Apêndice D – Valores médios do peso corpóreo dos animais (Kg) dos Grupo 1, 2 e 3. Comparativo entre o momento inicial do tratamento (T0) e o momento final do tratamento (T5).....71**
- Apêndice E – Tela do programa computacional Cromox 3.1 Vet<sup>®</sup> para análise da densidade mineral óssea da extremidade distal do rádio: calibração da escala de alumínio (“phantom”).....71**
- Apêndice F – Valores médios obtidos nos exames bioquímicos. Comparativo entre o grupo 1 (G1) e o grupo 2 (G2) no momento anterior ao início do tratamento (T0). .....72**
- Apêndice G – Valores médios obtidos nos exames bioquímicos. Comparativo entre o grupo 1 (G1) e o grupo 3 (G3) no momento anterior ao início do tratamento (T0). .....72**
- Apêndice H – Valores médios obtidos nos exames bioquímicos. Comparativo entre o grupo 2 (G2) e o grupo 3 (G3) no momento anterior ao início do tratamento (T0). .....72**
- Apêndice I – Valores médios obtidos nos exames bioquímicos. Comparativo entre o grupo 1 (G1) e o grupo 2 (G2) no quarto dia de tratamento (T1).....73**

<b>Apêndice J – Valores médios obtidos nos exames bioquímicos. Comparativo entre o grupo 1 (G1) e o grupo 3 (G3) no quarto dia de tratamento (T1).....</b>	<b>73</b>
<b>Apêndice L – Valores médios obtidos nos exames bioquímicos. Comparativo entre o grupo 2 (G2) e o grupo 3 (G3) no sétimo dia de tratamento (T2).....</b>	<b>73</b>
<b>Apêndice M – Valores médios obtidos nos exames bioquímicos. Comparativo entre o grupo 1 (G1) e o grupo 2 (G2) no 11º dia de tratamento (T3).</b>	<b>74</b>
<b>Apêndice N – Valores médios obtidos nos exames bioquímicos. Comparativo entre o grupo 1 (G1) e o grupo 3 (G3) no 11º dia de tratamento (T3).</b>	<b>74</b>
<b>Apêndice O – Valores médios obtidos nos exames bioquímicos. Comparativo entre o grupo 1 (G1) e o grupo 2 (G2) no 14º dia de tratamento (T4).</b>	<b>74</b>
<b>Apêndice P – Valores médios obtidos nos exames bioquímicos. Comparativo entre o grupo 1 (G1) e o grupo 2 (G2) no 20º dia de tratamento (T5).</b>	<b>75</b>
<b>Apêndice Q – Valores médios obtidos nos exames bioquímicos. Comparativo entre o grupo 2 (G2) e o grupo 3 (G3) no 20º dia de tratamento (T5).</b>	<b>75</b>

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>1.1 Objetivos .....</b>	<b>18</b>
1.1.1 Objetivo geral .....	18
1.1.2 Objetivos específicos.....	18
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>19</b>
<b>2.1 O Ultra-Som Terapêutico .....</b>	<b>19</b>
2.1.2 Características do Ultra-Som Terapêutico.....	21
<b>2.2 O Tecido ósseo e o Ultra-Som Terapêutico .....</b>	<b>23</b>
<b>2.3 Marcadores do metabolismo ósseo .....</b>	<b>29</b>
2.3.1 Cálcio e fósforo .....	29
2.3.2 Marcadores de formação óssea .....	31
2.3.4 Fosfatase Alcalina e Fosfatase Alcalina Óssea.....	32
<b>2.4 Densitometria óssea .....</b>	<b>34</b>
<b>2 MATERIAL e MÉTODOS .....</b>	<b>37</b>
<b>3.1 A terapia ultra-sônica.....</b>	<b>37</b>
<b>3.2 Tratamento controle.....</b>	<b>39</b>
<b>3.3 Exames bioquímicos.....</b>	<b>40</b>
2.3.1 Proteínas Totais .....	40
2.3.2 Albumina .....	40
3.3.3 Cálcio Total e Cálcio Iônico .....	41
3.3.4 Fósforo .....	41

3.3.5 Fosfatase Alcalina e Fosfatase Alcalina Óssea.....	42
<b>3.4 Exames radiográficos e densitometria óssea.....</b>	<b>42</b>
<b>3.5 A análise estatística .....</b>	<b>47</b>
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>48</b>
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>55</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>60</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>61</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>69</b>

# 1 INTRODUÇÃO

Os cães, em sua convivência com o homem, têm sido progressivamente valorizados como animais de companhia, de trabalho ou como modelo experimental no desenvolvimento de pesquisas, devido à semelhança de determinadas patologias que ocorrem nessa espécie e no homem (RAISER, 2000).

Na rotina clínico-cirúrgica, da medicina humana e animal, são freqüentes as alterações do aparelho locomotor, e seu completo retorno às funções fisiológicas têm merecido atenção de clínicos, ortopedistas e fisioterapeutas, pois não raro necessitam de adjuvantes para acelerar seu completo retorno à funcionalidade.

Em animais, os tendões mais freqüentemente lesionados estão localizados nas porções distais dos membros e incluem os grupos flexores e extensores dos membros anteriores e, não raro, dos membros posteriores (VAUGHAN, 1979; BUTLER, 1985; KUMAR; SINGH; SHARMA, 1998).

Existem hoje, diversos métodos e práticas fisioterápicas que auxiliam e aceleram a recuperação funcional dos tecidos. Entre eles encontra-se o ultra-som terapêutico (UST), método amplamente utilizado na clínica de fisioterapia humana (MORAES, 1999; FERNANDES, 2001) e em grande ascensão no tratamento de animais acometidos por lesões do aparelho locomotor.

Passaram 70 anos desde que a interação entre ondas sonoras de alta (ultra) freqüência e tecidos vivos foram inicialmente estudados e o uso de tal energia como forma de tratamento foi inicialmente sugerido (SPEED, 2001; KODAMA, 2003). Uma quantidade considerável de trabalhos laboratoriais tem sido realizada com o objetivo de esclarecer seus efeitos sobre os tecidos (KITCHEN; PARTRIDGE, 1990; KODAMA, 2003), mas ainda procuram-se embasamentos científicos para que sua utilização seja mais profícua e técnica (KODAMA, 2003; SILVEIRA, 2003).

O ultra-som é definido como uma forma de vibração acústica com freqüências muito altas para serem percebidas pelo ouvido humano, são vibrações mecânicas da matéria produzidas por ondas longitudinais as quais comprimem e dilatam a mesma a uma velocidade determinada a partir de um gerador (BROMILEY, 1993; LONGO, 1996; YOUNG, 1998; MORAES, 1999).

O ultra-som é utilizado na área médica para inúmeras finalidades, desde cirurgias, onde as intensidades utilizadas são de 5 a 300 W/cm<sup>2</sup>, passando pelos



métodos terapêuticos, entre 0,1 e 2 W/cm<sup>2</sup>, até os meios diagnósticos, onde a intensidade dificilmente é superior a 0,05 W/cm<sup>2</sup>.

Considerado um instrumento indispensável por muitos fisioterapeutas, o UST tem sido utilizado para tratamentos de uma grande variedade de patologias em tecidos moles, como a cicatrização de úlceras (DYSON; SUCKLING, 1978) e feridas cirúrgicas (OLSSON, 2005), o aumento da circulação sangüínea em tecidos isquêmicos (HOGAN; BURKE; FRANKLIN, 1982), a regeneração muscular, o estímulo à angiogênese (DIONÍSIO, 1998), o tratamento de tumorações malignas (SPEED, 2001), a cicatrização tendinosa (HARVEY et al., 1975; ENWEMEKA, 1989 e ENWEMEKA; RODRIGUEZ; MENDOSA, 1990; JACKSON; SCHWANE; STARCHER, 1991; GAN et al., 1995; GUM et al., 1997; RAMIREZ et al., 1997; MORAES, 1999; BARROS JR, 2001; FERNANDES, 2001; SAINI et al., 2002; SILVEIRA, 2003), além da utilização em procedimentos estéticos humanos como combate a celulite e estrias, e no pós-cirúrgico imediato e tardio de cirurgias corretivas cutâneas e ritidoplastias.

Sua utilização no tecido ósseo, *in vivo* e *in vitro*, para consolidação de fraturas, pseudo-artroses e artrodeses, também tem sido extensivamente estudada, porém utilizando doses de baixa frequência associadas ao padrão pulsado (DUARTE; XAVIER, 1983; KRISTIANSEN et al., 1997; AZUMA et al. 2001; CARVALHO, 2001; GAMA, 2002; KODAMA, 2003; SOUSA, 2003).

Por suas características biofísicas, o ultra-som terapêutico sofre alterações físicas ao passar pelos tecidos tratados, das quais pode-se citar: atenuação, absorção, refração e reflexão, o que pode ocasionar a irradiação conjunta ou acidental de tecidos adjacentes ao tecido tratado, com propriedades diferentes destes. Tal situação fica bem evidenciada nos tratamentos tendíneos das extremidades distais dos membros, onde se encontra uma fraca ou nenhuma cobertura muscular ou adiposa entre o tendão a ser tratado e o tecido ósseo adjacente.

A capacidade do tecido ósseo de manter-se em constante remodelação está ligada a sua característica de converter a energia mecânica, gerada pela atividade muscular e tensão gravitacional, em potenciais elétricos, estimulando assim os osteoclastos e osteoblastos, as células responsáveis pelo metabolismo ósseo. Duarte e Xavier (1983) afirmam que o ultra-som terapêutico pode mimetizar a

energia mecânica aplicada ao tecido ósseo, interferindo nos potenciais elétricos gerados e, conseqüentemente, no seu metabolismo.

Estas alterações no metabolismo ósseo podem ser mensuradas através da utilização de marcadores bioquímicos específicos (KLEEREKOPER, 2001; SEIBEL; LANG; GEILENKEUSER, 2001). Por serem testes não invasivos, os marcadores ósseos permitem coletar dados de maneira longitudinal de um mesmo animal, reduzindo o número de animais e reduzindo os custos, o que faz destes testes excelentes para estudos e pesquisas. Adicionalmente, dados coletados repetidamente de um mesmo animal por longos períodos fortalecem as análises estatísticas, enriquecendo os dados pesquisados (ALLEN, 2003).

O uso de marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo na prática clínica tem se expandido de maneira considerável. Isto se deve ao surgimento de novos métodos e de um melhor conhecimento sobre a fisiopatologia das doenças osteometabólicas (VIEIRA, 1999). Os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo associados a exames de densidade mineral óssea, podem vir a contribuir para estudos dos efeitos do ultra-som terapêutico sobre o tecido ósseo.

Há escassez de trabalhos científicos relatando o efeito do ultra-som terapêutico sobre o tecido ósseo sadio, assim como seus possíveis efeitos colaterais quando aplicado, sobre outros tecidos, em regiões ósseas desprovidas de cobertura muscular ou adiposa. Mesmo os relatos científicos da utilização do ultra-som terapêutico para reparação de fraturas e pseudo-artroses (REUTER et al., 1984; DYSON, 1990; TSAI et al., 1991; TSAI et al., 1992a; TSAI et al., 1992b; FAGANELLO; CARVALHO, 1999; DOUAT, 2004; LEITE 2005) são conflitantes e inconsistentes. Seja devido aos resultados encontrados que vão do aceleração da consolidação da fratura até o atraso na consolidação óssea e a formação de pseudo-artroses; ou devido à ampla possibilidade de protocolos a serem realizados, com o uso de diversas dosimetrias, diferentes freqüências, ou ainda pela falta de confiabilidade dos relatos apresentados, em parte pelo pequeno número de indivíduos pesquisados ou pela omissão de detalhes do projeto impedindo assim sua fiel reprodução (KITCHEN; PARTRIDGE, 1990).

Sendo o ultra-som terapêutico, o procedimento mais utilizado em fisioterapia, e as lesões tendíneas nos membros as patologias mais tratadas com ele, é esperado que nas extremidades distais dos membros, desprovidos de cobertura muscular, o tecido ósseo receba grande parte das ondas ultra-sônicas destinadas ao

tendão.

Pelas propriedades apresentadas pelo ultra-som terapêutico é de grande importância para clínicos, ortopedistas e fisioterapeutas conhecer seus possíveis efeitos sobre o tecido ósseo sadio, pois o sobre-aquecimento na interface periósteo/osso, assim como um estímulo desigual às células responsáveis pelo remodelamento ósseo, associados muitas vezes a membros que tendem a ficar imobilizados por longos períodos de recuperação, podem levar a sérios danos e ou traumas ósseos.

## **1.1 Objetivos**

Face às considerações efetuadas, propõe-se como:

### **1.1.1 Objetivo geral**

Avaliar os efeitos do ultra-som terapêutico sobre o tecido ósseo sadio.

### **1.1.2 Objetivos específicos**

Avaliar através de exames bioquímicos e densitométrico:

- a reação do tecido ósseo sadio tratado com ultra-som terapêutico contínuo, nas intensidades de 0,5 e 1 W/cm<sup>2</sup>, 5 minutos diários, durante 20 dias;
- a densitometria mineral óssea, em tecido ósseo sadio tratado com ultra-som terapêutico contínuo, nas intensidades de 0,5 e 1 W/cm<sup>2</sup>, 5 minutos diários, durante 20 dias;

Propagar as técnicas de fisioterapia em medicina veterinária.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 O Ultra-Som Terapêutico

O ultra-som é definido como uma forma de vibração acústica com frequências muito altas para serem percebidas pelo ouvido humano. Considerando-se que o som audível está numa frequência entre 17 e 20 mil Hz, o ultra-som estando acima de 20.000 Hz não é audível ao ouvido humano. Com exceção das frequências, a física do ultra-som é igual ao som audível. As ondas sonoras são ondas mecânicas longitudinais que podem se propagar em meio sólido, líquido e gasoso, sendo assim, não se propagam no vácuo (BROMILEY, 1993; LONGO, 1996; YOUNG, 1998; MORAES, 1999).

O ultra-som terapêutico compõe-se de um gerador que produz uma corrente alternada de cerca de 0,75 a 3,0 MHz (KOTTKE; LEHMANN, 1994), a qual é convertida em vibrações mecânicas ou acústicas por um transdutor, composto por um material piezelétrico. Este é um disco ou cilindro de um material natural como o quartzo ou uma cerâmica sintética chamada PZT (chumbo, zircônio e titânio), que mantém suas características a temperaturas elevadas. Basicamente o transdutor é constituído por um material piezelétrico inserido entre dois eletrodos e, quando se aplica uma corrente alternada de alta frequência, esse material toma-se um potente gerador de ultra-som (KOTTKE; LEHMANN, 1994).

Entende-se, então, por ultra-som, vibrações mecânicas da matéria produzidas por ondas longitudinais as quais comprimem e dilatam a mesma a uma velocidade determinada a partir de um gerador. O meio deve possuir um certo grau de elasticidade para permitir que as partículas resistam à deformação, formando áreas de compressão e rarefação. Os aparelhos de ultra-sons usados para fisioterapia, que se encontram no mercado, têm frequências de 1 MHz e 3 MHz, sendo a frequência mais utilizada a de 1 MHz.

O ultra-som terapêutico, segundo pesquisas biofísicas, é o mais efetivo agente de calor profundo (KOTTKE; LEHMANN, 1994; YOUNG, 1998), e seus efeitos podem ser simplesmente divididos em efeitos térmicos, ou diatermia, efeitos atérmicos, ou mecânicos e biológicos (SPEED, 2001):

- efeitos mecânicos: em consequência das vibrações longitudinais, características do ultra-som, um gradiente de pressão é desenvolvido nas células

individuais. Como resultado desta variação de pressão negativa e positiva, elementos da célula são obrigados a se moverem, sentindo assim um efeito de micro-massagem. Este efeito aumenta o metabolismo celular, o fluxo sanguíneo e o suprimento de oxigênio (KITCHEN; PARTRIDGE, 1990), ou seja, age como um catalisador físico, acelerando as trocas celulares (MACHADO, 1991);

- efeitos térmicos: Ao lado do efeito de micro-massagem, ocorre uma elevação na temperatura resultante da conversão de energia cinética em calor pelos tecidos. A quantidade de calor local que pode ser obtido com o ultra-som depende do tipo de tecido, aqueles com alto teor de proteína, como tendões e ossos, absorvem mais energia que os de alto teor de gordura. Os principais efeitos fisiológicos terapêuticos, resultantes do aumento da temperatura pela absorção do ultra-som terapêutico são: um aumento na extensibilidade e diminuição da rigidez dos tecidos com colágeno; alívio da dor por um aumento do limiar; e aumento da defesa do organismo ocasionado pelo aumento do fluxo sanguíneo e vascularização (KITCHEN; PARTRIDGE, 1990; YOUNG, 1998);

- efeitos biológicos: ao lado dos efeitos mecânicos, térmicos e químicos, o modo de reação de órgãos isolados e também do organismo como um todo deve ser considerado, a ação biológica é determinada pela interação de diversos fatores. Entre os efeitos biológicos podemos citar: sedação/analgesia, relaxamento muscular/espasmolítico, hiperemia, fibrinólise, aumento da permeabilidade de membranas e aumento da regeneração tecidual (KITCHEN; PARTRIDGE, 1990; MACHADO, 1991; YOUNG, 1998).

O ultra-som terapêutico pode ser aplicado no modo contínuo ou pulsado. No pulsado, há períodos de repouso de energia, de modo que o efeito térmico é menos pronunciado e o efeito mecânico é superior, possibilitando a abertura de campos de tratamentos, onde não é desejável o efeito predominantemente térmico (KITCHEN; PARTRIDGE, 1990). Os aparelhos comerciais de ultra-som terapêutico são fabricados nas frequências de 1 ou 3 MHz, sendo que devido a suas características físicas acústicas, as ondas de maior frequência (3 MHz) são absorvidas mais superficialmente, de um a dois cm da superfície, enquanto as de menor frequência (1 MHz) penetram nos tecidos mais profundos, de quatro a cinco centímetros (KITCHEN; PARTRIDGE, 1990; PAULA, 1994).

