

Efeito do ultra-som pulsado de baixa intensidade em culturas fibroblásticas L929

Effect of pulsed ultrasound of low intensity in L929 fibroblastic cultures

Rodrigo Franco de Oliveira¹; Deise A. A. Pires Oliveira¹; Cristina Pacheco Soares¹

¹Laboratório de Dinâmica de Compartimento Celular – IP&D-Univap.

Endereço para correspondência
Av. Shishima Hifumi, 2911, Urbanova,
2244-000 – São José dos Campos – SP [Brasil]
e-mail: rfranco@yahoo.com.br

Resumo

O ultra-som, comumente utilizado na área da fisioterapia, tem-se mostrado um recurso terapêutico de grande importância em relação às afecções músculo-esqueléticas. Neste trabalho, analisa-se a resposta celular após radiação ultra-sônica pulsátil de baixa intensidade em cultura celular fibroblástica. Empregou-se cultura de células fibroblásticas L929, irradiadas com ultra-som modo pulsado de baixa intensidade, divididas em seis grupos: I – controle (que não recebeu radiação), II – 0,2 W/cm², III – 0,6 W/cm², IV – 0,8 W/cm², V – 1,0 W/cm² e o VI – 2,0 W/cm². A radiação ocorreu durante quatro dias, com intervalos de 24 horas. Depois de cada intervalo, as culturas foram analisadas pelo método de MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide. A análise dos resultados demonstrou que o efeito do ultra-som 0,6 W/cm² modo pulsado a 10% foi estatisticamente significativo em relação a irradiação ultra-sônica modo pulsado 20% ($p < 0,05$). De acordo com os parâmetros utilizados na radiação de fibroblastos em cultivo, conclui-se que tanto o regime de pulso quanto o controle da intensidade empregada são fundamentais para melhor utilização do ultra-som terapêutico, uma vez que as intensidades baixas e médias reduzem os danos celulares.

Descritores: Cicatrização; Inflamação; Reparação e fibroblastos; Ultra-som terapêutico.

Abstract

The ultrasound, commonly used in physiotherapy, is considered an important therapeutic resource to musculoskeletal disorders. In this study, it is analyzed the cellular response after ultrasonic radiation pulses of low intensity in fibroblast cell culture. It was applied a culture of L929 fibroblastic cells, radiated with ultrasound pulse of low intensity, divided into six groups: I – control (which did not receive radiation), II – 0.2 W/cm², III – 0.6 W/cm², IV – 0.8 W/cm², V – 1.0 W/cm² and VI – 2.0 W/cm². The radiation occurred during four days with intervals of 24 hours. After each interval, the cultures were analyzed by the method of MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide. The results showed that the effect of 0.6 W/cm² pulsed ultrasound of 10% was statistically significant compared to pulsed ultrasonic irradiation of 20% ($p < 0.05$). According to the parameters used in radiation of fibroblasts culture, it was concluded that both the system of control of the pulse as the intensity employed are necessary to make a better use of ultrasound therapy, since the low and medium intensity reduce the damage cell.

Key words: Healing; Inflammation; Repair and fibroblasts; Therapeutic ultrasound.

Introdução

O uso do ultra-som tem-se mostrado um recurso terapêutico de grande importância em relação às afecções músculo-esqueléticas¹. Na área biológica, foi introduzido, aproximadamente, há 70 anos, tendo ampla utilização. Entretanto, existem inúmeras pesquisas sendo realizadas para melhor explorar seu campo de atuação e compreender de seus efeitos e sua interação com o meio biológico. Considerado um instrumento indispensável pelos fisioterapeutas, o ultra-som é comumente empregado para auxiliar no tratamento de disfunções dos tecidos moles, incluindo contraturas, lesões articulares, tendinites, bursites, espasmos músculo-esqueléticos e dor. Em decorrência dos efeitos físicos (térmicos e mecânicos) que ele produz, são obtidas respostas significativas dos tecidos biológicos^{2,3}. A radiação ultrassônica acelera a inflamação modulando os níveis de prostaglandina, realça a ação dos macrófagos, facilita a síntese de colágeno, promove a imunidade e aumenta a velocidade da cicatrização, pois estimula a proliferação dos fibroblastos – células importantes no processo de cicatrizar ferida⁴.

