

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO**

**JEFFERSON DA SILVA**

**ESTUDO DOSIMÉTRICO DO ULTRASSOM PULSÁTIL PARA  
REGENERAÇÃO DE MONOCAMADA OSTEOBLÁSTICA APÓS LESÃO IN  
VITRO: UMA NOVA PROPOSTA DE DOSE ULTRASSÔNICA**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES, 28 de ABRIL de 2014**

JEFFERSON DA SILVA

DOSIMETRIA DO ULTRASSOM PULSÁTIL DE BAIXA INTENSIDADE PARA  
REGENERAÇÃO DE MONOCAMADA OSTEOBLÁSTICA APÓS FERIMENTO IN VITRO:  
UMA NOVA PROPOSTA DE DOSE ULTRASSÔNICA

Tese submetida ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal, na área de concentração de afecções clínicas e cirúrgicas de pequenos animais.

Aprovada em 28 de abril de 2014

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Marcus Vinícius de Mello Pinto, D.Sc. N.Y. University

---

Prof. Ana Bárbara Freitas Rodrigues, D.Sc. UENF

---

Prof. Renato Augusto Damatta, D.Sc. UENF

---

Prof. Antonio Peixoto Albernaz, D.Sc. UENF

Orientador



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO**

**JEFFERSON DA SILVA**

**ESTUDO DOSIMÉTRICO DO ULTRASSOM PULSÁTIL PARA  
REGENERAÇÃO DE MONOCAMADA OSTEOBLÁSTICA APÓS LESÃO IN  
VITRO: UMA NOVA PROPOSTA DE DOSE ULTRASSÔNICA**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES, 28 de ABRIL de 2014**

JEFFERSON DA SILVA

**ESTUDO DOSIMÉTRICO DO ULTRASSOM PULSÁTIL PARA  
REGENERAÇÃO DE MONOCAMADA OSTEABLÁSTICA APÓS LESÃO IN  
VITRO: UMA NOVA PROPOSTA DE DOSE ULTRASSÔNICA**

Tese submetida ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal, na área de concentração de afecções clínicas e cirúrgicas de pequenos animais.

ORIENTADOR: Antônio Peixoto Albernaz

COORIENTADORA: Andrea Cristina Veto Arnholdt

CAMPOS DOS GOYTACAZES, 28 de ABRIL de 2014

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos aqueles que, de forma direta e indireta, contribuíram para sua realização, assim como para todos AQUELES que me estenderam a mão ou intuíram que era necessário continuar caminhando para completar este ciclo que agora se encerra.

GLÓRIA, LUZ E ESPLENDOR A TODOS VOCÊS!

## AGRADECIMENTOS

Agradecer não é tarefa fácil, pois são muitos os agradecimentos que tenho a fazer ao chegar até aqui. É com muita alegria que agradeço a todos os EUS que contribuíram grandiosamente para realização deste trabalho e do curso de doutorado como um todo. Seja do ponto de vista cosmogênico ou antropogênico, juntos formaram e formam uma unidade, um conjunto de  $EUS = D+EUS = DEUS$ . Agradecer a DEUS é reconhecê-lo na essência de cada um daqueles que me auxiliaram, contribuíram, doaram-se em alguns momentos de suas vidas. Cada UM com um pedaço de SI para se somar a um pedaço de MIM e juntos formarmos uma UNIDADE, criadora de mais uma parte do conhecimento, que unida a outras e outras, formam a complexidade do SABER. Algo que irá contribuir cada vez mais para nossa evolução na terra, “transformando vida energia em vida consciência”.

Minha eterna gratidão a todos!

## EPIGRAFE

“Existe uma relação exata entre a humanidade e a causa que lhe chamou a existir”.

Henrique José de Souza (JHS)

“A ciência é um dos caminhos a ser percorrido para se descobrir esta exata relação”.

## RESUMO

Os objetivos deste estudo foram: estabelecer critérios metodológicos para o uso de ultrassom pulsátil de baixa intensidade (USPBI) para regeneração de monocamada osteoblástica *in vitro*; definir parâmetros de dosagem terapêutica quanto ao tempo, à intensidade e à frequência e relacionar os parâmetros utilizados de dosagem terapêutica com o comportamento de Metaloproteinases de Matriz (MMP-2). Utilizamos cultura *in vitro* de osteoblastos para determinar se o USPBI induz a proliferação destas células. Foi aplicada irradiação uma vez ao dia em diferentes tempos, 5, 10, 15 e 20 minutos em três intensidades, 0.26, 0.52 e 1.0 w/cm<sup>2</sup>. O equipamento de USPBI utilizado foi de 1MHz, 10% de emissão (duty cycle) e 100Hz de frequência. Foram plaqueadas 1x10<sup>6</sup> células/poço (placas de 60x15mm) e as células permaneceram em meio RPMI 1640 com 1% SFB e 1% de gentamicina para sincronização do ciclo celular. Após 24 horas, foi provocado um ferimento na porção mediana da camada de células de cada poço, por meio de um tip de uma pipeta de 100µl, sendo um controle e os demais equivalentes aos tempos e intensidades irradiadas. O ferimento foi fotografado e medido por meio de microscopia óptica invertida e do software Axio Vision Release 4.8.2. nos tempos 0 (zero), 12 e 24 horas após a irradiação. As distâncias dos bordos do ferimento foram medidas pelo mesmo software, normalizadas a 100% no tempo 0 (zero) e comparadas nos tempos 12 e 24 horas. Para tanto, foi empregada a análise de variância (ANOVA two way) com nível de significância de  $p < 0,05$ . Os melhores e os piores resultados de fechamento do ferimento, após irradiação do USPBI, foram submetidos à zimografia para quantificação das MMP-2. Os resultados encontrados, após análise estatística, indicam que a dose equivalente a 0.26 w/cm<sup>2</sup> ao tempo de 10 minutos com taxa de emissão de 10% e frequência de 100Hz promoveu maior velocidade na regeneração do ferimento das células osteoblásticas, submetidas a este protocolo, já que, em 12 horas após a irradiação, todo o ferimento estava regenerado. Em seguida, a dose de 0.52 w/cm<sup>2</sup> ao tempo de 5 minutos, nas mesmas condições de emissão e frequência, também demonstrou eficiência para regeneração, após a irradiação, necessitando, porém, de um tempo maior, 24 horas. A dose de 1.0 w/cm<sup>2</sup> com taxa de emissão de 10% e frequência de 100Hz demonstrou ausência de regeneração celular em todas as doses e tempos testados. Observou-se que, na dose de 0,26 w/cm<sup>2</sup> de intensidade por 10 minutos de irradiação, ocorreu maior atividade da forma pró-ativa e ativa de MMP2, após 12 horas de irradiação, quando comparada à do grupo-controle no mesmo período e quando comparada com as demais intensidades, seja dos melhores resultados e dos piores resultados. Estes achados indicam uma relação entre o fechamento do ferimento em 12 horas e a maior atividade de MMP2 neste mesmo período. De acordo com a metodologia empregada neste estudo, pode-se concluir que o ultrassom de baixa intensidade promove a regeneração osteoblástica em doses baixas e em tempos intermediários com maior velocidade, quando comparado ao de maiores intensidades e de tempo mais longos. As doses baixas nos tempos intermediários de duração promovem aumento da atividade de MMPs2 que são essenciais para a manutenção das características fisiológicas e funcionais do tecido ósseo, seja em condições de injúria ou