O contato entre o transdutor do ultra-som terapêutico e a pele deve ser adequado para que não haja perda de onda, já que o ar é um péssimo condutor (KOTTKE; LEHMANN, 1994, PAULA, 1994). Vários métodos estão disponíveis para a aplicação do ultra-som terapêutico, entre eles o direto ou deslizamento, o subaquático, o balão, o refletor, o funil, o paravertebral reflexo e o redutor de cabeçote. Para a utilização do método direto, é necessária a utilização de um meio acoplador, podendo este ser vaselina, óleo ou gel (MACHADO, 1991; KOTTKE; LEHMANN, 1994 e PAULA, 1994). Os géis à base de água apresentam as melhores características de transmissão do ultra-som terapêutico (KOTTKE; LEHMANN, 1994; PAULA, 1994).

Em média, o tempo de aplicação do ultra-som terapêutico é de quatro a 10 minutos por área, sendo que, para grandes áreas, divide-se o segmento em três ou quatro áreas iguais, e aplica-se o mesmo tempo por área (MACHADO, 1991; KOTTKE; LEHMANN, 1994; PAULA, 1994). A aplicação pode ser de forma estacionária ou não, sendo que a primeira pode levar a uma elevação muito rápida da temperatura, ocasionando queimaduras. O aumento da intensidade não pode compensar a diminuição do tempo de tratamento, porque os efeitos produzidos pelas duas variedades são diferentes. Aumentar a intensidade pode elevar excessivamente a temperatura do tecido, e conseqüentemente, pode ser indesejável (PAULA, 1994).

## 2.1.2 Características do Ultra-Som Terapêutico

### 2.1.2.1 Atenuação

A amplitude e intensidade diminuem à medida que as ondas de ultra-som terapêutico sob sua forma de feixe passam através de qualquer meio. Esta diminuição de intensidade é causada pela difusão do som em meio heterogêneo, pela reflexão e pela refração das ondas nas interfaces do meio. As ondas ultra-sônicas com frequência alta são mais rapidamente absorvidas que as de baixa frequência (KITCHEN; PARTRIDGE, 1990; KOTTKE; LEHMANN, 1994; PAULA, 1994; LONGO, 1996). Os valores de atenuação verificados em cada tipo de tecido são mostrados na Tabela 1.

**0Tabela 1 – Profundidade média em que a intensidade do feixe é reduzida em 50% nos diferentes meios biológicos.**

<b>TECIDO</b>	<b>UST 1 MHZ</b>	<b>UST 3 MHZ</b>
<b>Ósseo</b>	2,1 mm	----
<b>Cartilagenoso</b>	6 mm	2 mm
<b>Tendíneo</b>	6,2 mm	2 mm
<b>Muscular</b>	9 mm	3 mm
<b>Pele</b>	11,1 mm	4 mm
<b>Adiposo</b>	50 mm	16,5 mm
<b>Água</b>	11.500 mm	3.833,3 mm

Adaptada de Longo, 1996.

#### 2.1.2.2 Absorção

A absorção do ultra-som terapêutico acontece a nível molecular. Esta absorção de ondas dentro do meio ocorre quando a energia vibracional é transformada em energia molecular ou em movimentos aleatórios. Proteínas são as que mais absorvem as ondas sonoras. Esta absorção resulta em aquecimento do tecido, então tecidos com alto conteúdo protéico (ossos e tendões) se aquecem muito mais que tecidos adiposos ou epiteliais (KOTTKE; LEHMANN, 1994; LONGO, 1996; Ter HAAR, 1999; MOROS et al., 2004).

A energia transportada pelo feixe ultra-sônico é atenuada conforme sua passagem através dos tecidos, esta energia é perdida devido ao espalhamento do feixe e de sua absorção. Assumindo que toda esta energia atenuada é oportunamente absorvida, a razão de quanto calor é depositado nos tecidos, é dado pelo produto do coeficiente da atenuação e da intensidade. (KITCHEN; PARTRIDGE, 1990; Ter HAAR, 1999)

#### 2.1.2.3 Reflexão

Quando o ultra-som trafega de um meio (tecido) para outro, pode ocorrer reflexão de onda de som. Reflexão em uma superfície ocorre quando a impedância acústica dos meios forem diferentes. A quantidade de energia refletida depende da diferença de impedância acústica dos meios, quanto maior a diferença das impedâncias acústicas dos tecidos, maior será a reflexão (KOTTKE; LEHMANN,

1994; LONGO, 1996).

Como mostra a Tabela 2, ocorre pouca reflexão entre as camadas de tecidos moles, ao contrário do que ocorre na superfície do osso (interface perióstee/osso), onde até 40% da onda poderá ser refletida e 60% absorvida. A energia total no perióstee será igual à incidência recebida, acrescida da onda refletida na interface perióstee/osso (mais 40%). Isto também causa ondas transversais no perióstee, as quais também ajudam a aumentar a temperatura local. Como no perióstee não existe o efeito de resfriamento proporcionado pela corrente sangüínea, esta situação levará a um superaquecimento do local e conseqüente dor ao paciente (WELLS, 1977; NCRP, 1983; KOTTKE; LEHMANN, 1994; LONGO, 1996; MOROS et al., 2004).

**Tabela 2 – Porcentagem da onda incidente refletida pelas várias interfaces teciduais**

<b>INTERFACES</b>	<b>% REFLEXÃO</b>
Água/tecido mole	0,2
Tecido mole/gordura	1
Tecido mole/osso	15 - 40
Tecido mole/ar	99,99

Adaptada de Longo, 1996.

#### 2.1.2.4 Refração

Refração é um desvio da onda de som nas várias interfaces dos tecidos. A onda de som penetrará no tecido ou interface a um ângulo (ângulo de incidência) e sai destes tecidos ou interfaces em um ângulo diferente (ângulo de refração) (KOTTKE; LEHMANN, 1994; LONGO, 1996), atingindo os tecidos adjacentes.

## 2.2 O Tecido ósseo e o Ultra-Som Terapêutico

O tecido ósseo é um dos mais resistentes e rígidos do organismo. Constituinte principal do esqueleto tem como funções proteger órgãos vitais e alojar a medula óssea, formadora de células do sangue. Também proporciona apoio aos músculos esqueléticos, transformando suas contrações em movimentos úteis e constitui um sistema de alavancas que amplia as forças geradas pela contração



muscular (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1995).

A matriz orgânica do tecido ósseo é formada principalmente por proteínas, predominantemente colágenas (95 %), já o componente inorgânico é constituído por hidroxiapatita (KAPLAN et al., 1994), mantendo a proporção de um terço de material orgânico para dois terços de material inorgânico (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1995). Os minerais, porção inorgânica, depositados no osso são responsáveis pela força suportada por estes, por sua dureza e pela rigidez, enquanto as fibras colágenas estão relacionadas com a flexibilidade do osso (KAPLAN et al., 1994).

Os dois tipos de tecidos ósseos são o trabecular, uma estrutura de aspecto esponjoso; e o cortical, mais sólido e formado por lamelas ósseas concêntricas. Eles se diferenciam estruturalmente e também quanto à distribuição espacial das células, densidade da matriz mineralizada, distribuição dos vasos sanguíneos e área ocupada pela medula óssea. Em função de sua maior superfície em relação ao volume, o osso trabecular é metabolicamente mais ativo que o cortical (VIEIRA, 1999).

O crescimento ósseo começa na vida intra-uterina e continua na adolescência até atingir a maturidade do esqueleto. Os ossos longos crescem através de dois mecanismos: em comprimento pela ossificação endocondral; e em largura pela ossificação intramembranosa. Mesmo após a maturidade do esqueleto, os ossos continuam se remodelando durante toda a vida e adaptam suas propriedades materiais às solicitações mecânicas sobre eles impostas (KAPLAN et al., 1994).

A remodelação é fundamental para a renovação do esqueleto e preservação de sua qualidade. Nele a reabsorção é seguida da formação óssea em ciclos constantes orquestrados pelas células do tecido ósseo, que incluem os osteoclastos, osteoblastos e osteócitos (SARAIVA; LAZARETTI-CASTRO, 2002).

O osso é um tecido metabolicamente ativo e, sob condições normais de remodelamento, a formação óssea e a remodelação no esqueleto adulto são formidavelmente acopladas de maneira que a formação óssea final equivale a sua reabsorção final (KAPLAN, 1995), porém alterações nessa homeostasia esquelética podem ocorrer por vários motivos (KAPLAN et al., 1994).

Este processo dinâmico do osso foi descrito primeiramente em 1892 pelo fisiologista alemão Julius Wolff. Em seu enunciado, conhecido hoje como lei de Wolff, o fisiologista descreve que o tecido ósseo sofre adaptação às diversas

solicitações externas. Em um local onde as tensões mecânicas sofridas pelo osso passem a ser mais elevadas, existirá a deposição de matéria óssea, enquanto que, em outro local, onde as tensões sejam diminuídas substancialmente, haverá uma absorção do tecido ósseo (TRABUCHO, 2006). Estima-se que no humano adulto, aproximadamente 25% do osso trabecular e 3% do osso cortical sejam renovados anualmente.

As propriedades piezelétricas foram descobertas nos cristais por Pierre Curie e seu irmão Jacques, em 1880 (DUARTE; XAVIER, 1983; BECKER, 1985), e consistem nas variações das dimensões físicas de certos materiais sujeitos a campos elétricos. Ao se colocar um material piezelétrico num campo elétrico, as cargas se interagem e produzem tensões mecânicas. Basicamente a piezeletricidade de um material é observada quando este material produz, sob carga mecânica, uma polarização elétrica, convertendo portanto a energia mecânica em energia elétrica; este é o efeito piezelétrico direto. Se inverter o processo, isto é, se aplicar um campo elétrico a um material piezelétrico, este se deformará mecanicamente, produzindo assim um efeito piezelétrico inverso (DUARTE; XAVIER, 1983)

Certos cristais, como quartzo e turmalina, são piezelétricos, mas experiências demonstrando a piezeletricidade dos ossos só foram realizadas em 1954 pelo ortopedista japonês Iwao Yasuda, que utilizou tecido ósseo *in vitro* para demonstrar sua capacidade piezelétrica. Os seus resultados foram confirmados em 1957 pelo físico japonês Eiichi Fukada (DUARTE; XAVIER, 1983; BECKER 1985). As propriedades de um perfeito transdutor de energia contidas nos ossos, e a presença de cargas elétricas são vitais tanto para seu crescimento e remodelamento, como para seu reparo em caso de fraturas. Estas cargas elétricas são geradas nos ossos por cargas mecânicas, como o próprio peso da pessoa, a deambulação, a corrida, ou até mesmo em repouso, quando a balística cardíaca produz uma onda de choque e o impulso desta atinge o osso. Para todos estes estímulos mecânicos, o osso apresenta uma resposta elétrica, que por sua vez ativa a divisão celular, mantendo o equilíbrio entre remodelagem e absorção (DUARTE; XAVIER, 1983; LIRANI; LAZARETTI-CASTRO, 2005).

Becker (1985) exemplifica que quando o osso é vergado, um potencial negativo aparece no lado da compressão. Isto é explicado pelo deslocamento de

elétrons de suas posições originais na estrutura cristalina, durante o aperto, migrando para a região onde ocorre a compressão do osso. Por outro lado, ocorre um potencial positivo (pela ausência dos elétrons que migraram) na área onde o osso está sendo esticado. Essas minúsculas cargas elétricas têm a propriedade de estimular o perióstio, cujas camadas mais internas possuem células com capacidade osteogênica.

Quando as cargas elétricas formadas no osso são positivas ocorre a deposição de matriz óssea, e a absorção óssea ocorre quando estas cargas forem negativas, sob influência direta das atividades de osteoblasto e osteoclastos, respectivamente (CHARMAN, 1990).

Para Duarte e Xavier (1983), um fato interessante a respeito do ultra-som terapêutico, é que ele se assemelha a este processo natural de crescimento e remodelação óssea, pois quando as ondas atingem o osso por uma sucessão de impulsos, cada um deles resulta em uma resposta em forma de um sinal elétrico do osso, o alterando bioeletricamente.

Almejando alcançar respostas positivas, por parte desta propriedade piezométrica do tecido ósseo, vários autores utilizaram UST para tratar lesões ósseas incidentes ou experimentais nas mais diversas espécies.

Reher et al. (1997) investigaram os efeitos do UST de 3 MHz, pulsado e contínuo com doses de 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1 e 2 W/cm<sup>2</sup> sobre culturas de células ósseas, e concluíram que o UST em baixas doses (0,1 a 0,75 W/cm<sup>2</sup>) estimula a síntese de proteínas da matriz óssea, porém altas doses (> 0,75 W/cm<sup>2</sup>) inibem esta síntese quando comparadas ao controle. Os autores atribuíram os resultados benéficos do tratamento, aos efeitos não-térmicos do UST.

Reher et al. (1999) agora estudando culturas de osteoblastos de mandíbula humana, tratadas com UST, encontraram aumento significativo de fatores angiogênicos nos osteoblastos irradiados, e concluíram que as melhores intensidades foram as de 0,1 e 0,4 W/cm<sup>2</sup> quando a frequência é a de 1 MHz.

Ryaby et al. (1989) pesquisando em culturas de células ósseas, descreveram um aumento na incorporação do cálcio por estas células quando da utilização do UST de baixa intensidade. Contudo, Naruse et al. (2003) não encontraram evidências da absorção de cálcio pelas células expostas ao UST de baixa intensidade. Porém notaram que os osteoblastos jovens responderam com um aumento transitório dos níveis de osteocalcina e fator de crescimento de insulina 1

(IGF-1), dois marcadores que evidenciam atividade de formação óssea.

Sun et al. (2001), também utilizando cultura de células ósseas para investigar o efeito do UST de 1 MHz em baixa intensidade ( $0,068 \text{ W/cm}^2$ ), encontraram significativo aumento de fosfatase alcalina e TNF $\alpha$  (Fator de necrose tumoral alfa) no sétimo dia de avaliação, observaram ainda um aumento significativo do número de osteoblastos e diminuição do número de osteoclastos, benefícios creditados ao tratamento com UST.

Tsai et al. (1992b), em um experimento *in vivo*, avaliaram a cicatrização de fraturas de tíbias de coelhos utilizando UST em doses de 0,5 e  $1 \text{ W/cm}^2$  com 1,5 MHz de frequência, e observaram aceleração da formação óssea na área de fratura quando utilizado  $0,5 \text{ W/cm}^2$ , porém encontraram supressão da reparação óssea quando a dose foi de  $1 \text{ W/cm}^2$ , não recomendando esta dose para utilização clínica por ser deletéria à reparação óssea.

Faganello e Carvalho (1999) compararam os efeitos do UST de 1 MHz contínuo, e  $0,3 \text{ W/cm}^2$  de intensidade como os efeitos do UST de 1 MHz pulsado a 20% e intensidade de  $0,3 \text{ W/cm}^2$  (SATA) sobre fraturas experimentais em ratas osteopênicas. Seus resultados demonstraram que em regime contínuo houve bloqueio da reparação óssea, já em regime pulsado houve a formação de calo ósseo proeminente nos animais tratados quando comparados com o controle.

Leite (2005) avaliando morfológica e bioquimicamente a consolidação de fraturas em fíbulas de ratos tratadas com UST pulsado de 1 MHz de frequência em intensidade de  $0,5 \text{ W/cm}^2$ , encontrou aos sete dias de avaliação uma diminuição significativa nos níveis séricos de fosfatase alcalina e cálcio nos animais tratados. No 14º dia, encontraram os níveis séricos de fosfatase alcalina aumentados nos animais não-tratados e os níveis de cálcio sérico próximos ao normal nos animais tratados. Associados aos resultados morfológicos obtidos, a autora atribui ao UST uma modulação dos níveis séricos de fosfatase alcalina e cálcio e uma aceleração no processo de consolidação óssea.

Avaliando duas repetições de pulso de UST de 1 MHz, com dose de  $0,5 \text{ W/cm}^2$  durante 3 minutos, na osteotomia experimental de tíbia de ratos, Douat (2004) encontrou um aumento significativo nos níveis de fosfatase alcalina, aliados à aceleração do processo de reparo quando comparados morfológica e radiograficamente.

Apesar dos constantes e inúmeros estudos, a ação do ultra-som terapêutico

sobre o reparo tecidual ainda é pouco compreendida, sendo seu uso muitas vezes fundamentado na experiência prática, o que resulta em procedimentos errôneos e dificulta a popularização da técnica (GRAY, 1994; YOUNG, 1998; LIRANI; LAZARETTI-CASTRO, 2005; SANTOS et al., 2005). PARTRIDGE (1987) afirma que esta situação reflete a posição geral em fisioterapia, causada pela escassez de pesquisas sobre a eficácia do ultra-som terapêutico. Santos et al. (2005), encontraram queimaduras nas regiões tratadas com UST no modo contínuo em doses consideradas altas (1 e 2 W/cm<sup>2</sup>) além de prejudicar o crescimento ósseo normal em coelhos. BROMILEY (1993) também cita a ocorrência de fraturas, destruição das superfícies articulares e necrose tecidual, após o tratamento de animais por pessoas não qualificadas. Essas complicações são atribuídas pelo autor, ao uso do ultra-som terapêutico em intensidades inadequadas, ou sobre estruturas para as quais seu uso é contra-indicado.

A presença de osso no caminho de irradiação de ultra-som sempre elevou as preocupações, tanto em diagnóstico como em aplicações terapêuticas (MOROS et al., 2004), porque podem ser induzidas elevações de temperatura significantes próximo a interface tecido mole/osso, devido ao fato do ultra-som ser altamente absorvido no tecido ósseo e de haver a reflexão de ondas irradiadas. E a conseqüente interferência destas ondas pode resultar em um aumento brusco da intensidade irradiada (WELSS, 1977; NCRP, 1983; MOROS et al., 2004). Por conseqüência, na terapia ultra-sônica térmica, a presença de osso no caminho das ondas de ultra-som é considerada a principal desvantagem e normalmente é evitada (MOROS et al., 2004).

O UST também tem sido historicamente contra-indicado no tratamento de fraturas e em casos de união retardada ou não-união óssea, embora o real motivo para esta contra-indicação não estar esclarecido (WATSON, 2007).