Destaca-se, como efeito do ultra-som pulsado de baixa intensidade em relação ao processo inflamatório e reparação tecidual, a possibilidade de potencializar ou de inibir a atividade inflamatória, dependendo da geração de radicais livres nos tecidos por ação direta, do estímulo da função leucocitária, do aumento na angiogênese, da síntese e maturação de colágeno e também da formação do tecido cicatricial^{5,6}.

Neste trabalho, analisa-se a resposta das células após radiação ultra-sônica pulsátil de baixa intensidade em cultura celular fibroblástica L929.

Materiais e métodos

Cultura celular

Células L929 de fibroblastos de tecido conjuntivo de ratos- ATCC CCL-1 NCTC (Instituto

Adolfo Lutz – SP, Brasil) foram rotineiramente cultivadas em placas de 25 cm² (TPP, Zollstrasse – Suíça), com MEM (*Minimum Essential Medium*) (Gibco™ – *Invitrogen Corporation, Grand Island, USA*), suplementado com 10% Fetal Bovine Serum (FBS) (Cultilab, Campinas SP – Brasil), e mantidos em estufa de CO₂, atmosfera 5%, a 37°C. O estudo recebeu aprovação do Comitê de Ética da Universidade do Vale do Paraíba (Univap), sob protocolo nº A061/CEP/2006. Células de tecido conjuntivo de rato foram utilizadas para testes de toxicidade *in vitro*, como é recomendado na ISO 10993-5.

Ultra-som

Utilizou-se o equipamento ultra-som KLD – (Biosistemas Equipamentos Eletrônicos Ltda – Amparo SP- Brasil), modelo Avatar III, com 1 cabeçote de 1 MHz, com área de radiação efetiva (ERA) de 1 cm², devidamente calibrado pelo fabricante.

Irradiação

Para avaliar a faixa estimulatória do ultra-som e a manutenção da morfologia celular formaram-se os seguintes grupos: I – controle (que não recebeu radiação), II – 0,2 W/cm², III – 0,6 W/cm², IV – 0,8 W/cm², V – 1,0 W/cm² e o VI – 2,0 W/cm², com regime de pulso de 20% (2:8 ciclo de trabalho), de acordo com as intensidades efetivas acima citadas. Na irradiação ultra-sônica, utilizaram-se placas TPP de 12 poços, com 2,4 mm de diâmetro e 1,8 mm de profundidade, contendo a cultura de células. Para um bom acoplamento da interface do ultra-som (distância transdutor – camada de células: de 18 mm) e propagação da onda mecânica, os volumes dos poços foram completados com meio MEM até a borda, e o poço irradiado, mantido sempre na mesma posição em relação à face do transdutor do ultra-som. Realizou-se a aplicação por 2 minutos em cada poço, em temperatura ambiente, sendo descartado o aquecimento da placa. Após esse período, as culturas foram avaliadas no microscópio invertido (Leica DMIL – Wetzlar – Alemanha) para análise morfológica e registro das imagens.

Tabela 1: Parâmetros do ultra-som, utilizados para microscopia óptica

Frequência de modulação [MHz]	1
Modo de emissão	Pulsado
Índice de modulação [%]	10-20
Tempo de radiação [min.]	2
Intensidade efetiva [W/cm ²]	0,2 – 0,6 – 0,8 – 1,0 – 2,0

Nota: MHz – Mega-Hertz;
W/Cm² – Watts por centímetro quadrado.

Teste de citotoxicidade celular por MTT

Realizou-se, pelo método de MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide, a avaliação da citotoxicidade. As culturas de células L929 foram cultivadas em quatro placas TPP de 12 poços, numa densidade de 1×10^6 células/mL, e receberam irradiação ultra-sônica nos intervalos de 24, 48 e 72 horas, e após 24 horas de cada irradiação foi realizado teste de MTT, de acordo com ensaio a seguir. Depois de retirado o meio MEM, cada poço recebeu 80 μ L de MTT, uma concentração final de 0,5 mg/mL, sendo incubado por 1 hora, a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂, em seguida, adicionou-se a cada poço 400 μ L de Dimetil Sulfoxido (DMSO). A placa foi mantida em agitação por 30 minutos para a solubilização dos cristais de formazana. A sua concentração foi quantificada espectroscopicamente por meio de um leitor de microplacas (Leitor ELISA – SpectraCount – Packard Instrument, Offenburg – Alemanha), em comprimento de onda de 570nm.

Tabela 2: Parâmetros do ultra-som, utilizados para teste de MTT

Frequência de modulação [MHz]	1
Modo de emissão	Pulsado
Índice de modulação [%]	10-20
Tempo de radiação [min.]	2
Intensidade efetiva [W/cm ²]	0,2 – 0,6

Nota: MHz – Mega-Hertz;
W/Cm² – Watts por centímetro quadrado.

Análise estatística

Os resultados foram expressos como valores médios \pm . Para comparações e verificação de diferenças expressivas entre os grupos, utilizaram-se a Análise de Variância (ANOVA) e o teste *post hoc* de Tukey HSD. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Na análise estatística, foi utilizado o programa Graphpad Prism, versão 4.0 (San Diego, Ca USA).

Resultados e discussão

A análise dos resultados, após irradiação ultra-sônica pulsada de baixa intensidade, mostrou que as células não submetidas à irradiação (controle) apresentaram morfologia alongada, característica desse tipo celular (Figura 1A), e as irradiadas com intensidades de 0,2 W/cm² a 0,6 W/cm² mantiveram sua forma e integridade, após irradiação (Figura 1B e C). Já no grupo irradiado com intensidade de 0,8 W/cm², observaram-se perda de adesão de algumas células e alteração de sua morfologia (Figura 1D); no irradiado com intensidade de 1,0 W/cm², a presença de fragmentos celulares e a redução das células aderidas (Figura 1E), e, no irradiado com intensidade de 2,0 W/cm², identificou-se completa perda de adesão com agregação de fragmentos celulares (Figura 1F). Os dados obtidos demonstraram que as culturas de células L929 submetidas à radiação ultra-sônica, com baixa intensidade 0,2 a 0,6 W/cm², apresentaram manutenção da forma e da integridade das células, corroborando resultados descritos por outros pesquisadores^{7, 8, 12}.

Okuno et al.⁹ observaram que o ultra-som pulsado pode alterar a estrutura e o funcionamento celular, mediante seu efeito de cavitação transiente e a mudança de volume e pressão causada pelas bolhas formadas no meio líquido, que, ao se chocarem, liberam energia que pode romper ligações químicas, produzindo radicais livres reativos e provocando mudanças químicas nas células, ou por seu efeito de cavitação

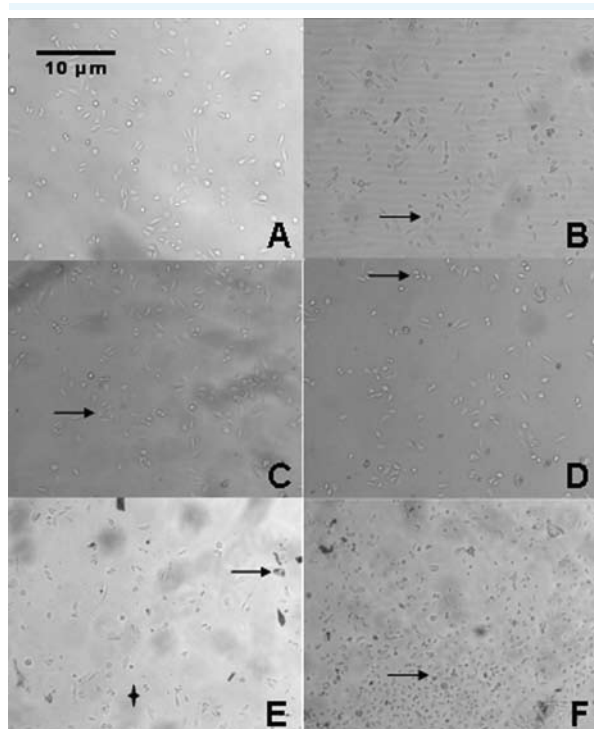


Figura 1: Células L929 irradiadas com ultra-som

- (A) Grupo controle;
- (B) Grupo irradiado, 0,2 W/cm²;
- (C) Grupo irradiado, 0,6 W/cm²;
- (D) Grupo irradiado, 0,8 W/cm²;
- (E) grupo irradiado, 1,0 W/cm²;
- (F) grupo irradiado, 2,0 W/cm²

estável, em que as bolhas podem modificar a permeabilidade da membrana celular para íons cálcio e sódio, aumentando a síntese protéica. Além disso, as organelas podem-se alterar em razão das forças de radiação.