Há vários estudos sobre o UST no reparo ósseo, mas essencialmente estas publicações mostram um benefício consistente quando utilizadas baixas intensidades (<0,1 W/cm<sup>2</sup>) com UST pulsado (WATSON, 2007). O uso de baixas intensidades tem demonstrado um aumento não significativo de temperatura nos tecidos envolvidos, já com o uso de altas intensidades pode haver efeitos adversos no sítio de fratura, enquanto em baixas intensidades com UST pulsado pode se considerar um tratamento efetivo e seguro nestes casos (WATSON, 2007). Apesar desta afirmação, é difícil saber qual a dose de energia necessária para estimular a

osteogênese em diferentes estados biológicos como, por exemplo, no osso normal, no atraso de consolidação, ou no indivíduo osteoporótico. Há, ainda, a falta de dados de segurança e possíveis maneiras de sensibilizar a resposta biológica à estimulação mecânica e elétrica sobre as várias qualidades do osso (LIRANI; LAZARETTI-CASTRO, 2005).

### **2.3 Marcadores do metabolismo ósseo**

Os ossos encontram-se em constante processo metabólico de remodelação. Isso inclui a degradação e reabsorção ósseas, que são mediadas pelos osteoclastos, e os processos de estruturação e formação óssea mediadas pela ação dos osteoblastos. A remodelação óssea é necessária para a manutenção da saúde global e da firmeza da trama óssea. Para isso, é importante um equilíbrio entre os processos de reabsorção e formação ósseas.

Em estados alterados do metabolismo ósseo, esses processos se dissociam, ou seja, perdem o equilíbrio. Quando a reabsorção excede a formação, isso resulta numa perda de osso que pode conduzir a fraturas, osteoporose ou outras desordens do tecido ósseo. A utilização de marcadores bioquímicos específicos para esses eventos de remodelação fornece dados analíticos em relação à taxa de metabolismo, ou seja, do “turnover” ósseo (KLEEREKOPER, 2001; SEIBEL; LANG; GEILENKEUSER, 2001).

#### **2.3.1 Cálcio e fósforo**

A maior parte do cálcio do organismo adulto é armazenada no osso, ou seja, 98% do cálcio encontra-se no esqueleto principalmente sob a forma de hidroxiapatita, uma rede composta por cálcio e fósforo. Outros minerais como fósforo, sódio, potássio e magnésio também são armazenados no tecido ósseo. O cálcio é fundamental para vários processos metabólicos vitais, e a manutenção de sua homeostasia no plasma tem mais prioridade que a necessidade de cálcio no osso (KAPLAN et al., 1994; DIAGNÓSTICOS, 2006; GONZÁLES; SILVA, 2006).

O restante do cálcio, cerca de 2%, encontra-se no fluido extracelular e em outros tecidos, principalmente nos músculos esqueléticos. O íon cálcio está entre os principais componentes minerais do organismo e desempenha um papel

fundamental na mineralização óssea. A manutenção do equilíbrio dos níveis de cálcio no organismo envolve diferentes órgãos: intestino delgado, rins e esqueleto (DIAGNÓSTICOS, 2006; GONZÁLES; SILVA, 2006).

O cálcio circula sob duas formas principais, o cálcio iônico (que exerce a ação biológica), e o cálcio ligado a proteínas e complexos. O primeiro corresponde em circunstâncias normais, a 52% do total e o segundo, a 48%. É evidente com isto, que qualquer alteração do nível de proteínas séricas, em especial a albumina, leva a uma alteração do conteúdo total de cálcio no soro, sem que isto implique numa alteração da fração ionizada (ROSOL; CAPEN, 1997; VIEIRA, 2004). Desta forma, torna-se importante a determinação das proteínas totais e especificamente da albumina para uma melhor dosagem dos níveis séricos de cálcio (ROSOL; CAPEN, 1997).

O íon cálcio tem um papel fundamental em muitos processos biológicos fundamentais incluindo contração muscular, coagulação sanguínea, atividades enzimáticas, excitabilidade neuronal, liberação hormonal, e permeabilidade de membranas, além de ser um componente estrutural essencial do esqueleto. Por isso, o preciso controle de cálcio nos fluídos extracelulares é vital para a saúde de humanos e animais. Para manter constante a concentração sérica de cálcio, apesar das constantes variações de excreção e absorção, um mecanismo de controle endócrino está envolvido e consiste primariamente na interação de três hormônios principais: paratireóideo, calcitonina e vitamina D. Outros hormônios também estão relacionados a este controle sob certas condições, como os corticóides hormonais, estrógenos, tiroxinas, somatotropinas, e glucagon (CAPEN, 1985).

O nível de cálcio sérico total nos mamíferos encontra-se entre 9,0 e 11,3 mg/dL, com alguma variação devido à espécie, idade, dieta, e tipo de mensuração utilizada (CAPEN, 1985; KANEKO; HARVEY; BRUSS, 1997; GONZÁLES; SILVA, 2006). Estando os níveis séricos normais de proteínas totais e albumina entre 5,4 e 7,1, e 2,6 e 3,3 g/dL respectivamente (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 1997).

O fósforo é um dos constituintes mais abundantes do organismo, presente em diferentes tecidos. Em um adulto normal, a maior parte encontra-se no osso (99%), e o restante, nos tecidos moles e ligados a proteínas, lipídios e carboidratos. Sua homeostase depende basicamente do controle da absorção (intestino delgado), filtração e reabsorção renal e estoque de reserva que é feito no osso. Os mecanismos de regulação do cálcio afetam também os níveis de fósforo, sendo seus

valores diretamente relacionados: a elevação de um significa a diminuição do outro (DIAGNÓSTICOS, 2006; GONZÁLES; SILVA, 2006). Porém o controle dos níveis de cálcio via endócrina é mais rigoroso (GONZÁLES; SILVA, 2006)

Em cães, os níveis séricos de fósforo inorgânico encontram-se entre 2,6 e 6,2 mg/dL (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 1997).

Tanto a dosagem de cálcio quanto a de fósforo constituem-se nos elementos básicos de diagnóstico de qualquer doença ósteo-metabólica (VIEIRA, 2004).

### 2.3.2 Marcadores de formação óssea

O tecido ósseo possui algumas características muito peculiares, como sua grande extensão e distribuição, e a presença de cristais radiopacos (hidroxiapatita). Estes últimos propiciam a realização de exame do esqueleto de uma maneira muito simples, através do emprego de técnicas de absorção de raios-X, quer qualitativas (raios-X simples), quer quantitativas (densitometria óssea ou tomografia quantitativa) (VIEIRA, 1999). Porém, os fenômenos metabólicos, fisiológicos ou patológicos, que ocorrem no tecido ósseo só afetam significativamente sua estrutura radiopaca após um lapso de tempo considerável. Isto torna estas técnicas limitadas para o estudo dinâmico, e em tempo real, do metabolismo ósseo. Por isso o emprego de metodologias que possam quantificar as substâncias que representam os processos metabólicos ósseos em curso é de grande utilidade (VIEIRA, 1999; ALLEN, 2003).

Allen (2003) relata que os marcadores bioquímicos da remodelagem óssea representam um avanço metodológico, não são invasivos, possuem custo relativamente baixo, são amplamente disponíveis e têm a vantagem adicional de poderem ser usados repetitivamente para medir alterações da remodelagem óssea em períodos curtos de tempo.

Em situações fisiológicas os processos de reabsorção e formação ósseas são fenômenos acoplados e dependentes. O predomínio de um sobre o outro resulta em ganho ou perda de massa óssea. É esta capacidade de avaliação dinâmica que se deseja em um marcador de remodelação óssea (SARAIVA; LAZARETTI-CASTRO, 2002).

A reabsorção óssea é iniciada pelos osteoclastos, os quais corroem a superfície óssea. Osteoblastos secretam nova matriz óssea que preencherá o espaço absorvido (NAKAGAWA et al., 2005). Marcadores bioquímicos ósseos



refletem estes estágios do metabolismo ósseo. Marcadores de formação óssea indicam a atividade dos osteoblastos, enquanto os marcadores de reabsorção óssea indicam a atividade osteoclástica (VIEIRA, 1999; NAKAGAWA et al., 2005). Fosfatase alcalina e fosfatase alcalina óssea são freqüentemente utilizadas para monitorar a síntese óssea (NAKAGAWA et al., 2005), e a saúde óssea em cães, pois serve como marcador diagnóstico e prognóstico no tratamento de cães com disfunções músculo-esqueléticas ou metabólicas (ALLEN et al., 2000).

#### 2.3.4 Fosfatase Alcalina e Fosfatase Alcalina Óssea

A fosfatase alcalina é um recurso amplamente utilizado em ortopedia (MATOS; SANT'ANA, 2007). Embora a função da sua atividade no osso não esteja completamente conhecida, estudos têm mostrado que essa enzima é essencial na formação óssea normal e que a mensuração quantitativa da fosfatase alcalina, pode ser um bom índice de formação óssea (Van STRAALLEN et al., 1991).

Quatro variantes da fosfatase alcalina foram identificadas em animais: fosfatase alcalina óssea, fosfatase alcalina intestinal, fosfatase alcalina hepática, e em cães, fosfatase alcalina corticóide-induzida (SANECKI et al., 1968 apud ALLEN, 2003).

A fosfatase alcalina é medida através de sua atividade e corresponde à soma de todas as isoformas presentes no soro (VIEIRA, 1999; SARAIVA; LAZARETTI-CASTRO, 2002; DIAGNÓSTICOS, 2006), e seus valores de referência no soro de cães estão situados entre 20 e 156 U/L (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 1997). Mais de 90 % deste valor corresponde às isoformas hepática e óssea, em valores correspondentes (VIEIRA, 1999; SARAIVA; LAZARETTI-CASTRO, 2002; DIAGNÓSTICOS, 2006). Em pacientes sem disfunção hepática e sem patologias ósseas, a mensuração da isoforma óssea, não aparenta ser um índice mais sensível de formação óssea que a fosfatase alcalina (FARLEY; BAYLINK, 1986; Van STRAALLEN et al., 1991; WOITGE; SEIBEL; ZIEGLER, 1996; VIEIRA, 1999). Porém, na presença de patologias hepáticas, o diagnóstico preciso da atividade osteoblástica fica severamente comprometido por causa da significativa contribuição da isoforma hepática da fosfatase alcalina. Conseqüentemente, alguns estudos têm demonstrado que a mensuração da isoforma específica óssea no soro, pode prover melhores índices da formação óssea (FARLEY; BAYLINK, 1986; Van STRAALLEN et

al., 1991; VIEIRA, 1999).

A fosfatase óssea e a hepática são produtos de um mesmo gene, e diferem somente no número e localização da glicosilação pós-translacional (FARLEY et al., 1993; FARLEY; BAYLINK, 1995; VIEIRA, 1999; SANECKI et al., 1968 apud ALLEN, 2003), fazendo com que sejam isoformas ao invés de isoenzimas, ao contrário da fosfatase corticóide-induzida que é produto de gene diferente da fosfatase alcalina, fazendo dela uma verdadeira isoforma da fosfatase alcalina. (SANECKI et al., 1968 apud ALLEN, 2003).

Esta pequena diferença pós-translacional é suficiente para diferenciar qualitativamente as isoformas hepática e óssea no soro (FARLEY et al., 1993). E uma variedade de métodos têm sido descritos para diferenciá-las, baseados nas diferenças à sensibilidade termo-estável (MOSS; WHITBY, 1971, apud FARLEY; BAYLINK, 1995), diferenças à capacidade de aglutinação com germe de trigo (WGA) (BERH; BARNET, 1986, apud FARLEY; BAYLINK, 1995), e a diferenças físicas quanto a tamanho e cargas que permitem uma separação parcial por eletroforese em géis de poliacrilamida (Van HOOFF et al. 1857, apud FARLEY; BAYLINK, 1995). Estes métodos variam em custo e complexidade, porém o método baseado na inativação térmica é simples e relativamente eficiente (MATOS; SANT'ANA, 2007).

Matos e Sant'ana (2007) acreditam que a pouca literatura e a pequena utilização da fosfatase alcalina óssea como marcador ósseo, deve-se à dificuldade da dosagem laboratorial dessa enzima através dos testes ordinários de laboratório. Porém o método da termo-inativação mostrou-se eficiente, simples, rápido e de baixo custo, apresentando-se como alternativa viável de mensuração para o metabolismo ósseo.

Farley et al., (1993) e Farley (1994) analisando diferentes métodos de identificação da fosfatase alcalina óssea, concluíram que o método da termo-inativação foi o preferível e mais específico quando comparados a outros métodos de aglutinação e imunorradimétricos.

A mensuração da fosfatase alcalina óssea, possui vantagens sobre outros testes de formação óssea, pois possui uma meia-vida longa (1-2 dias) e não é grandemente afetada pela variação diurna no soro, ao contrário da osteocalcina, que possui uma meia-vida curta (menos de 1 h) e sua variação diurna pode ser maior que 30%. Além disto, a fosfatase alcalina óssea no soro já foi validada como um índice de formação óssea, exceto em condições de hipocalcemia e osteomalácia

(Van STRAALEN et al., 1991; FARLEY; BAYLINK, 1995; VIEIRA, 1999).

Kommenou et al. (2005), avaliaram o processo cicatricial de fratura diafisárias em osso longos de cães através de exames físicos, radiográficos, e determinação bioquímica da fosfatase alcalina, cálcio e fósforos séricos. Os animais foram divididos em três grupos de acordo com o tipo de cicatrização apresentada através dos exames clínicos e radiográficos em um total de 86 animais. Nos três grupos os autores encontraram o mesmo padrão de mudança da atividade de fosfatase alcalina em relação ao tempo de cicatrização. As mensurações de cálcio e fósforo tiveram o padrão inverso e proporcional às alterações da fosfatase alcalina. A partir dos resultados obtidos, os autores puderam concluir que a determinação da fosfatase alcalina sérica durante o processo cicatricial pode ser uma ferramenta adicional em fraturas com risco de desenvolver não-união.

No meio científico, a fosfatase alcalina óssea pode ser usada como um indicador sensível dos efeitos da manipulação de dietas, intervenções cirúrgicas e terapias farmacológicas no crescimento e na remodelação óssea (ALLEN et al., 2000).

Quase todos os testes bioquímicos de formação e reabsorção aplicados em estudos de função óssea incluem a análise da fosfatase alcalina óssea (FARLEY; BAYLINK, 1995).

## **2.4 Densitometria óssea**

Costa (2002) afirma que diferentes técnicas têm sido utilizadas para a determinação da densidade mineral óssea na medicina humana e veterinária. Sua utilidade tem sido descrita tanto para a padronização de valores normais, quanto para o diagnóstico de diminuição de massa óssea.

Dentre as técnicas utilizadas para a avaliação da densidade mineral óssea em medicina e veterinária, podemos destacar fotometria radiográfica (EKMAN et al., 1970 apud COSTA 2006), a absorção direta por fótons (WENTWORTH et al., 1971 apud COSTA, 2006), análise por ativação de nêutrons (AL HITI et al., 1976 apud COSTA, 2006), tomografia computadorizada (REICH et al., 1976 apud COSTA, 2006) e a densitometria óptica em imagens radiográficas (COSMMAN et al., 1991 apud COSTA, 2006; LOUZADA, 1994; LOUZADA et al., 1997; VULCANO et al., 1997; VULCANO, 2001; RAHAL et al., 2002; BRINHOLI, 2004).

A densitometria mineral óssea por imagens radiográficas é uma técnica não invasiva que pode ser utilizada na avaliação da densidade mineral óssea. Tem como vantagens o baixo custo, rapidez e simplicidade de execução (LOUZADA, 1994, COSTA, 2002; 2006).

Vulcano et al. (1997) concluíram que a técnica de densitometria óptica em imagens radiográficas mostrou-se confiável, associando uma alta precisão com sensibilidade e reprodutibilidade de resultados. Os autores ainda afirmam que esta técnica possui como pontos positivos a fácil utilização na prática clínica, e os baixos custos do procedimento em comparação com as demais técnicas utilizadas para a avaliação da densidade mineral óssea.

A técnica de densitometria óptica em imagem radiográfica, consiste em avaliação computacional através de programas (“software”), que processam as imagens radiográficas do paciente, nas quais devem estar associadas a imagem de uma escala de alumínio (“phantom”) como referencial densitométrico, fornecendo assim um valor densitométrico final (COSTA, 2006).

Segundo Brinholi (2004), com a utilização da densitometria óptica em imagens radiográficas no auxílio da rotina diagnóstica veterinária, a possibilidade de diferenciação entre as possíveis respostas do tecido ósseo relacionadas às doenças ou terapias poderão ser resolvidas com maior precisão e rapidez.

RAHAL et al. (2002) avaliaram o hiperparatireoidismo nutricional, induzidos em gatos jovens, através de exames bioquímicos de marcadores de formação óssea e da densitometria óssea em imagens radiográficas, utilizando 10 gatos para acompanhar a desmineralização óssea ocorrida nestes animais. Os autores mensuraram os níveis séricos de cálcio, fósforo e fosfatase alcalina, além da densitometria óssea a cada quinze dias por um período de 60 dias. O exame densitométrico foi realizado na zona metafisária do rádio e ulna direitos, em posição crânio-caudal, e a medida da densidade mineral óssea, em milímetros de alumínio (mmAl), foi realizada por meio de um programa computacional (software) desenvolvido para medida de densidade óptica em filmes de raios-X contendo as imagens radiográficas do rádio e ulna, região de partes moles adjacentes e escala de alumínio (“phantom”). Através dos resultados obtidos, os autores concluíram que a densitometria óssea em imagens radiográficas é um método eficiente para avaliar a desmineralização óssea na patologia estuda.

Brinholi (2004) utilizou a densitometria óssea em imagens radiográficas para

avaliar 95 membros anteriores direitos de cães com a finalidade de estudar o efeito do porte, da idade e do sexo sobre a densidade mineral óssea nestes animais. A autora conclui que a densidade mineral não foi influenciada pela idade nem pelo sexo dos animais, obtendo diferenças apenas entre os animais de portes diferentes, citando que a densitometria óssea em imagens radiográficas pode ser uma importante ferramenta na clínica e em pesquisas onde se necessite de medidas de densidade óssea.

Costa (2002; 2006), avaliando os efeitos da tirotoxicose felina sobre o tecido ósseo, os níveis séricos de cálcio, fósforo, fosfatase alcalina, fosfatase alcalina óssea e metaloproteinases de matriz, concluiu que a densitometria óssea em imagens radiográficas proporciona a determinação seqüencial da densidade óssea da extremidade distal do rádio de forma eficaz.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Dezoito cães, machos ou fêmeas, sem raça definida, clinicamente sadios, provenientes do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Cachoeiro do Itapemirim – ES, foram desverminados, submetidos a exames clínico e hematológico e adaptados, por um período de 12 dias, ao consumo de ração comercial e ao canil do Hospital Veterinário do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, Alegres, ES – (CCAUFES).

Após o período de adaptação, os animais, com idade estimada entre um e seis anos e pesando ao redor de 12 kg, passaram por uma coleta inicial de sangue venoso, através da punção da veia jugular externa, para processamento das análises bioquímicas e, a partir dessa, novas coletas foram realizadas em dias pré-determinados até se completar 21 dias de experimentação.

Os animais tiveram ambos os membros anteriores tricotomizados entre região crânio-proximal do rádio/ulna e a região dorso-distal do carpo para receberem o tratamento ultra-sônico por um período de 20 dias. A tricotomia foi repetida semanalmente.

De acordo com o protocolo utilizado, os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos (**G1**, **G2** e **G3**) de igual número e submetidos aos seguintes tratamentos:

**G1:** tratamento ultra-sônico apenas no membro torácico direito (MTD) com 0,5 W/cm<sup>2</sup>, recebendo o membro torácico esquerdo (MTE) um tratamento controle;

**G2:** tratamento ultra-sônico no membro torácico esquerdo com 1 W/cm<sup>2</sup>, recebendo o membro torácico direito um tratamento controle;

**G3:** tratamento ultra-sônico em ambos os membros anteriores, sendo o membro torácico direito tratado com 0,5 W/cm<sup>2</sup>, e o membro torácico esquerdo com 1 W/cm<sup>2</sup>;

### 3.1 A terapia ultra-sônica

A terapia ultra-sônica foi efetuada com um aparelho de ultra-som terapêutico da marca Ibramed<sup>®</sup> <sup>1</sup> modelo Sonopulse Special, microcontrolado, de 1 e 3 MHz de frequência (Figura 1), com cabeçote de 1 e 3,5 cm<sup>2</sup> de área efetiva de radiação (ERA) (Figura 2).

---

<sup>1</sup> IBRAMED, Industria Brasileira de equipamentos médicos: <http://www.ibramed.com.br/>



**Figura 1 - Ultra-som terapêutico Sonopulse Special, de 1 e 3 MHz, e transdutor, da marca Ibramed®.**



**Figura 2 – Detalhe do transdutor com duas áreas efetivas de radiação (ERA), de 1 e 3,5 cm<sup>2</sup>, e do visor de cristal líquido do ultra-som terapêutico.**

Todos os animais receberam sessões de 5 minutos diários por um período de 20 dias. O modo de aplicação foi o contínuo não estacionário, utilizando-se o gel a base de água como meio acoplador (Figura 3). A intensidade de terapia utilizada foi a de 0,5 W/cm<sup>2</sup>, no membro torácico direito, tanto para os animais do G1 quando do

G3, enquanto que o membro torácico esquerdo recebeu  $1 \text{ W/cm}^2$ , nos animais do G2 e G3. A frequência utilizada foi a de 1 MHz, com área efetiva de radiação de  $1 \text{ cm}^2$ .



**Figura 3 – Terapia ultra-sônica com 1MHz, modo contínuo, direto, não estacionário, com gel à base de água como meio acoplador, intensidade de  $0,5 \text{ W/cm}^2$  ou  $1 \text{ W/cm}^2$ .**

### **3.2 Tratamento controle**

Nos animais do G1 e G2, os membros anteriores esquerdo e direito, respectivamente, receberam um tratamento controle. O qual consistiu na utilização do transdutor do aparelho de ultra-som terapêutico, para simular os mesmos procedimentos da terapia ultra-sônica, inclusive com a utilização do gel acoplador, pelo mesmo tempo do tratamento, porém estando o aparelho de ultra-som desligado.



### 3.3 Exames bioquímicos

Foram coletados de todos os animais amostras de sangue um dia antes do começo do tratamento ultra-sônico (tempo zero - T0), e novas coletas foram realizadas após o 4º, 7º, 11º, 14º, e 20º dia de tratamento (T1, T2, T3, T4, e T5, respectivamente).

As amostras foram coletadas sempre pela manhã, após um jejum alimentar de no mínimo 8 horas, armazenadas em recipientes específicos para tais finalidades, devidamente identificados para cada animal e encaminhados imediatamente para o processamento laboratorial no Laboratório de Patologia Clínica anexo ao Hospital Veterinários do CCAUFES. Todas as amostras de sangue foram processadas em centrífuga laboratorial padrão, a 3.500 rotações por minuto durante 5 a 10 minutos para obtenção do soro.

Foram mensurados no soro:

#### 2.3.1 Proteínas Totais

Para mensuração sérica das proteínas totais utilizou-se o kit comercial colorimétrico K031, da marca Bioclin<sup>®2</sup>, baseado na metodologia de Biureto,

Os testes das amostras foram realizados seguindo a metodologia padrão do kit comercial e a absorvância das amostras foram lidas em um espectrofotômetro da marca Bioespectro<sup>®3</sup>, modelo SP-22 (Figura 4), na faixa espectral de 540 nm, sendo o aparelho zerado com um teste branco e os resultados calculados em g/dL (BIOCLIN, 2006b).

#### 2.3.2 Albumina

Para mensuração sérica da albumina utilizou-se o kit comercial colorimétrico K040, da marca Bioclin<sup>®</sup>, baseado na metodologia do verde de bromocresol. Os testes das amostras foram realizados seguindo a metodologia padrão do kit

---

<sup>2</sup> Bioclin – Quibasa, Química básica Ltda: [www.bioclin.com.br](http://www.bioclin.com.br)

<sup>3</sup> Bioespectro: <http://www.equiparlab.com.br/htmls/catalogos/bioespectro.pdf>



**Figura 4 – Espectrofotômetro da marca Bioespectro<sup>®</sup>, modelo SP-22, utilizado para a leitura das absorvâncias das amostras de soros.**

comercial e a absorvância das amostras foram lidas em um espectrofotômetro da marca Bioespectro<sup>®</sup>, modelo SP-22, na faixa espectral de 630 nm, sendo o aparelho zerado com um teste branco e os resultados calculados em g/dL (BIOCLIN, 2006a).

### 3.3.3 Cálcio Total e Cálcio Iônico

Para mensuração sérica do cálcio total e cálcio iônico utilizou-se o kit comercial colorimétrico K040, da marca Bioclin<sup>®</sup>, baseado na metodologia da cresolftaleína-complexona.

Os testes das amostras foram realizados segundo a metodologia padrão do kit comercial e a absorvância das amostras foram lidas em um espectrofotômetro da marca Bioespectro<sup>®</sup>, modelo SP-22, na faixa espectral de 578 nm, sendo o aparelho zerado com um teste branco e os resultados calculados em mg/dL (BIOCLIN, 2004).

### 3.3.4 Fósforo

Para mensuração sérica do fósforo utilizou-se o kit comercial colorimétrico K020, da marca Bioclin<sup>®</sup>, baseado na reação do Molibdato de amônio.

Os testes das amostras foram realizados segundo a metodologia padrão do kit comercial e a absorvância das amostras foram lidas em um espectrofotômetro da marca Bioespectro<sup>®</sup>, modelo SP-22, na faixa espectral de 650 nm, sendo o aparelho zerado com um teste branco e os resultados calculados em mg/dL (BIOCLIN, 2002).

### 3.3.5 Fosfatase Alcalina e Fosfatase Alcalina Óssea

Para mensuração sérica da fosfatase alcalina e de sua isoforma óssea utilizou-se o kit comercial colorimétrico K019, da marca Bioclin<sup>®</sup>, baseado na metodologia de Roy modificada, e na termo-inativação para mensuração da isoforma óssea.

Os testes das amostras foram realizados segundo a metodologia padrão do kit comercial e a absorvância das amostras foram lidas em um espectrofotômetro da marca Bioespectro<sup>®</sup>, modelo SP-22, na faixa espectral de 590 nm, sendo o aparelho zerado com um teste branco e os resultados calculados em U/L (BIOCLIN, 2005).

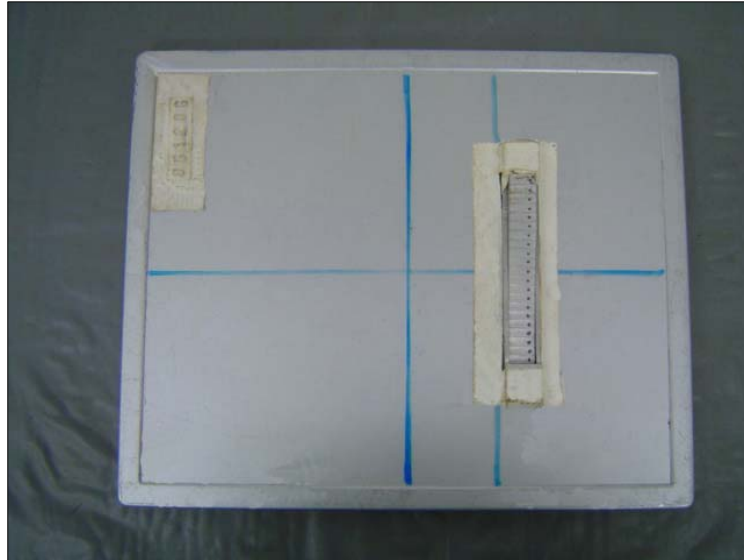
## 3.4 Exames radiográficos e densitometria óssea

A mensuração da densidade mineral óssea foi realizada pela técnica de densitometria óptica em imagem radiográfica. Para este procedimento, foi necessária a realização de radiografia em projeção cranio-caudal de cada um dos membros anteriores dos animais, abrangendo a região distal do rádio e ulna.

A primeira imagem radiográfica de cada animal foi realizada um dia antes do começo do tratamento ultra-sônico (T0) e uma segunda radiografia foi realizada após o 20º dia de tratamento (T5). As imagens foram obtidas em filmes radiográficos de 24x30 cm, da marca KODAK<sup>®4</sup>, em chassis equipados em écran de terras raras. Paralelamente e distante a 3 cm do membro radiografado, foi colocado uma escala de alumínio (“phantom”) na porção centro-lateral do chassi, que serviu como referencial densitométrico (Figura 5).

---

<sup>4</sup> Kodak Health Group: [www.kodak.com.br](http://www.kodak.com.br)



**Figura 5 - Chassis 24x30 cm, com marcações para o posicionamento padrão do membro anterior a ser radiografado e, fixado lateralmente ao centro do chassi, uma escala densitométrica de alumínio (“phantom”).**

A escala de alumínio é constituída de 20 degraus, sendo o primeiro com 0,5 mm de espessura, variando em seguida 0,5 mm a cada degrau, os quais possuem uma área de 225 mm<sup>2</sup> cada.

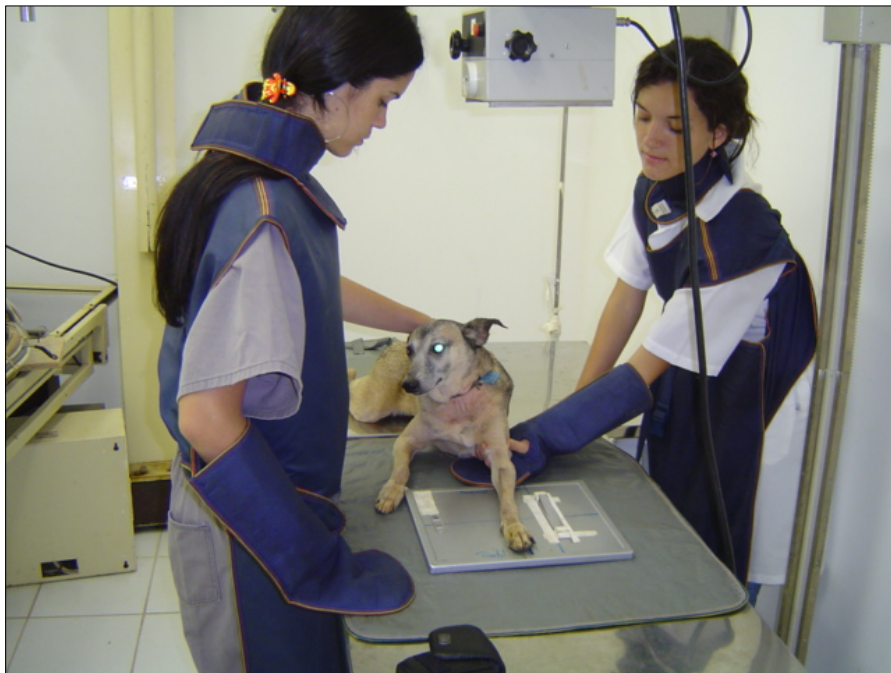
Foi utilizado um aparelho de raios-X da marca Omega<sup>®5</sup>, modelo 100/100 T (Figura 6). O aparelho foi posicionado a uma distância foco-filme de 90 cm e mantida uma quilovoltagem fixa de 65 KVp para todos os animais, enquanto que a miliamperagem por segundo foi determinada de acordo com a espessura da região avaliada em cada animal, sendo 0,02 segundos o tempo mínimo de exposição e 0,05 o máximo (Figura 7). As radiografias foram reveladas em uma processadora automática padrão.

As imagens radiográficas (Figura 8) foram então encaminhadas a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Botucatu, SP, para serem digitalizadas através de um scanner de mesa e avaliadas através do programa computacional Cromox<sup>®</sup> 3.1 Vet, obtendo-se assim o resultado

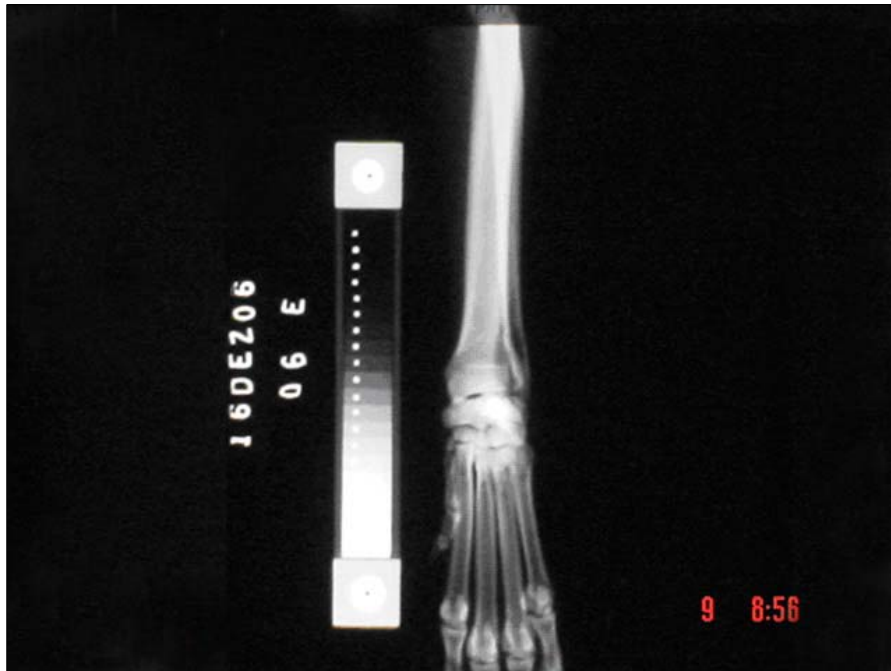
<sup>5</sup> Raicenter equipamentos radiológicos Ltda: [www.raicenter.com.br](http://www.raicenter.com.br)



**Figura 6 - Aparelho de raios-X da marca Omega<sup>®</sup>, modelo 100/100 T.**



**Figura 7 – Posicionamento para projeção crânio-caudal da região distal do rádio e ulna. Distância foco-filme de 90 cm, quilovoltagem fixa 65 KVp e tempo de exposição entre 0,02 e 0,05 segundos.**



**Figura 8 – Radiografia da extremidade distal do membro torácico esquerdo de um cão. Projeção crânio-caudal. Posicionado lateralmente ao membro encontra-se uma escala densitométrica de alumínio (“phantom”).**

densitométrico de cada animal medidos em milímetros de alumínio (mmAl).

A região radiográfica avaliada pelo programa computacional foi a da metáfise distal do rádio, 5 mm acima da cicatriz epifisária, utilizando-se da escala de alumínio e dos tecidos moles, adjacentes à área avaliada, para comparação de densidade óssea (Figuras 9 e 10). Foram realizadas três leituras consecutivas de cada região avaliada para obtenção de um valor médio densitométrico.

Além dos exames radiográficos, os animais foram pesados no dia anterior ao início do tratamento (T0) e ao final do tratamento (T1), com a finalidade de descartar variações na densidade mineral óssea ocasionadas por alterações no peso corpóreo dos animais.