Os dados obtidos pela observação morfológica de fibroblastos em cultivo, após aplicação de ultra-som modo pulsado de baixa e média intensidade (0,2 W/cm² a 0,6 W/cm²), mantendo a frequência de 1 MHz e o índice de modulação de 20% (2:8 ciclo de trabalho), demonstraram melhores resultados para as células, por até 72 horas pós-irradiação, enquanto, na primeira hora pós-irradiação, o aumento da intensidade proporcionou uma tendência à redução de células viáveis, sugerindo alteração em suas membranas, de acordo com as afirmações de Okuno et al.⁹, e Dyson et al.¹⁰.

O efeito destrutivo do ultra-som pode ocorrer sob influência de altas intensidades, aventando que a cavitação é o mecanismo físico responsável pelas alterações celulares. Evidenciam-se na literatura alterações na membrana e consequente destruição de diversos tipos de células de embriões de galinha submetidos à radiação com ultra-som¹¹.

Segundo Hsieh¹² e Lirani-Galvão et al.¹³, os mecanismos atérmicos têm um desempenho considerável no que diz respeito aos efeitos terapêuticos (regeneração de tecidos), aumento da permeabilidade e difusão da membrana celular, aumento de cálcio intracelular e mudança da atividade elétrica dos tecidos nervosos.

De acordo com Demir¹⁴, o ultra-som tem demonstrado sua eficiência na estimulação dos fibroblastos e, com intensidade de 0,1 W/cm² a 0,5 W/cm², acelera a fase inflamatória do reparo. Lowe¹⁵ e Oliveira et al.¹⁶ também observaram que a aceleração do reparo, utilizando doses de ultra-som com intensidades de aproximadamente 0,5 W/cm² modo pulsado e frequência de 1 MHz ou 3 MHz, promove cicatrização.

Com a análise do efeito do ultra-som em modo pulsado a 10% (1:9 ciclo de trabalho) em cultura de fibroblastos, foram obtidos os seguintes resultados: após 24 horas, o grupo de células irradiadas à intensidade de 0,2 e 0,6 W/cm² apresentou aumento em sua viabilidade celular, quando comparado com os dados apresentados pelo grupo de células não-irradiadas ($p=0,001$). Entretanto, ao comparar o efeito entre as células irradiadas a 0,2 W/cm² e 0,6 W/cm², não demonstrou significância estatística ($p=0,06$). Depois de 48 horas, observou-se o mesmo comportamento apresentado por esses grupos de células não-irradiadas e irradiadas, durante as 24 horas iniciais ($p=0,001$), já após 72 horas de irradiação, apresentaram aumento significativo de sua viabilidade celular, quando comparado com os valores de viabilidade apresentada por células do grupo controle não-irradiadas ($p=0,001$)². O fato interessante, apresentado nesse período de tempo, está relacionado ao aumento significativo da viabilidade celular