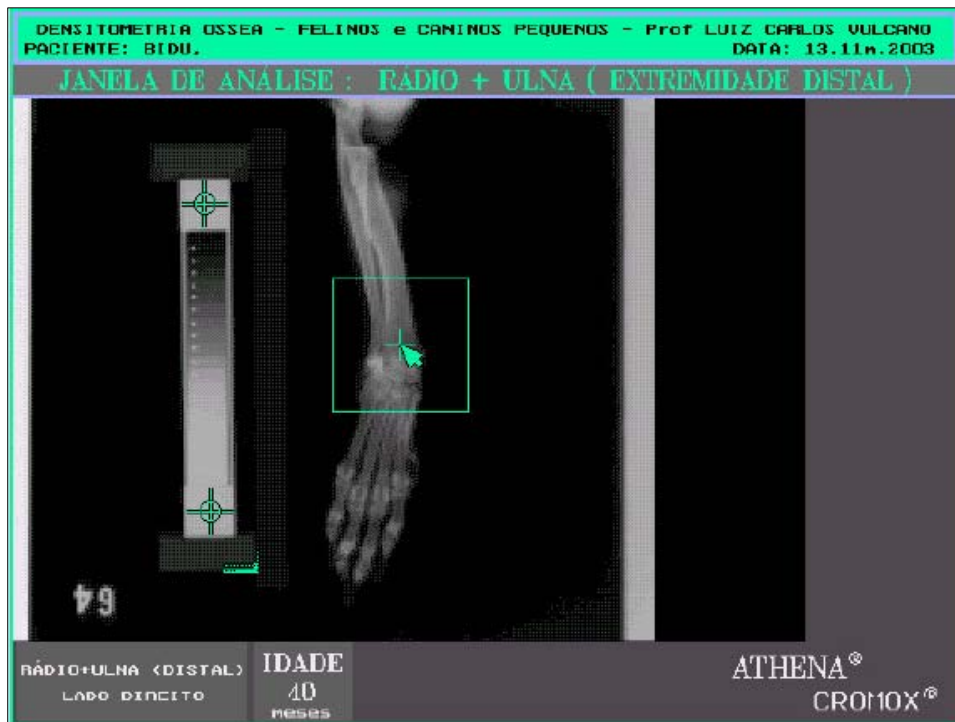


Figura 9: Tela do programa computacional Cromox 3.1 Vet<sup>®</sup> para análise da densidade mineral óssea da extremidade distal do rádio. Fonte Brinholi (2004).

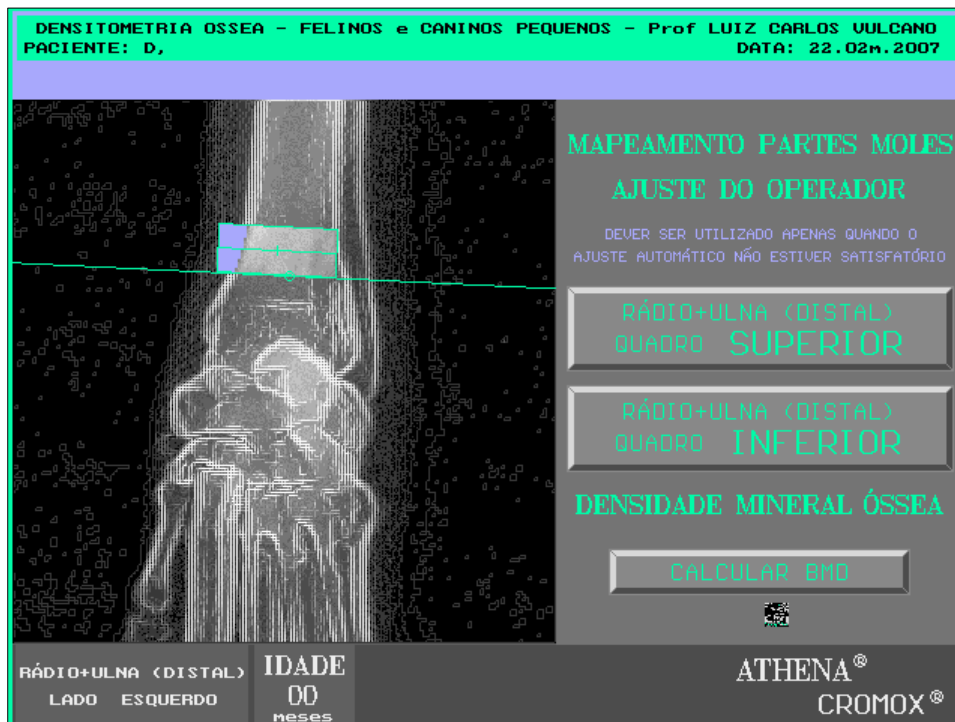


Figura 10: Tela do programa computacional Cromox 3.1 Vet<sup>®</sup> para análise da densidade mineral óssea da extremidade distal do rádio: seleção da área óssea a ser analisada (área retangular selecionada ao centro).

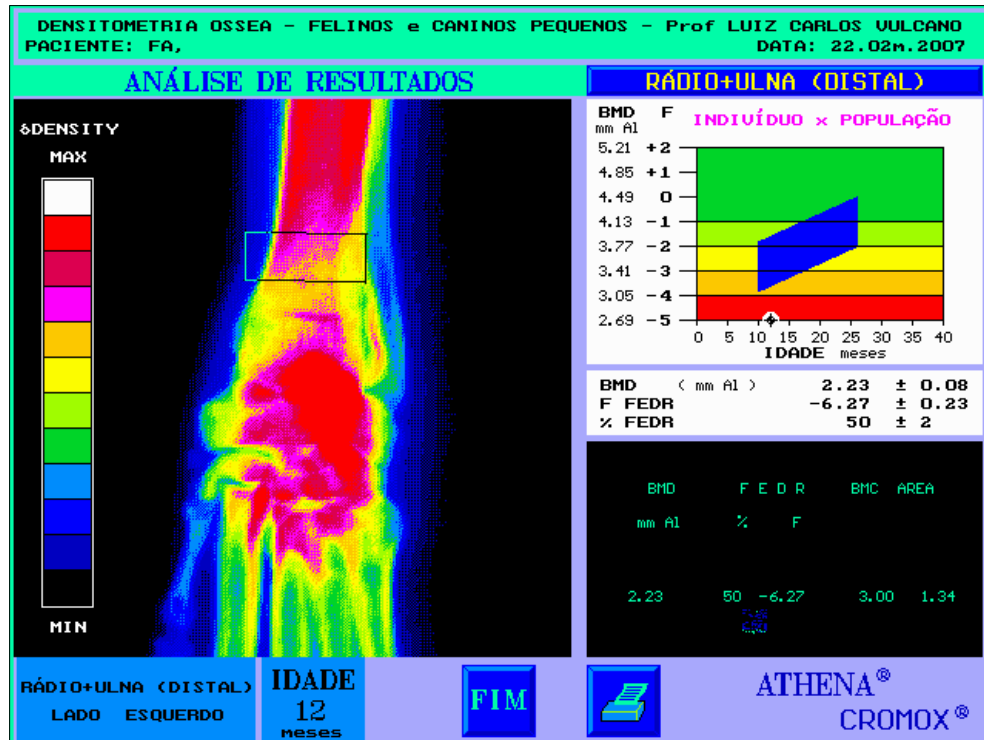


Figura 11: Tela do programa computacional Cromox 3.1 Vet<sup>®</sup> para análise da densidade mineral óssea da extremidade distal do rádio: apresentação dos resultados.

### 3.5 A análise estatística

Os dados obtidos foram tabulados e receberam tratamento estatístico por meio do programa SPSS<sup>®6</sup> (Statistical Package for Social Science), versão 14.0 para Windows. Foram utilizados o teste de "t" pareado para a comparação das médias de cada variável, nos diferentes tempos, dentro de cada grupo, e o teste "t" de Student para a comparação das médias de cada variável nos diferentes tempos, entre os grupos. Foi fixado o nível de significância de 5% para os testes estatísticos

Os animais submetidos ao experimento foram encaminhados a programas de adoção.

<sup>6</sup> SPSS Inc: [www.spss.com/](http://www.spss.com/)



## 4 RESULTADOS

As análises estatísticas das médias obtidas nos exames bioquímicos e densitométrico, nos diferentes tempos de coletas, estão discriminados nos Apêndices.

Os níveis séricos médios de proteínas totais e albumina foram 5,6 ( $\pm$  2,1) g/dL e 2,1 ( $\pm$  0,5) g/dL respectivamente. As variações médias de proteínas totais só apresentaram diferenças estatísticas em T4 ( $p=0,024$ ), T3 ( $p=0,029$ ) e T1 ( $p= 0,003$ ), respectivamente nos grupos G1, G2 e G3. As médias séricas de albumina apresentaram variações significativas no G2 de T1 a T5 ( $p= 0,001$ ), no G3 apenas em T5 ( $p=0,022$ ), e não variaram estatisticamente no G1. (Apêndices 4 a 6).

As médias dos exames séricos de cálcio total, cálcio iônico, fósforo, fosfatase alcalina e fosfatase alcalina óssea foram: 9,6 ( $\pm$ 2) mg/dL; 6,2 ( $\pm$ 1,3) mg/dL; 4,4 ( $\pm$ 1,1) mg/dL; 47,6 ( $\pm$ 31) U/L e 22,9 ( $\pm$ 14,9) U/L.

Nas tabelas 3 a 5 são apresentadas as médias dos níveis séricos de cálcio total, cálcio iônico, fósforo, fosfatase alcalina e fosfatase alcalina nos diferentes tempos de coletas nos três grupos estudados, assim como suas análises estatísticas através do teste “t” pareado dentro de cada grupo.

As figuras 12 a 13 mostram as oscilações das médias de cálcio total, cálcio iônico, fósforo, fosfatase alcalina e fosfatase alcalina óssea durante os momentos avaliados em G1, G2 e G3.

**Tabela 3 – Valores médios obtidos nos exames bioquímicos do Grupo 1. Comparativo entre o início do tratamento (T0) e os demais tempos de coletas (T1 a T5).**

	Cálcio Total (mg/dL)			Cálcio Iônico (mg/dL)			Fósforo (mg/dL)			Fosfatase Alcalina (U/L)			Fosfatase Alcalina Óssea (U/L)		
	Média	$\pm$ DP	p	Média	$\pm$ DP	p	Média	$\pm$ DP	p	Média	$\pm$ DP	p	Média	$\pm$ DP	p
T0	9,8	1,9	-	6,7	1,4	-	4,6	0,8	-	46,7	22,3	-	24,0	16,4	-
T1	9,1	1,9	0,606	5,9	1,2	0,376	3,8	1,1	<b>0,048*</b>	33,2	15,6	<b>0,043*</b>	16,4	9,1	0,088
T2	12,0	2,6	0,168	7,7	1,9	0,359	4,4	0,7	0,633	37,2	18,9	0,142	18,6	12,9	0,110
T3	10,7	2,1	0,161	6,6	1,2	0,792	3,8	1,6	0,108	53,1	30,4	0,335	24,9	16,9	0,717
T4	9,6	1,8	0,858	6,2	1,5	0,315	4,6	1,0	0,940	48,3	30,5	0,835	23,6	18,1	0,879
T5	9,1	0,9	0,521	5,6	0,8	0,130	5,1	1,7	0,417	50,3	43,5	0,858	19,8	11,1	0,279

\* diferença significativa ( $p<0,05$ )

**Tabela 4 – Valores médios obtidos nos exames bioquímicos do Grupo 2. Comparativo entre o início do tratamento (T0) e os demais tempos de coletas (T1 a T5).**

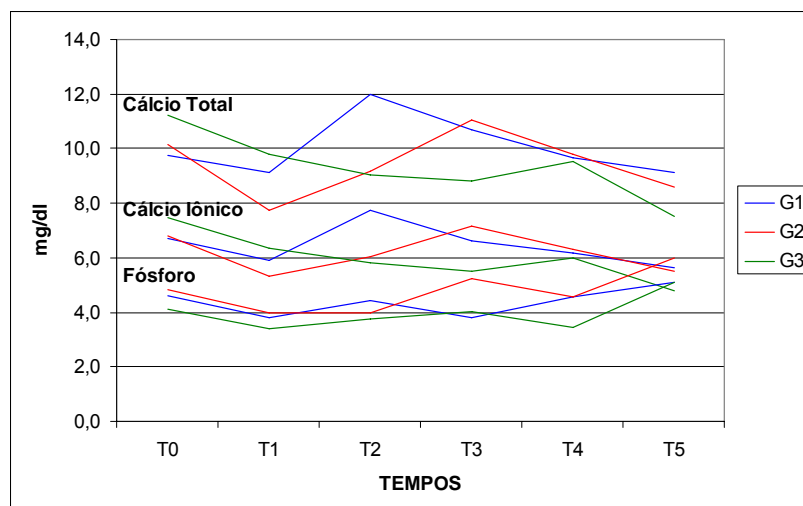
	Cálcio Total (mg/dL)			Cálcio Iônico (mg/dL)			Fósforo (mg/dL)			Fosfatase Alcalina (U/L)			Fosfatase Alcalina Óssea (U/L)		
	Média	±DP	p	Média	±DP	p	Média	±DP	p	Média	±DP	p	Média	±DP	p
T0	10,2	2,5	-	6,8	1,6	-	4,8	1,1	-	72,0	47,3	-	32,1	20,9	-
T1	7,7	1,7	0,127	5,3	1,4	0,184	4,0	0,9	<b>0,002*</b>	28,1	16,3	0,053	12,2	7,9	<b>0,045*</b>
T2	9,2	1,1	0,283	6,0	0,4	0,262	4,0	1,1	<b>0,007*</b>	49,1	32,7	0,071	22,3	14,8	0,081
T3	11,0	3,4	0,649	7,2	2,1	0,740	5,2	1,0	0,250	53,7	38,0	0,094	26,0	18,1	0,145
T4	9,8	1,0	0,781	6,3	0,5	0,569	4,6	1,1	0,247	55,9	36,7	0,169	27,9	17,9	0,229
T5	8,6	1,3	0,279	5,5	1,0	0,214	6,0	1,5	<b>0,042*</b>	38,7	30,8	<b>0,028*</b>	21,0	17,9	<b>0,042*</b>

\* diferença significativa ( $p < 0,05$ )

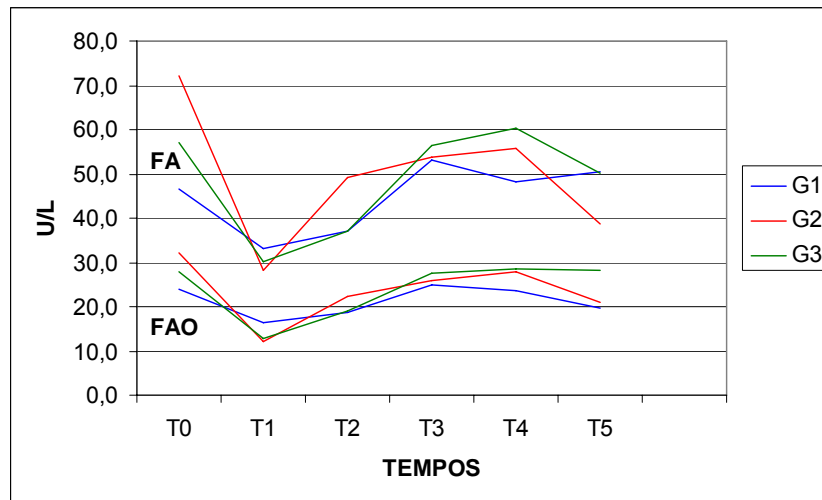
**Tabela 5 – Valores médios obtidos nos exames bioquímicos do Grupo 3. Comparativo entre o início do tratamento (T0) e os demais tempos de coletas (T1 a T5).**

	Cálcio Total (mg/dL)			Cálcio Iônico (mg/dL)			Fósforo (mg/dL)			Fosfatase Alcalina (U/L)			Fosfatase Alcalina Óssea (U/L)		
	Média	±DP	p	Média	±DP	p	Média	±DP	p	Média	±DP	p	Média	±DP	p
T0	11,2	2,2	-	7,5	1,3	-	4,1	0,9	-	56,9	27,3	-	27,9	14,6	-
T1	9,8	0,2	0,210	6,4	0,4	0,144	3,4	0,7	0,078	30,3	11,5	<b>0,015*</b>	12,7	5,3	<b>0,013*</b>
T2	9,0	1,2	0,059	5,8	0,8	<b>0,036*</b>	3,8	0,3	0,345	36,9	14,3	<b>0,024*</b>	19,0	8,4	<b>0,025*</b>
T3	8,8	0,8	0,051	5,5	0,6	<b>0,027*</b>	4,0	0,5	0,797	56,5	44,0	0,970	27,5	19,0	0,952
T4	9,5	1,4	0,220	6,0	0,7	0,107	3,4	0,5	0,155	60,5	47,5	0,783	28,5	19,2	0,889
T5	7,5	1,2	<b>0,005*</b>	4,8	0,7	0,090	5,1	0,5	<b>0,048*</b>	50,1	19,2	0,500	28,0	11,2	0,969

\* diferença significativa ( $p < 0,05$ )



**Figura 12 – Oscilações das médias de cálcio total, cálcio iônico e fósforo nos grupos G1, G2 e G3, entre o momento inicial (T0) e o final do tratamento (T5).**



**Figura 13 – Oscilações das médias de fosfatase alcalina (FA) e fosfatase alcalina óssea (FAO) nos grupos G1, G2 e G3, entre o momento inicial (T0) e o final do tratamento (T5).**

Na tabela 6 são apresentadas as médias obtidas na densitometria óptica em imagem radiográfica e respectivas análises estatísticas entre T0 e T5, dentro dos grupos experimentais, e, assim como a média do peso corpóreo dos animais, não apresentou diferenças estatísticas (Apêndice 7).

**Tabela 6 – Valores médios obtidos na densitometria óptica em imagem radiográfica (mmAl) dos Grupo 1, 2 e 3. Comparativo entre o momento inicial do tratamento (T0) e o momento final do tratamento (T5).**

		MAD			MAE		
		Média	±DP	p	Média	±DP	p
<b>G1</b>	T0	2,3	0,3	-	2,3	0,3	-
	T5	2,3	0,2	0,890	2,3	0,2	0,483
<b>G2</b>	T0	2,2	0,3	-	2,1	0,2	-
	T5	2,2	0,2	0,410	2,2	0,2	0,403
<b>G3</b>	T0	2,1	0,3	-	2,1	0,3	-
	T5	2,1	0,3	0,286	2,1	0,3	0,683

O teste “t” de Student, quando aplicado para a análise estatística entre os grupos, revelou diferença significativa ( $p= 0,033$ ) entre as médias de cálcio total de G1 e G2 no 7º dia de experimento (Tabela 7). Não houve nenhuma outra diferença estatística, em qualquer outro momento, quando estes dois grupos foram avaliados.