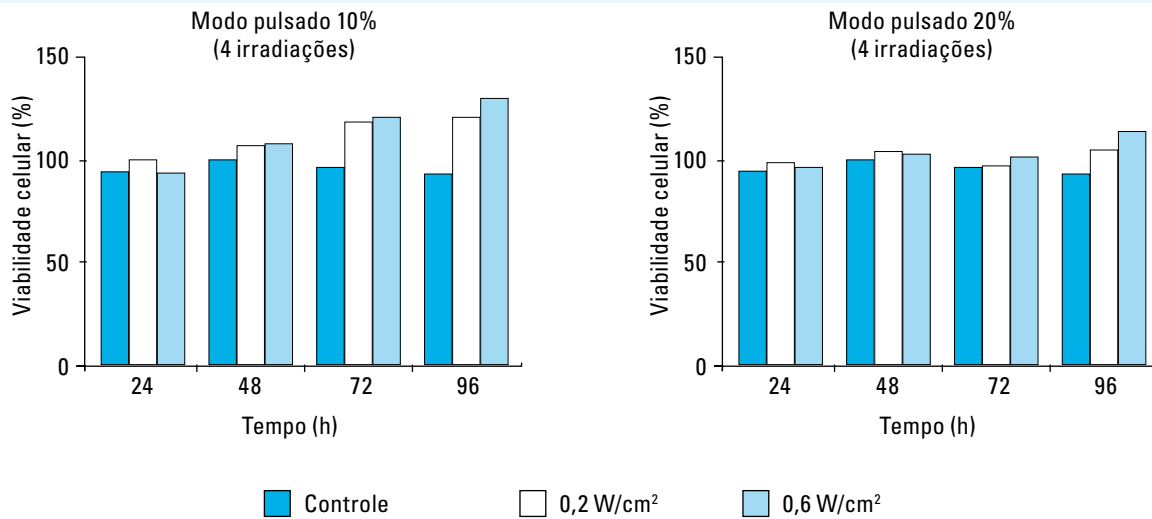


Figura 2: Crescimento celular em razão da irradiação ultra-sônica e tempo de cultivo (h); viabilidade celular das populações controle, 0,2 W/cm², 0,6 W/cm²

apresentado por células irradiadas à intensidade de 0,6 W/cm², quando comparado com os valores apresentados por células irradiadas a 0,2 W/cm² ($p=0,01$). Transcorridas 96 horas após a primeira irradiação, houve uma tendência dos grupos de células irradiadas a 0,2 e 0,6 W/cm² em manter seu comportamento de crescimento entre si, da mesma forma como apresentado na análise das 72 horas.

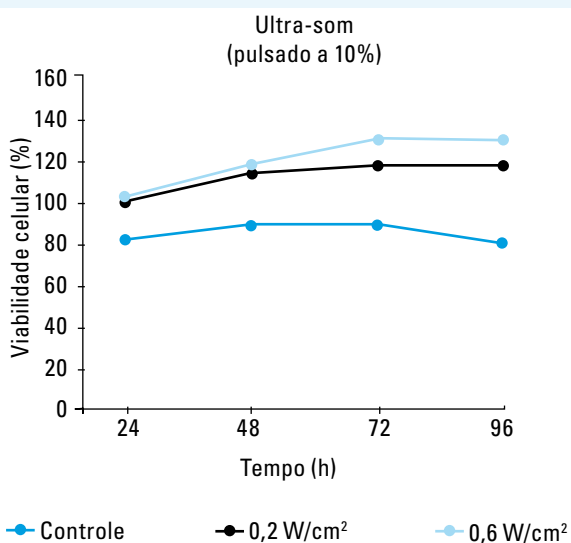


Figura 3: Valores obtidos na análise das médias de três experimentos de viabilidade celular mediante aplicação de ultra-som em modo pulsado a 10%

Tabela 3: Valores de significância obtidos na análise de variância entre as médias de três experimentos de cultura de células por meio do teste estatístico ANOVA (*one-way*) e *post hoc* Tukey test HSD, para células irradiadas pelo ultra-som em modo pulsado a 10%

Modo Pulsado (10%)			
Tempo (h)	Controle vs. 0,2 W/cm ²	Controle vs. 0,6 W/cm ²	0,2 W/cm ² vs. 0,6 W/cm ²
24	0,001*	0,001*	0,06 – NS
48	0,001*	0,001*	0,065 – NS
72	0,001*	0,001*	0,01*
96	0,001*	0,001*	0,01*

*Para valores com significância estatística. NS – não significante.

Nota: W/Cm² – Watts por centímetro quadrado

Após análise do efeito do ultra-som em modo pulsado a 20% (2:8 ciclo de trabalho), foram obtidos os seguintes resultados: em 24 horas, o grupo de células irradiadas à intensidade de 0,2 e 0,6 W/cm² apresentou aumento em sua viabilidade celular quando comparado com os dados identificados no grupo de células não-irradiadas ($p=0,01$), e as células irradiadas a 0,2 W/cm², tiveram um aumento significativo em sua viabilidade celular, quando comparado com os valores apresentados por células irradiadas a 0,6 W/cm² ($p=0,01$). Após 48 horas de irradiação, as células mantiveram o mesmo padrão de

crescimento; entretanto, ao se comparar o efeito entre as irradiadas a 0,2 W/cm² e 0,6 W/cm², ele não demonstrou significância estatística na análise realizada durante esse período (p=0,08). Depois de 72 horas, o comportamento manteve-se uniforme, semelhante ao período de 48 horas da primeira irradiação, porém cabe salientar que houve uma discreta tendência ao decréscimo em seus valores nesse período. Após 96 horas, os valores de crescimento, apresentados pelos grupos de células irradiadas a 0,2 e 0,6 W/cm², foram significativamente maiores que os das não-irradiadas do grupo controle (p=0,001), e as células irradiadas a 0,6 W/cm² foram expressivamente maiores do que as irradiadas a 0,2 W/cm².

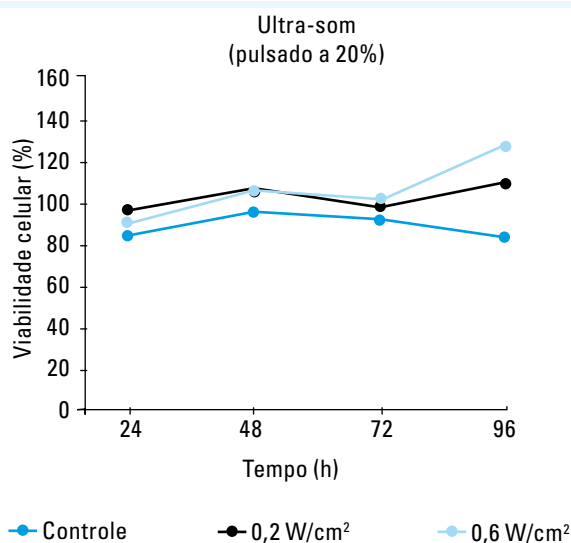


Figura 4: Valores obtidos na análise das médias de três experimentos de viabilidade celular mediante aplicação de ultra-som em modo pulsado a 20%

Assim, com os progressos terapêuticos decorrentes dos avanços tecnológicos conseguidos nas últimas décadas, o ultra-som tornou-se um recurso que tem apresentado bons resultados como terapia para cicatrização. Observa-se, na fase inflamatória inicial da reparação, uma aceleração do processo, aumentando a liberação de fatores de crescimento pela degranulação dos mastócitos, plaquetas e macrófagos. Com isso, a fase proliferativa se inicia precocemente, reduzindo sua duração e atuando no início da fase

Tabela 4: Valores de significância obtidos na análise de variância entre as médias de três experimentos de cultura de células por meio do teste estatístico ANOVA (one-way) e post hoc Tukey test HSD, para células irradiadas pelo ultra-som em modo pulsado a 20%

Tempo (h)	Modo Pulsado (20%)		
	Controle vs. 0,2 W/cm ²	Controle vs. 0,6 W/cm ²	0,2 W/cm ² vs. 0,6 W/cm ²
24	0,01*	0,01*	0,01*
48	0,01*	0,01*	0,08 – NS
72	0,01*	0,01*	0,068 – NS
96	0,001*	0,001*	0,001*

*Para valores com significância estatística. NS – não significante.

Nota: W/Cm² – Watts por centímetro quadrado

Tabela 5: Valores médios e desvios-padrão de três experimentos de viabilidade celular mediante a aplicação de ultra-som em modo pulsado a 10 e 20% em diferentes intensidades

Tempo (h)	Modo Pulsado (10%)			Modo Pulsado (20%)		
	Controle	0,2	0,6	Controle	0,2	0,6
		W/cm ²			W/cm ²	
24	94	99	94	94	99	96
	94	100	94	94	99	96
	94	100	95	94	100	97
	94*	99,67*	94,33*	94*	99,33*	96,33*
	0,0**	0,58**	0,58**	0,0**	0,58**	0,58**
48	99	107	108	99	104	104
	99	108	109	99	104	104
	99	108	109	99	105	103
	99*	107,67*	108,67*	99*	104,33*	103,67*
	0,0**	0,58**	0,58**	0,0**	0,58**	0,58**
72	96	117	120	96	97	101
	96	117	120	96	97	101
	96	118	120	96	97	102
	96*	117,33*	120*	96*	97*	101,33*
	0,0**	0,58**	0,0**	0,0**	0,0**	0,58**
96	93	121	130	93	105	115
	93	120	129	93	105	114
	93	120	129	93	105	114
	93*	120,33*	129,33*	93*	105*	114,33*
	0,0**	0,58**	0,58**	0,0**	0,0**	0,58**

*Média Aritmética. Nota: W/Cm² – Watts por centímetro quadrado

**Desvio-padrão

de remodelação. A cicatrização é um importante passo que parece ser acelerado pela liberação desses fatores de crescimento, estimulada pelo ultra-som^{5,17}.