**Tabela 7 – Valores médios obtidos nos exames bioquímicos. Comparativo entre o grupo 1 (G1) e o grupo 2 (G2) no 7º dia de tratamento (T2).**

	Grupo 1		Grupo 2		p
	Média	± DP	Média	± DP	
Proteínas totais (g/dL)	5,89	1,84	5,20	0,70	0,408
Albumina (g/dL)	2,15	0,24	1,98	0,56	0,524
Cálcio total (mg/dL)	12,00	2,56	9,19	1,07	<b>0,033*</b>
Cálcio iônico (mg/dL)	7,72	1,92	6,02	0,36	0,059
Fósforo (mg/dL)	4,41	0,70	3,99	1,09	0,442
Fosfatase Alcalina (U/L)	37,18	18,85	49,06	32,75	0,459
Fosfatase Alcalina óssea (U/L)	18,55	12,87	22,29	14,79	0,650

\* diferença significativa ( $p<0,05$ )

Quando o mesmo teste foi aplicado entre G1 e G3, foram encontradas diferenças estatísticas tanto nas médias de cálcio total, em T2 e T5, e cálcio iônico em T2, quanto nas médias de fósforo, em T4 (Tabelas 8 a 10).

**Tabela 8 – Valores médios obtidos nos exames bioquímicos. Comparativo entre o grupo 1 (G1) e o grupo 3 (G3) no 11º dia de tratamento (T3).**

	Grupo A		Grupo C		p
	Média	± DP	Média	± DP	
Proteínas totais (g/dL)	5,89	1,84	5,49	0,71	0,634
Albumina (g/dL)	2,15	0,24	2,15	0,32	0,985
Cálcio total (mg/dL)	12,00	2,56	9,05	1,21	<b>0,029*</b>
Cálcio iônico (mg/dL)	7,72	1,92	5,80	0,81	<b>0,048*</b>
Fósforo (mg/dL)	4,41	0,70	3,78	0,30	0,068
Fosfatase Alcalina (U/L)	37,18	18,85	36,88	14,30	0,976
Fosfatase Alcalina óssea (U/L)	18,55	12,87	19,00	8,44	0,944

\* diferença significativa ( $p<0,05$ )

**Tabela 9 – Valores médios obtidos nos exames bioquímicos. Comparativo entre o grupo 1 (G1) e o grupo 3 (G3) no 14º dia de tratamento (T4).**

	Grupo 1		Grupo 3		p
	Média	± DP	Média	± DP	
Proteínas totais (g/dL)	5,88	1,25	5,40	0,82	0,448
Albumina (g/dL)	2,18	0,29	2,31	0,37	0,511
Cálcio total (mg/dL)	9,64	1,79	9,55	1,41	0,921
Cálcio iônico (mg/dL)	6,16	1,49	6,00	0,71	0,817
Fósforo (mg/dL)	4,57	0,99	3,45	0,46	<b>0,030*</b>
Fosfatase Alcalina (U/L)	48,31	30,53	60,49	47,53	0,609
Fosfatase Alcalina óssea (U/L)	23,58	18,06	28,53	19,17	0,655

\* diferença significativa ( $p < 0,05$ )

**Tabela 10 – Valores médios obtidos nos exames bioquímicos. Comparativo entre o grupo 1 (G1) e o grupo 3 (G3) no 20º dia de tratamento (T5).**

	Grupo 1		Grupo 3		p
	Média	± DP	Média	± DP	
Proteínas totais (g/dL)	5,70	1,42	5,30	1,08	0,592
Albumina (g/dL)	2,28	0,44	2,15	0,40	0,614
Cálcio total (mg/dL)	9,10	0,94	7,47	1,21	<b>0,026*</b>
Cálcio iônico (mg/dL)	5,65	0,79	4,77	0,71	0,072
Fósforo (mg/dL)	5,10	1,74	5,11	0,50	0,995
Fosfatase Alcalina (U/L)	50,33	43,46	50,14	19,15	0,993
Fosfatase Alcalina óssea (U/L)	19,77	11,14	28,04	11,21	0,229

\* diferença significativa ( $p < 0,05$ )

As análises do teste “t” de Student aplicadas sobre as médias de G2 e G3 mostraram diferenças estatísticas no cálcio total, em T1, e no fósforo durante T3 e T4 (tabelas 11 a 13).

**Tabela 11 – Valores médios obtidos nos exames bioquímicos. Comparativo entre o grupo 2 (G2) e o grupo 3 (G3) no 4º dia de tratamento (T1).**

	Grupo 2		Grupo 3		p
	Média	± DP	Média	± DP	
Proteínas totais (g/dL)	4,27	0,96	4,57	0,97	0,6018
Albumina (g/dL)	1,89	0,55	2,25	0,34	0,2119
Cálcio total (mg/dL)	7,73	1,66	9,80	0,21	<b>0,0129*</b>
Cálcio iônico (mg/dL)	5,31	1,44	6,35	0,40	0,1181
Fósforo (mg/dL)	4,03	0,92	3,39	0,66	0,1980
Fosfatase Alcalina (U/L)	28,12	16,28	30,33	11,54	0,7914
Fosfatase Alcalina óssea (U/L)	12,18	7,85	12,70	5,28	0,8963

\* diferença significativa ( $p < 0,05$ )

**Tabela 12 – Valores médios obtidos nos exames bioquímicos. Comparativo entre o grupo 2 (G2) e o grupo 3 (G3) no 11º dia de tratamento (T3).**

	Grupo 2		Grupo 3		p
	Média	± DP	Média	± DP	
Proteínas totais (g/dL)	6,26	0,54	5,94	0,77	0,427
Albumina (g/dL)	1,91	0,73	2,24	0,40	0,353
Cálcio total (mg/dL)	11,04	3,45	8,82	0,79	0,156
Cálcio iônico (mg/dL)	7,17	2,13	5,54	0,59	0,102
Fósforo (mg/dL)	5,21	0,98	4,03	0,48	<b>0,025*</b>
Fosfatase Alcalina (U/L)	53,74	38,01	56,46	43,99	0,911
Fosfatase Alcalina óssea (U/L)	26,02	18,08	27,52	19,01	0,891

\* diferença significativa ( $p < 0,05$ )

**Tabela 13 – Valores médios obtidos nos exames bioquímicos. Comparativo entre o grupo 2 (G2) e o grupo 3 (G3) no 14º dia de tratamento (T4).**

	Grupo 2		Grupo 3		p
	Média	± DP	Média	± DP	
Proteínas totais (g/dL)	5,76	0,35	5,40	0,82	0,339
Albumina (g/dL)	2,09	0,44	2,31	0,37	0,387
Cálcio total (mg/dL)	9,81	1,00	9,55	1,41	0,715
Cálcio iônico (mg/dL)	6,29	0,51	6,00	0,71	0,438
Fósforo (mg/dL)	4,57	1,13	3,45	0,46	<b>0,048</b>
Fosfatase Alcalina (U/L)	55,90	36,65	60,49	47,53	0,855
Fosfatase Alcalina óssea (U/L)	27,95	17,86	28,53	19,17	0,957

\* diferença significativa ( $p < 0,05$ )

As médias obtidas nos exames de densitometria óptica em imagem radiográfica, não apresentaram diferenças significativas quando comparadas entre os grupos estudados em T0 e T5, nem quando a interação entre os dois momentos foi testada (Tabela 14)

**Tabela 14 – Valores médios obtidos nos exames de densitometria óssea (mmAL). Comparativo entre os grupos 1, 2 e 2 (G1, G2 e G3), no momento inicial (T0), no momento final (T5) e entre o momento inicial e o momento final (T0-T5).**

		Membro anterior direito			Membro anterior esquerdo		
		Média	±DP	p	Média	±DP	p
<b>G1 - G2</b>	T0	2,3	0,3	0,705	2,3	0,3	0,379
	T5	2,3	0,2	0,327	2,3	0,2	0,349
	T0-T5	-	-	0,337	-	-	0,173
<b>G1 - G3</b>	T0	2,2	0,3	0,206	2,1	0,2	0,412
	T5	2,2	0,2	0,263	2,2	0,2	0,360
	T0-T5	-	-	0,071	-	-	0,189
<b>G2 - G3</b>	T0	2,1	0,3	0,392	2,1	0,3	0,924
	T5	2,1	0,3	0,727	2,1	0,3	0,860
	T0-T5	-	-	0,356	-	-	0,837

## 5 DISCUSSÃO

A utilização do ultra-som terapêutico na reabilitação de humanos e animais vem sendo estudada a várias décadas em diferentes tipos de tecidos orgânicos, *in vivo* ou *in vitro*, por inúmeros autores (DUARTE; XAVIER, 1983; BECKER, 1985; RYABY et al., 1987; CHARMAN, 1990; KITCHEN; PARTRIDGE, 1990; MACHADO, 1991; TSAI et al., 1992; BROMILEY, 1993, KOTTKE; LEHMANN, 1994; PAULA, 1994; LONGO, 1996; REHER et al., 1997, FAGANELLO; CARVALHO, 1999; REHER et al., 1999; YUONG; 1998; MORAES, 1999; Ter HAAR, 1999; FERNANDES, 2001; SPEDD,2001; SUN et al., 2001; NARUSE et al, 2003; SILVEIRA, 2003; DOUAT, 2004; MOROS et al., 2004; LEITE, 2005; LIRANI; LAZARETTI-CASTRO, 2005; SANTOS et al., 2005; WATSON, 2007), porém ainda há uma busca por explicações técnicas e fisiológicas de sua capacidade de alterar o metabolismo orgânico.

Quando os estudos do efeito do UST são voltados para o tecido ósseo, a procura é direcionada para seus efeitos no reparo e cicatrização de lesões ósseas (REUTER et al., 1984; DYSON, 1990; TSAI et al., 1991; TSAI et al., 1992; TSAI et al., 1992b; FAGANELLO; CARVALHO, 1999; DOUAT, 2004; LEITE 2005). Enquanto que a presença do tecido ósseo sadio no caminho da irradiação de tecidos moles ainda é motivo de preocupações (WELLS, 1977; NCRP, 1983; MOROS et al., 2004), por conta de suas características de atenuação, absorção, reflexão e refração (WELLS, 1977; NCRP, 1983; KITCHEN; PARTRIDGE, 1990; KOTTKE; LEHMANN, 1994; PAULA, 1994; LONGO, 1996; Ter HAAR, 1999; MOROS et al., 2004;) que são acentuadas nas interfaces do tecido ósseo produzindo efeitos adversos (WELLS, 1977; NCRP, 1983; MOROS et al., 2004).

Os animais utilizados como modelo experimental, demonstraram ser ideais neste estudo, tanto pelas semelhanças de determinadas patologias apresentadas em cães e em humanos (RAISER, 2000), como pelas semelhanças anatômicas e fisiológicas da região e tecidos estudados, permitindo assim a transposição dos resultados obtidos com a medicina humana. Também a capacidade de adaptação à rotina adotada e docilidade dos animais facilitou a aplicação da terapia e coleta das amostras.

A frequência, a intensidade e o modo de aplicação do UST utilizados no



estudo são os mais freqüentes quando do tratamento de lesões tendíneas (RAMIREZ et al., 1997; ENWEMEKA; RODRIGUEZ; MENDOSA, 1990; SAINI et al, 2002; SILVEIRA 2003), as quais ocorrem principalmente nas extremidades distais dos membros (VAUGHAN, 1979; BUTLER, 1985; KUMAR; SINGH; SHARMA, 1998), desprovidas de cobertura muscular ou adiposa.

Ao contrário de Ryaby et al. (1989), Reher et al. (1997), Reher et al. (1999) e Sun et al. (2001), que estudaram culturas celulares, o presente estudo trabalhou com animais vivos, sem a realização de biópsias teciduais ou histomorfometrias, apenas utilizando testes bioquímicos séricos para mensuração de marcadores de formação óssea, e testes densitométricos para avaliação da densidade mineral óssea.

Todos os testes realizados mostraram ser de fácil realização, não foram invasivos e permitiram várias coletas de cada animal, sem interferir com a fisiologia do mesmo, nem com os resultados obtidos. Foram de rápido processamento e quando comparados com outros testes de mesma função, mostraram ter um custo final reduzido. O que ratifica as afirmações de Allen (2003), Louzada, 1994, Vulcano et al. (1997) e Costa (2002 e 2006).

Confirmando os resultados de Matos e Sant'ana (2007), o método da terminativação para mensuração da fosfatase alcalina óssea mostrou-se simples e relativamente eficiente como índice de formação óssea (Van STRAALEN et al., 1991; FARLEY; BAYLINK, 1995; VIEIRA, 1999)

As médias obtidas nos exames sorológicos de proteínas totais ( $5,6 \pm 2,1$  g/dL), cálcio total ( $9,6 \pm 2$  mg/dL), fósforo ( $4,4 \pm 1,1$  mg/dL) e fosfatase alcalina ( $47,6 \pm 31$  U/L) mantiveram-se dentro dos parâmetros referenciais estabelecidos por Capen (1985), Kaneko; Harvey; Bruss, (1997) e Gonzáles; Silva (2006), assim como as médias de fosfatase alcalina óssea ( $22,9 \pm 14,9$  U/L) (VIEIRA, 1999; SARAIVA; LAZARETTI-CASTRO, 2002; DIAGNÓSTICOS, 2006). A média obtida no exame de albumina ( $2,1 \pm 0,5$  g/dL) ficou abaixo dos índices de referências, mesmo as médias individuais sendo crescentes durante o experimento. Uma possível explicação para isto é a origem destes animais (Centro de Controle de Zoonoses) e uma ração comercial com baixos índices protéicos.

A média de cálcio iônico ( $6,2 \pm 1,3$  mg/dL) ficou acima do índice de 52% ( $\pm 65\%$ ) do nível de cálcio total estabelecidos como valores de referência (CAPEN, 1985; ROSOL; CAPEN, 1997; VIEIRA, 2004).

As diferenças estatísticas encontradas nas avaliações dos níveis médios de proteínas totais e albumina, que ocorreram principalmente nas médias de albumina do G3 (Apêndices 4 a 6) não interferiram nos níveis de cálcio total, já que este não variou estatisticamente senão no momento final (T5) do G3. Sendo que a média de cálcio diminuiu enquanto houve um aumento nos níveis de albumina (Tabela 5, Apêndice 6).

As oscilações nas médias séricas de cálcio total, cálcio iônico, fósforo, fosfatase alcalina e fosfatase alcalina óssea (Figuras 12 e 13) seguiram um padrão semelhante até o 4º dia de tratamento (T1) onde todos os níveis séricos apresentaram queda, sendo significativas para fosfatase alcalina no G1, para a fosfatase alcalina óssea no G2, e para ambas no G3. No G3 tanto a fosfatase alcalina quanto a fosfatase alcalina óssea voltaram a oscilar estatisticamente no 7º dia de tratamento (T2). O fósforo também diferiu significativamente no T1 para os grupos 1 e 2 (Tabelas 3 a 5).

Estas oscilações foram diferentes das encontradas por Komneou et al. (2005). Estes autores, estudando o processo cicatricial de fraturas em ossos longos, encontraram um padrão proporcional e inverso das oscilações de fosfatase alcalina quanto às variações de cálcio e fósforo, o que fisiologicamente encontra mais suporte técnico, já que um aumento da atividade dos osteoblastos, verificados pelo aumento da fosfatase alcalina, resulta em uma maior mineralização óssea com conseqüente diminuição dos níveis séricos destes minerais (VIEIRA, 1999; KLEEREKOPER, 2001; SEIBEL; LANG; GEILENKEUSER, 2001; NAKAGAWA et al., 2005).

Sun et al. (2003) avaliando tecidos ósseos em culturas celulares tratados com UST de baixa intensidade, e Douat (2004), que avaliou o UST pulsado em osteotomias de ratos, encontraram aos sete dias de tratamento um aumento dos níveis de fosfatase alcalina, contrariando os resultados achados no presente estudo.

Contudo, Leite (2005) avaliando a consolidação de fraturas em fíbulas de ratos tratados com UST pulsado, encontrou resultados bioquímicos semelhantes aos mostrados no presente estudo. Aos sete dias de avaliação, a autora encontrou uma diminuição significativa dos níveis de fosfatase alcalina e cálcio sérico, o que atribuiu ao UST pulsado como um efeito de modulação dos níveis sanguíneos destas substâncias. Ainda em sua avaliação, a autora encontrou aos 14 dias um aumento abrupto dos níveis de fosfatase alcalina mas níveis séricos normais de cálcio total

nos animais tratados. No presente trabalho, aos 14 dias de avaliação, apenas a oscilação de cálcio iônico no G3 foi significativa, ainda apresentando uma diminuição de valores em comparação com T0, diferindo dos resultados da autora.

Porém, quando as interações entre os diferentes grupos experimentais são analisadas estatisticamente, aplicando o teste “t” de Student, as diferenças nas médias de fosfatase alcalina e fosfatase alcalina óssea não mais são encontradas, porém aparecem diferenças significativas entre o cálcio total, cálcio iônico e fósforo entre G1 e G3, e cálcio total e fósforo entre G2 e G3, mostrando que o tratamento ultra-sônico em G3, produziu alterações metabólicas mais acentuadas, possivelmente pela maior área irradiada – a irradiação foi feita nos dois membros anteriores.

A densitometria óptica em imagem radiográfica mostrou-se fundamental para a avaliação da estrutura mineral óssea (LOUZADA, 1994; LOUZADA et al., 1997; VULCANO et al., 1997; VULCANO, 2001; RAHAL et al., 2002; BRINHOLI, 2004, COSTA, 2002 e 2006). Mesmo não refletindo a dinâmica imediata que ocorre no metabolismo ósseo, como sugerem Vieira (1999) e Allen (2003), suas análises dentro de cada grupo (“t” pareado) e entre os grupos (“t” de Student), não apresentaram variações estatísticas (Tabelas 6 e 14), mostrando que para o período avaliado de 20 dias de tratamento de UST contínuo de 1 MHz, durante 5 minutos não houve alterações na densidade óssea, não importando a dose aplicada (0,5 ou 1 W/cm<sup>2</sup>). Como após o 20º dia de aplicação, não há mais irradiação, ou seja, não há mais estímulos sobre o tecido ósseo, pode-se supor que não haverá modificações teciduais posteriores causadas pelo UST.

Os resultados obtidos na densitometria mineral óssea estudada, não coincidem com os achados de Tsai et al. (1992); Reher et al. (1997), Reher et al. (1999) e Faganello e Carvalho (1999). Apesar dos autores estudarem culturas celulares ou cicatrização óssea, os mesmos afirmam que o UST contínuo em doses maiores que 0,5 w/cm<sup>2</sup> é deletério ao tecido ósseo. Situação não encontrada com nenhuma das doses utilizadas na presente pesquisa.

Com os resultados obtidos neste estudo, é possível afirmar que o UST de 1MHz, contínuo, em intensidades de 0,5 e 1 W/cm<sup>2</sup> por 5 minutos diários, durante 20 dias, interfere com o metabolismo dos minerais ósseos e atividade dos osteoblastos, com reflexo nos níveis séricos de fosfatase alcalina óssea principalmente na primeira semana de tratamento, mas nos parâmetros utilizados na pesquisa, estas

alterações de metabolismo não são suficientes para causar alterações ou danos sensíveis à densidade óssea.

Aliado a estes resultados, o fato de que durante o experimento nenhum animal mostrou desconforto, sinais de queimaduras, ou reação de dor aos tratamentos efetuados, como os relatados por Bromiley (1993), Paula (1994) e Santos et al. (2005), permite afirmar que o modo, a frequência e as intensidades ultra-sônicas aplicadas neste estudo são seguras ao tecido ósseo, quando utilizadas para tratamento de lesões em tecidos moles em áreas com eminências ósseas ou desprovidas de cobertura muscular. Junto a essa afirmação, sugere-se que estudos semelhantes ao desenvolvido, adicionados de exames para marcadores de reabsorção óssea e excreção urinária de cálcio, sejam aplicados com o intuito de elucidar melhor as alterações metabólicas ocorridas no tecido ósseo.

## 6 CONCLUSÃO

Na vigência dos resultados obtidos e para os parâmetros utilizados no presente experimento, é pertinente concluir que:

- o metabolismo dos osteoblastos e dos minerais ósseos é afetado pelo ultra-som, especialmente na primeira semana de aplicação;

- a densidade mineral óssea não é afetada pelas ondas ultra-sonoras, não importando a dose utilizada, 0,5 ou 1 W/cm<sup>2</sup>;

- a utilização do ultra-som terapêutico em regiões ósseas desprovidas de cobertura pode ser utilizada com segurança;

- novos estudos utilizando marcadores bioquímicos de reabsorção óssea devem ser conduzidos para melhor elucidar as alterações metabólicas no tecido ósseo, geradas pelas ondas ultra-sônicas.

## REFERÊNCIAS

ALLEN, L.C. et al. A comparison of two techniques for the determination of serum bone-specific alkaline phosphatase activity in dogs. **Res Vet Sci**. Oxford, v. 68, n. 3, p. 231-235, 2000.

ALLEN, M.J. Biomechanical markers of bone metabolism in animals: uses and limitations. **Vet Clin Pathol**. Santa Barbara, v. 32, n. 3, p. 101-113, 2003.

AZUMA, Y. et al.. Low-intensity pulsed ultrasound accelerates rat femoral fracture healing by acting on the various cellular reactions in the fracture callus. *J Bone Miner Res, USA*. v. 16, n. 4, p.671-80. 2001.

BARROS JR, E.A. **Os efeitos do ultra-som na cicatrização de tendões flexores de coelhos após tenorrafia**. 2001. 57f. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2001.

BECKER, R.O. **The body electric**. New York: Quill, 1985, 365 p.

BIOCLIN. Albumina. Belo Horizonte: Quibasa química básica, 2006a. Bula de teste bioquímico.

\_\_\_\_\_. Cálcio. Belo Horizonte: Quibasa química básica, 2004. Bula de teste bioquímico.

\_\_\_\_\_. Fosfatase Alcalina. Belo Horizonte: Quibasa química básica, 2005. Bula de teste bioquímico.

\_\_\_\_\_. Fósforo. Belo Horizonte: Quibasa química básica, 2002. Bula de teste bioquímico.

\_\_\_\_\_. Proteínas Totais. Belo Horizonte: Quibasa química básica, 2006b. Bula de teste bioquímico.

BRINHOLI, R.B. **Utilização da densitometria óptica em imagem radiográfica no estudo do efeito do porte, idade e sexo sobre a densidade mineral óssea (DMO) da extremidade distal do rádio-ulna de cães**. 2004 49 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2004.

BROMILEY, M. W. **Equine injure, therapy and rehabilitation**. 2nd ed. Oxford: Blackwel, 1993. p. 87-95.

BUTLER, H.C. Tendon, muscle, and fascia. In: ARCHIBALD, J. (Ed.). **Canine surgery**. 2nd ed., Santa Barbara: American Veterinary Publications, 1974. Cap. 23. p. 933-947.

BUTLER, H.C. Surgery of tendinous injuries and muscle injuries. In: NEWTON, C.D.; NUNAMAKER, D.M. (Eds.). **Textbook of small animal orthopedics**. Philadelphia: Lippincott, 1985. Cap 68. p. 835-842.

CAPEN, C.C. Calcium-regulating hormones and metabolic bone disease. In: NEWTON, C.D.; NUNAMAKER, D.M. (eds). **Textbook of small animal orthopaedics**. Philadelphia : Lippincott, 1985. 2v. Cap. 59. 1221p. Disponível em: <[http://www.ivis.org/special\\_books/ortho/chapter\\_59/59mast.asp](http://www.ivis.org/special_books/ortho/chapter_59/59mast.asp)> Acesso: 22 nov 2006.

CARVALHO, D.C.L. **A ação do ultra-som terapêutico de baixa intensidade em ossos de ratas osteopênicas**. 2001. 93f. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2001.

CHARMAN, R.A. Strian generated potential in bone and connective tissue. **Physiotherapy**, London, v. 76, n. 11, p. 725-730. 1990.

COSTA, F.S. **Tirotoxicose experimental em gatos**: efeitos sobre o tecido ósseo, isoenzimas da fosfatase alcalina e metaloproteinases de matriz -2 e - 9. 2006, 132 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2006.

\_\_\_\_\_. **Tirotoxicose experimental em gatos**: efeitos sobre o tecido ósseo, níveis séricos de fosfatase alcalina e metabolismo de cálcio e fósforo. 2002, 97 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2002.

DIAGNÓSTICOS DA AMÉRICA, 2006. Disponível em: <[http://www.diagnosticosdaamerica.com.br/exames/fofatase\\_alcalina\\_ossea.shtml](http://www.diagnosticosdaamerica.com.br/exames/fofatase_alcalina_ossea.shtml)> Acessado em: 12 dez. 2006.

DIONÍSIO, V.C. **O efeito do ultra-som na vascularização pós-lesão muscular experimental em coelhos**. 1998. 51f. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1998.

DOUAT, E.S.V. **Estudo comparativo do efeito do ultra-som terapêutico de 1MHz com frequência de repetição de pulso a 100 Hz e 16 Hz no reparo de osteotomia por escareação em tibia de rato**. 2004, 73f. Dissertação (Mestrado em bioengenharia) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.

DUARTE, L.R. The stimulation of bone growth by ultrasound. **Arch Orthop Trauma Surg**. Berlin, v. 101, n. 3, p. 153-9, and 1983.

DUARTE, L.R.; XAVIER, C.A.M. Estimulação ultra-sônica do calo ósseo. **Revista Brasileira de Ortopedia**. v. 18, n. 3, p. 73-80, maio-jun., 1983.

DYSON, M. Role of ultrasound in wound healing. In: KLOTH, L. C., McCULLOCH, J. M., FEEDAR, J. A. (eds) **Wound healing: alternatives in management**. Philadelphia: PA Davis, 1990. p. 259-285.

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

ENWEMEKA, C.S.; RODRIGUEZ, O.; MENDOSA, S. The biomechanical effects of low intensity ultrasound of healing tendons. **Ultrasound Med Biol**. Oxford, v. 16, n. 8, p. 801-807, 1990.

ENWEMEKA, C.S. The effects of therapeutic ultrasound on the tendon healing: a biomechanical study. **Am J Phys Med Rehabil**. Baltimore, v. 68, n. 6, p. 283-287, 1989.

FAGANELLO, F.R.; CARVALHO, D.C.L. **Ação do ultra-som terapêutico sobre fraturas de ratas osteopênicas**. 1999. 69f. Monografia (Graduação em fisioterapia) – Universidade Federal de São Carlos, 1999.

FARLEY, J.R. Quantification of skeletal alkaline phosphatase in osteoporotic serum by wheat gem agglutinin precipitation, heat inactivation, and a two-side immunoradiometric assay. **Clin Chem**, Baltimore, v. 40, n. 9, p. 1749-1756, 1994.

FARLEY JR, BAYLINK DJ. Skeletal alkaline phosphatase activity as a bone formation index in vitro. **Metabolism**. Philadelphia, v. 35, n.6, p. 563-571, 1986.

FARLEY, J.R.; BAYLINK, D.J. Skeletal alkaline phosphatase activity in serum. **Clin Chem**, Baltimore, v. 41, n. 11, p. 1551-1553, 1995.

FARLEY, J.R.; et al.. Reference standards for quantification of skeletal alkaline phosphatase activity in serum by heat inactivation and lectin precipitation. **Clin Chem**, Baltimore, v. 39, n. 9, p. 1878-1884, 1993.

FERNANDES, M.A.L. **Avaliação dos efeitos do ultra-som terapêutico sobre lesões experimentais do tendão flexor digital superficial em eqüinos: estudo clínico, ultra-sonográfico e histopatológico**. 2001. 67f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001.

GAMA, L.O.R. **Artrodese atlanto-axial em cães tratada por ultra-som de baixa intensidade**. 2002. 78f. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2002.

GAN, B.S. et al.. The effects of ultrasound treatment on flexor tendon healing in the chicken limb. **J Hand Surg [Br]**. Edinburgh, v. 20, n. 6, p. 809-814, 1995.

GONZÁLEZ, F.H.D; SILVA, S.C. **Introdução à bioquímica clínica**. 2 ed. Porto Alegre: UFRGS, 2006. 358 p.

GRAY, P. **Lameness**. London: J.A. Allen, 1994. p. 220-226.

GUM, S.L. et al.. Combined ultrasound, electrical stimulation, and moderate changes in tendon biomechanics. **Am J Phys Med**. Columbus, v. 76, n. 4, p. 288-296, 1997.



HARVEY, W. et al.. The stimulation of protein synthesis in human fibroblasts by therapeutic ultrasound. **Rheumatology and Rehabilitation**. London, v. 14, p. 237, 1975.

HOGAN, R.D.; BURKE, K.M.; FRANKLIN, T.D. The effect of ultrasound on micro vascular hemodynamics in skeletal muscle during ischemia. **Microvascular Research**. Amsterdam, v. 23, p. 370-379, 1982.

JACKSON, B.A.; SCHWANE, J.A.; STARCHER, B.C. Effect of ultrasound therapy on repair of Achilles tendon injuries in rats. **Med Sci Sports Exerc**. Madison, v. 23, n. 2, p. 171-176, 1991.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Tecido ósseo. In:\_\_\_\_**Histologia Básica**. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995, cap. 3, p.108-36.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. (Eds). **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 5 ed. Califórnia: Academic Press, 1997, p.619-702.

KAPLAN, F.S. **Prevention and management of osteoporosis**. Clin Symp, Summit, v. 47, n. 1, p. 2-32, 1995

KAPLAN, F. S. et al. Form and function of bone. In: SIMON, S. R., WILSON, J. (Ed) **Orthopaedic basic science**. Rosemont: American Academy of orthopaedic surgeons. 1994, cap. 4, p.127-184.

KITCHEN, S. S.; PARTRIDGE, C. J. Therapeutic ultrasound: a revision. **Physiotherapy**. London, v. 76, n.10, p. 593-600, 1990.

KLEEREKOPER, M. Biochemical markers of bone turnover: why theory, research, and clinical practice are still in conflict. **Clin Chem**. Baltimore, v.47, n.8, p.1347-1349, 2001.

KODAMA, A.C. **Efeitos do ultra-som pulsado de baixa intensidade em um modelo ósseo de ratas ovariectomizadas analisadas por meio do ensaio de flexo-compressão**. 2003, 77f. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003.

KOMNENOU, A.; et al.. Correlation of serum alkaline phosphatase activity with the healing process of long bone fractures in dogs. **Vet Clin Pathol**. Santa Barbara, v. 34, n. 1, p. 35-38, 2005.

KOTTKE, F.J.; LEHMANN, J.F. **Tratado de Medicina Física e Reabilitação de Krusen**. 4. ed. São Paulo: Manole, 1994, 1303 p.

KRISTIANSEN, T.K. et al.. Accelerated healing of distal radial fractures with the use of specific low-intensity ultrasound. A multicenter, prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled study. **J. Bone Joint Surg. Am.**, USA. v. 79, n. 7, p. 961-79. 1997.

KUMAR, N.; SINGH, G.R.; SHARMA, A.K. Tendon Surgery in animals: a review. **Indian J Vet Surg**, India, v. 19, n. 2, p. 75-83, 1998.

LEITE, V.L. **Estudo comparativo do ultra-som terapêutico de 1 MHz com frequência de repetição de pulso a 100 Hz e 16 Hz no tratamento de fratura de fíbula de rato**. 2005, 76f. Dissertação (Mestrado em bioengenharia) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

LIRANI, A.P.R; LAZARETTI-CASTRO, M. Evidências da ação de agentes físicos sobre o metabolismo do tecido ósseo e seus potenciais usos clínicos. **Arq Bras Endocrinol Metab**. São Paulo, v. 49, n. 6, p. 891-6, 2005.

LONGO, G. J. **Ultra-som**. São Paulo: KLD, 1996, 52 p.

LOUZADA, M. J. K. Q. **Otimização da técnica de densitometria óptica em imagens radiográficas em peças ósseas – estudo “in vitro”**. 1994. 191f. Tese (Doutorado em Engenharia Elétrica) – Universidade Federal de Campinas, Campinas, 1994.

LOUZADA, M. J. K. Q. et al. Densidade de peças ósseas de frango. Estudo pela densitometria óptica radiográfica. **Vet Zootec**, São Paulo, v.9, p.95-109, 1997.

MACHADO, C. M. **Ultra-som**. In: Eletroterapia prática. 2 ed. São Paulo: Pancast. 1991. 143 p.

MATOS, M.A.M.; SANT’ANA, F.R. Identificação da isoenzima óssea de fosfatase alcalina por termo-inativação: relevância clínica e ensaio laboratorial. **Rev Bras Ortop**. Rio de Janeiro. Disponível em:  
<<http://www.rbo.org.br/materia.asp?mt=1073&ididioma=1>> . Acesso: 07/01/2007.

MORAES, J. P. **Os efeitos do ultra-som terapêutico sobre a cicatrização de tendões flexores digitais profundos em cães**. 1999. 34f. Monografia (Especialização em Fisioterapia Músculo-Esquelética) - Universidade de Cruz Alta, Cruz Alta, 1999.

MOROS, E.G. et al.. Thermal contribution of compact bone to intervening tissue-like media exposed to planar ultrasound. **Phys Med Biol**, London, v. 49, n. 6, p. 869-886 , 2004

NAKAGAWA, H.; et al.. Changes in total alkaline phosphatase level after hip fracture: comparison between femoral neck and trochanter fractures. **J Orthop Sci**. Tokyo, v. 11, n. 2, p. 135-139, 2005.

NARUSE, K. et al. Distinct anabolic response of osteoblast to low-intensity pulsed ultrasound. **J Bone Miner Res**. New York, v. 18 p. 360-369, 2003.

NCRP Reports. **Biological effects of ultrasound**: Mechanisms and clinical implications. Bethesda: National Council on Radiation Protection and Measurements, 1983. n. 74.

OLSSON, D.C. **Efeitos da estimulação ultra-sônica pulsada e contínua no processo cicatricial de ratos submetidos à celiotomia.** 2005. 109f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2005.

PAULA, J. L.; Ultra-som terapêutico: considerações gerais. **Fisioterapia em Movimento.** Curitiba, v. 7, n. 1, abr./set., p. 9-16. 1994.

PARTRIDGE, C.J. Evaluation of ultrasound therapy devices. **Physiotherapy.** London, v. 73(4), p. 166-168, 1987.

RAHAL, S.C.; et al.. Densitometria óptica radiográfica na avaliação do hiperparatireoidismo secundário nutricional induzido em gatos jovens. **Ciência Rural,** Santa Maria, v. 32, n. 3. p. 421-425, 2002.

RAISER, A. G. **Homoimplante ortotópico de tendão calcâneo comum, conservado em glicerina a 98%, e tratado com radiação laser Arseneto de Gálio, sob dois métodos de imobilização, em cães.** 2000. 88f. Tese (Doutorado em cirurgia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2000.

RAMIREZ, A. et al. The effect of ultrasound on collagen synthesis and fibroblasts proliferation in vitro. **Med Sci Sports Exerc.** Hagerstown, v. 29, n. 3, p. 326-332, 1997.

REHER, P. et al.. Effect of ultrasound on the production of IL-8, basic FGF and VEGF. **Cytokine.** San Diego, v. 11, n. 6, p. 416-423, 1999.

REHER, P.; et al.. The stimulation of bone formation *in vitro* by therapeutic ultrasound. **Ultrasound Med Biol,** Oxford, v. 23, n. 8, p. 1251-8, 1997.

REUTER, U. et al. Modification of bone fracture healing by ultrasound in an animal experiment model. **Z Exp Chir Transplant Kunstliche Organe.** Berlim, v.17 p.290-7,1984.

ROSOL, T. J.; CAPEN, C. C. Calcium - Regulating hormones na diseases of abnormal mineral (Calcium, Phosphorus, Magnesium) metabolism. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. (Eds). **Clinical Biochemistry of Domestic Animals.** 5 ed. Califórnia: Academic Press, 1997, p.619-702.

RYABY, J.T.; et al.. Low intensity pulsed ultrasound increases calcium incorporation in both differentiating cartilage and bone cell cultures. **Trans Orthop Res Soc.** Boston, v. 14, p. 115, 1989.

SAINI, N.S. et al. A preliminary study on the effect of ultrasound therapy on the healing of surgically severed Achilles tendon in five dogs. **J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.** Berlim, n. 49, p. 321-328, 2002.