Conclusão

De acordo com os parâmetros utilizados na radiação de cultura fibroblástica, conclui-se que tanto o regime de pulso quanto o controle da intensidade empregada são fundamentais para melhor utilização do ultra-som terapêutico, uma vez que as intensidades baixas e médias de 0,2 W/cm² e 0,6 W/cm² reduzem os danos celulares.

Referências

1. Guirro R, Elias D, Serrão F, Bucalon AJ. Dosimetria de aparelhos de ultra-som terapêutico utilizando balança semi-analítica. *Rev Bras Fisiot.* 1996;1(2):79-82.
2. Dyson M. Mechanisms involved in therapeutic ultrasound. *Physiotherapy.* 1987;73(3):116-120.
3. Young SR, Dyson M. Effect of therapeutic ultrasound on the breaking of full-thickness excised skin lesions. *Ultrasonics.* 1990;28:170-180.
4. Hawkins DH, Abrahamse H. The role of laser fluence in cell viability, proliferation, and membrane integrity of wounded human skin fibroblasts following helium-neon laser irradiation. *Lasers Surg Med.* 2006;38:74-83.
5. Gonçalves G, Parizotto NA. Fisiopatologia da regeneração cutânea: Atuação da fisioterapia. *Rev Bras Fisiot.* 1998;3(1).
6. Warden S, Fuchs RK, Kessler CK, et al. Ultrasound produced by a conventional therapeutic ultrasound unit accelerates fracture repair. *Phys Ther.* 2006;86(8).
7. Nolasco MA. Efeitos da estimulação ultra-sônica sobre a cicatrização da pele de ratos diabéticos. [dissertação de mestrado]. São Carlos: Escola de Engenharia de São Carlos; 1993.
8. Pospisilova J. Effect of ultrasound on collagen synthesis and deposition in experimental granuloma tissue: possibilities of clinical uses of ultrasound in healing disorders. *Acta Chir Plast.* 1976;8:176-83.
9. Okuno E, Caldas IL, Chow C. Física para ciências biológicas e biomédicas. 1 ed. São Paulo: Harbra. 1986.
10. Dyson M, Pond JB, Woodward J, Broadbent J. The production of blood cell stasis and endothelial cell damage in the blood vessels of chick embryos treated with ultrasound in a stationary wave field. *Ultrasound and Medical Biology.* 1974;1:133-148.
11. Chapman IV, Macnally NA, Tucker S. Ultrasound induced changes in the rates of influx and efflux of potassium ions in rat thymocytes in vitro. *Br J Radiol.* 1979; 47:411-415.
12. Hsieh YL, Effects of ultrasound and diclofenac phonophoresis on inflammatory pain relief: suppression of inducible nitric oxide synthase in arthritic rats'. *Phys Ther.* 2006;86(1).
13. Lirani-Galvão AP, Jorgetti V, Silva OL. Comparative study of how low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasound affect bone repair in rats. *Photomed Laser Surg.* 2006;24(6).
14. Demir H, Yaray S, Kirnap M, Yaray K. Comparison of the effects of laser and ultrasound treatments on experimental wound healing in rats. *J Rehabil Res Dev.* 2004;41(5):721-8.
15. Lowe AS, Walker MD, Cowan R, Baxter D. Therapeutic ultrasound and wound closure: lack of healing effect on x-ray irradiated wound in murine skin. *Arch Phys Med Rehabil.* 2001;82:1507-11.
16. Oliveira RF, Oliveira DAAP, Monteiro W, Zangaro RA, Magini M, Pacheco-Soares C. Comparison between the effect of low level laser therapy and low intensity pulsed ultrasonic irradiation *in vitro*. *Photomed Laser Surg.* 2008;26:6-9.
17. Oliveira RF de, Oliveira DAAP, Machado AHA, Silva NS da, Magini M, Pacheco-Soares C. Assessment of fibroblast cells submitted to ultrasonic irradiation. *Cell Biol Int.* 2008;32:1329-35.