SANTOS, C.A.; et al.. Influência do ultra-som terapêutico na epífise de crescimento ósseo de coelhos. **Fisioterapia e Pesquisa.** São Paulo v. 12, n. 2, p. 13-21, 2005.

SARAIVA, G.L; LAZARETTI-CASTRO, M. Marcadores bioquímicos da remodelação óssea na prática. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, São Paulo, v. 46, n. 1, 2002.

SEIBEL, M. J.; LANG, M.; GEILENKEUSER, W. J. Interlaboratory variation of biochemical markers of bone turnover, **Clin Chem**. Baltimore v.47, 2001.

SILVEIRA, D.S. **O ultra-som terapêutico no processo cicatricial de tendões flexores digitais superficiais de cães**. 2003, 60f. Dissertação. (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade de Santa Maria, Santa Maria, 2003.

SOUSA, V.L. **Efeitos do ultra-som de baixa intensidade sobre a consolidação óssea em fraturas de ossos longos (rádio e ulna, fêmur, tíbia e fíbula) em cães (*Canis familiaris*)**. 2003, 127f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

SPEED, C.A. Therapeutic ultrasound in soft tissue lesions. **Rheumatology**. Oxford, n. 40, p. 1331-1336, 2001.

SUN, J.S.; et al.. In vitro effects of low-intensity ultrasound stimulation on the bone cells, **J Biomed Mater Res**. Hoboken, v. 57, n. 3 p. 449-56, 2001.

Ter HAAR, G. Therapeutic ultrasound. **Eur J Ultrasound**, Shannon, v. 9, n. 1, p. 3-9, 1999.

TRABUCHO, L. A estrutura óssea do fêmur. **Teias matemáticas: comunicações**. Disponível em: <<http://www.mat.uc.pt/2000/teias/trabucho.html>> Acesso: 03 nov. 2006.

TSAI, C. L. et al. Ultrasound can affect bone healing both locally and systemically. **Chin J Physiol**. Taipei, v.34 p.213-22, 1991.

TSAI, C.L. et al. Ultrasonic effect on fracture repair and prostaglandin E2 production. **Chin J Physiol**. Taipei, v.35 p.168, 1992a.

TSAI, C.L.; CHANG, W.H.; LIU, T.K. Preliminary studies of duration and intensity of ultrasonic treatments on fracture repair. **Chin J Physiol**, Taipei, v. 35, n. 1, p. 21-26, 1992b.

Van STRAALLEN, J.P; et al.. Bone alkaline phosphatase as indicator of bone formation. **Clin Chim Acta**. Amsterdam, v. 201, n. 1-2, p. 27-33, 1991.

VAUGHAN, L.C. Muscle and tendon injuries in dogs. **J Small Anim Pract**. Oxford, v. 20, n. 12, p. 711-36, 1979

VIEIRA, J.G.H. Considerações sobre os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo e sua utilidade prática. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, São Paulo, v. 43, n. 6, 1999. Disponível em:

[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-27301999000600005&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-27301999000600005&lng=en&nrm=iso)> Acesso em: 07 Jan 2007.

VULCANO, L. C. **Determinação e padronização dos valores normais da densidade mineral óssea (DMO) do carpo acessório de eqüinos em crescimento da raça Puro Sangue Inglês (PSI) por meio da densitometria óptica radiográfica.** 2001. 52p. Tese (Livre Docência) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2001.

VULCANO, L. C. et al. Valores normais da densidade óssea do carpo ulnar em potros em crescimento da raça Quarto de Milha através da densitometria óptica radiográfica. **A Hora Veterinária.** Porto Alegre, v. 17, n. 100, p.52-54, 1997.

WATSON, T. Effect of Therapeutic Ultrasound in Fracture Healing. **Electrotherapy on the web**, Hatfield. Jan 2007. Disponível em:  
<http://www.electrotherapy.org/electro/ultrasound/ultrasound%20fracture.htm>>  
Acessado: 07 jan 2007.

WELLS, P. N. T. Velocity, absorption and attenuation in biological materials, In:\_\_\_\_\_. **Biomedical Ultrasonics**, London: Academic Press, Cap. 4, p. 110-137, 1977.

WOITGE, H.W.; SEIBEL, M.J.; ZIEGLER, R. Comparison of total and bone-specific alkaline phosphatase with nonskeletal disorders or metabolic bone diseases. **Clin Chem**, Baltimore, v. 42, n. 11 p. 1796-1804, 1996.

YOUNG. S. Terapia por ultra-som. In: Kitchen, S.; Bazin, S. **Eletroterapia.** 10 ed. São Paulo: Manole, 1998. Cap. 15, p. 235-257.

## **APÊNDICES**

**Apêndice A – Valores médios obtidos nos exames de proteínas totais e albumina do Grupo 1. Comparativo entre o início do tratamento (T0) e os demais tempos de coletas (T1 a T5).**

	Proteínas Totais (g/dL)			Albumina (g/dL)		
	Média	±DP	p	Média	±DP	p
T0	5,5	1,0	-	1,6	0,4	-
T1	5,9	1,3	0,350	2,0	0,6	0,295
T2	5,9	1,8	0,356	2,1	0,2	0,080
T3	6,2	1,8	0,225	2,3	0,4	0,080
T4	<b>5,9</b>	1,3	0,024*	2,2	0,3	0,064
T5	5,7	1,4	0,443	2,3	0,4	0,092

\* diferença significativa (p<0,05)

**Apêndice B – Valores médios obtidos nos exames de proteínas totais e albumina do Grupo 2. Comparativo entre o início do tratamento (T0) e os demais tempos de coletas (T1 a T5).**

	Proteínas Totais (g/dL)			Albumina (g/dL)		
	Média	±DP	p	Média	±DP	p
T0	5,1	0,9	-	1,9	0,4	-
T1	4,3	1,0	0,146	1,9	0,5	0,888
T2	5,2	0,7	0,795	2,0	0,6	0,306
T3	<b>6,3</b>	0,5	0,029*	1,9	0,7	0,901
T4	5,8	0,3	0,130	2,1	0,4	0,094
T5	6,0	0,6	0,087	<b>2,1</b>	0,4	0,022*

\* diferença significativa (p<0,05)

**Apêndice C – Valores médios obtidos nos exames de proteínas totais e albumina do Grupo 3. Comparativo entre o início do tratamento (T0) e os demais tempos de coletas (T1 a T5).**

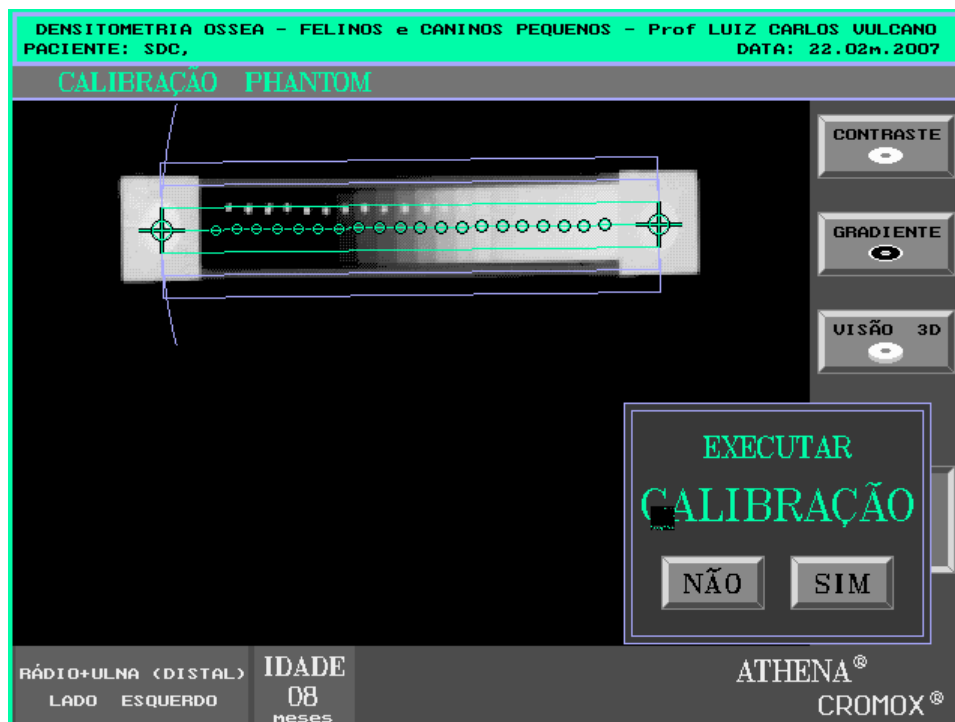
	Proteínas Totais (g/dL)			Albumina (g/dL)		
	Média	±DP	p	Média	±DP	p
T0	6,0	0,8	-	1,7	0,5	-
T1	<b>4,6</b>	1,0	0,003*	<b>2,2</b>	0,3	0,001*
T2	5,5	0,7	0,125	<b>2,1</b>	0,3	0,016*
T3	5,9	0,8	0,790	<b>2,2</b>	0,4	0,004*
T4	5,4	0,8	0,141	<b>2,3</b>	0,4	0,002*
T5	5,3	1,1	0,138	<b>2,2</b>	0,4	0,001*

\* diferença significativa (p<0,05)

**Apêndice D – Valores médios do peso corpóreo dos animais (Kg) dos Grupo 1, 2 e 3. Comparativo entre o momento inicial do tratamento (T0) e o momento final do tratamento (T5).**

		Média	±DP	p
<b>G1</b>	TO	12,7	5,6	-
	T5	12,5	5,0	0,627
<b>G2</b>	TO	12,9	3,6	-
	T5	12,9	3,6	0,981
<b>G3</b>	TO	12,5	4,0	-
	T5	12,2	2,5	0,713

**Apêndice E: Tela do programa computacional Cromox 3.1 Vet<sup>®</sup> para análise da densidade mineral óssea da extremidade distal do rádio: calibração da escala de alumínio (“phantom”).**





**Apêndice F – Valores médios obtidos nos exames bioquímicos. Comparativo entre o grupo 1 (G1) e o grupo 2 (G2) no momento anterior ao início do tratamento (T0).**

	Grupo 1		Grupo 2		p
	Média	± DP	Média	± DP	
Proteínas totais	5,51	1,01	5,05	0,95	0,434
Albumina	1,58	0,45	1,87	0,35	0,232
Cálcio total	9,75	1,92	10,17	2,52	0,757
Cálcio iônico	6,70	1,40	6,79	1,63	0,925
Fósforo	4,61	0,80	4,81	1,07	0,715
Fosfatase Alcalina	46,65	22,30	72,04	47,32	0,262
Fosfatase Alcalina óssea	24,02	16,43	32,12	20,86	0,472

**Apêndice G – Valores médios obtidos nos exames bioquímicos. Comparativo entre o grupo 1 (G1) e o grupo 3 (G3) no momento anterior ao início do tratamento (T0).**

	Grupo 1		Grupo 3		p
	Média	± DP	Média	± DP	
Proteínas totais	5,51	1,01	6,01	0,79	0,369
Albumina	1,58	0,45	1,71	0,49	0,638
Cálcio total	9,75	1,92	11,22	2,25	0,252
Cálcio iônico	6,70	1,40	7,48	1,34	0,347
Fósforo	4,61	0,80	4,12	0,88	0,339
Fosfatase Alcalina	46,65	22,30	56,91	27,31	0,492
Fosfatase Alcalina óssea	24,02	16,43	27,85	14,59	0,678

**Apêndice H – Valores médios obtidos nos exames bioquímicos. Comparativo entre o grupo 2 (G2) e o grupo 3 (G3) no momento anterior ao início do tratamento (T0).**

	Grupo 2		Grupo 3		p
	Média	± DP	Média	± DP	
Proteínas totais	5,05	0,95	6,01	0,79	0,087
Albumina	1,87	0,35	1,71	0,49	0,519
Cálcio total	10,17	2,52	11,22	2,25	0,461
Cálcio iônico	6,79	1,63	7,48	1,34	0,438
Fósforo	4,81	1,07	4,12	0,88	0,250
Fosfatase Alcalina	72,04	47,32	56,91	27,31	0,513
Fosfatase Alcalina óssea	32,12	20,86	27,85	14,59	0,690

**Apêndice I – Valores médios obtidos nos exames bioquímicos. Comparativo entre o grupo 1 (G1) e o grupo 2 (G2) no quarto dia de tratamento (T1).**

	Grupo 1		Grupo 2		p
	Média	± DP	Média	± DP	
Proteínas totais	5,89	1,34	4,27	0,96	0,0367*
Albumina	1,97	0,56	1,89	0,55	0,8258
Cálcio total	9,15	1,92	7,73	1,66	0,2023
Cálcio iônico	5,92	1,19	5,31	1,44	0,4395
Fósforo	3,82	1,06	4,03	0,92	0,7326
Fosfatase Alcalina	33,21	15,63	28,12	16,28	0,5924
Fosfatase Alcalina óssea	16,38	9,15	12,18	7,85	0,4134

**Apêndice J – Valores médios obtidos nos exames bioquímicos. Comparativo entre o grupo 1 (G1) e o grupo 3 (G3) no quarto dia de tratamento (T1).**

	Grupo 1		Grupo 3		p
	Média	± DP	Média	± DP	
Proteínas totais	5,89	1,34	4,57	0,97	0,0794
Albumina	1,97	0,56	2,25	0,34	0,3218
Cálcio total	9,15	1,92	9,80	0,21	0,4284
Cálcio iônico	5,92	1,19	6,35	0,40	0,4246
Fósforo	3,82	1,06	3,39	0,66	0,4134
Fosfatase Alcalina	33,21	15,63	30,33	11,54	0,7239
Fosfatase Alcalina óssea	16,38	9,15	12,70	5,28	0,4131

**Apêndice L – Valores médios obtidos nos exames bioquímicos. Comparativo entre o grupo 2 (G2) e o grupo 3 (G3) no sétimo dia de tratamento (T2).**

	Grupo 2		Grupo 3		p
	Média	± DP	Média	± DP	
Proteínas totais	5,20	0,70	5,49	0,71	0,481
Albumina	1,98	0,56	2,15	0,32	0,541
Cálcio total	9,19	1,07	9,05	1,21	0,838
Cálcio iônico	6,02	0,36	5,80	0,81	0,551
Fósforo	3,99	1,09	3,78	0,30	0,659
Fosfatase Alcalina	49,06	32,75	36,88	14,30	0,423
Fosfatase Alcalina óssea	22,29	14,79	19,00	8,44	0,646

**Apêndice M – Valores médios obtidos nos exames bioquímicos. Comparativo entre o grupo 1 (G1) e o grupo 2 (G2) no 11º dia de tratamento (T3).**

	Grupo 1		Grupo 2		p
	Média	± DP	Média	± DP	
Proteínas totais	6,20	1,84	6,26	0,54	0,939
Albumina	2,34	0,45	1,91	0,73	0,247
Cálcio total	10,69	2,10	11,04	3,45	0,838
Cálcio iônico	6,63	1,19	7,17	2,13	0,599
Fósforo	3,79	1,57	5,21	0,98	0,091
Fosfatase Alcalina	53,08	30,45	53,74	38,01	0,974
Fosfatase Alcalina óssea	24,85	16,85	26,02	18,08	0,910

**Apêndice N – Valores médios obtidos nos exames bioquímicos. Comparativo entre o grupo 1 (G1) e o grupo 3 (G3) no 11º dia de tratamento (T3).**

	Grupo 1		Grupo 3		p
	Média	± DP	Média	± DP	
Proteínas totais	6,20	1,84	5,94	0,77	0,759
Albumina	2,34	0,45	2,24	0,40	0,696
Cálcio total	10,69	2,10	8,82	0,79	0,068
Cálcio iônico	6,63	1,19	5,54	0,59	0,072
Fósforo	3,79	1,57	4,03	0,48	0,733
Fosfatase Alcalina	53,08	30,45	56,46	43,99	0,880
Fosfatase Alcalina óssea	24,85	16,85	27,52	19,01	0,802

**Apêndice O – Valores médios obtidos nos exames bioquímicos. Comparativo entre o grupo 1 (G1) e o grupo 2 (G2) no 14º dia de tratamento (T4).**

	Grupo 1		Grupo 2		p
	Média	± DP	Média	± DP	
Proteínas totais	5,88	1,25	5,76	0,35	0,827
Albumina	2,18	0,29	2,09	0,44	0,710
Cálcio total	9,64	1,79	9,81	1,00	0,843
Cálcio iônico	6,16	1,49	6,29	0,51	0,847
Fósforo	4,57	0,99	4,57	1,13	1,000
Fosfatase Alcalina	48,31	30,53	55,90	36,65	0,705
Fosfatase Alcalina óssea	23,58	18,06	27,95	17,86	0,683

**Apêndice P – Valores médios obtidos nos exames bioquímicos. Comparativo entre o grupo 1 (G1) e o grupo 2 (G2) no 20º dia de tratamento (T5).**

	Grupo 1		Grupo 2		p
	Média	± DP	Média	± DP	
Proteínas totais	5,70	1,42	6,02	0,57	0,621
Albumina	2,28	0,44	2,08	0,41	0,433
Cálcio total	9,10	0,94	8,57	1,29	0,433
Cálcio iônico	5,65	0,79	5,48	0,99	0,756
Fósforo	5,10	1,74	5,99	1,46	0,360
Fosfatase Alcalina	50,33	43,46	38,66	30,84	0,603
Fosfatase Alcalina óssea	19,77	11,14	20,95	17,85	0,893

**Apêndice Q – Valores médios obtidos nos exames bioquímicos. Comparativo entre o grupo 2 (G2) e o grupo 3 (G3) no 20º dia de tratamento (T5).**

	Grupo 2		Grupo 3		p
	Média	± DP	Média	± DP	
Proteínas totais	6,02	0,57	5,30	1,08	0,177
Albumina	2,08	0,41	2,15	0,40	0,757
Cálcio total	8,57	1,29	7,47	1,21	0,159
Cálcio iônico	5,48	0,99	4,77	0,71	0,186
Fósforo	5,99	1,46	5,11	0,05	0,191
Fosfatase Alcalina	38,66	30,84	50,14	19,15	0,456
Fosfatase Alcalina óssea	20,95	17,85	28,04	11,21	0,429