na sua condição de homeostase. Os resultados encontrados neste estudo estabelecem um protocolo de tratamento que poderá ser aplicado em pequenos animais na prática clínica e, possivelmente, em humanos, para a obtenção de maior eficiência nas respostas clínico-funcionais desejadas.

## ABSTRACT

The objectives of this study was : to establish methodological criteria for the use of pulsed low-intensity ultrasound ( LIPUS ) for regeneration of osteoblast monolayer in vitro ; define parameters of therapeutic dosage as to time , intensity, and frequency and relate the parameters used in therapeutic dosage to the behavior of matrix metalloproteinases (MMP-2). Used in vitro culture of osteoblasts to determine whether the LIPUS induces proliferation of these cells. Irradiation was applied once daily at different times 5, 10, 15 and 20 minutes in three levels, 0:26, 0:52 and 1.0 W / cm<sup>2</sup>. The equipment used was USPBI of 1MHz, 10% of emissions (duty cycle) and 100Hz frequency. 1x10<sup>6</sup> cells / well (plates 60x15m) and the cells remained in RPMI 1640 with 1% FCS and 1% gentamycin for synchronization of the cell cycle was plated. After 24 hours, a wound was caused in the middle portion of the cell layer in each well using a pipette tip 100 ul of one control and other equivalents to the irradiation times and intensities. The wound was photographed and measured by inverted light microscopy and Axio Vision release 4.8.2 software at zero, 12 and 24 hours after irradiation time. The distances of the edges of the wound were measured by the same software, normalized to 100% at time zero and compared in time 12 and 24 hours. Therefore, we employed analysis of variance (ANOVA two way) with a significance level of  $p < 0.05$ . The best and the worst results of wound closure after irradiation LIPUS were subjected to zymography for quantification of MMP-2. The results, after statistical analysis, indicate that the equivalent to 0.26 W / cm<sup>2</sup> at the time of 10 minutes with emission rate of 10% and frequency of 100Hz dose promoted greater speed in the regeneration of the wound of osteoblastic cells subjected to this protocol, for 12 hours after irradiation, all wound was regenerated. Then the dose 0.52 w / cm<sup>2</sup> to time of 5 minutes under the same conditions of issue and often also demonstrated efficiency for regeneration, however, requiring a longer time, 24 hours after irradiation. The dose of 1.0 w/cm<sup>2</sup> with emission rate of 10% and frequency of 100Hz, showed absence of cellular regeneration at all doses and times tested. It was observed that at a dose of 0.26 w / cm<sup>2</sup> intensity for 10 minutes of irradiation was increased activity of pro-active and active form of MMP2, after 12 hours of irradiation, when compared to the control group in the same period and compared with the other intensities, is the best of the worst results and outcomes. These findings indicate a relationship between wound closure at 12 hours and increased activity of MMP2 in the same period. According to the methodology employed in this study it can be concluded that low intensity ultrasound promotes osteoblastic regeneration at low doses and at intermediate times higher speed compared to higher intensities and longer time. Low doses in the intermediate duration times promote increased activity MMPs2 that are essential for maintenance of physiological and functional characteristics of bone tissue, either in terms of injury or condition in its homeostasis. The results of this study establish a treatment protocol that can be applied in small animal clinical practice, and possibly in humans, for achieving greater efficiency in the desired clinical and functional responses.

SUMÁRIO	PG
1- INTRODUÇÃO	01
2- DESENVOLVIMENTO	04
2.1) Revisão de Literatura	04
2.1.1) O Ultrassom	04
2.1.2) Mecanismos de Interação do ultrassom com os tecidos	05
2.1.2.1) Mecanismo Térmico	06
2.1.2.2) Mecanismo não térmico	07
2.1.2) Metaloproteinases de Matrix Extracelular	08
2.1.3) Inibidores de Metaloproteinases de Matrix Extracelular	10
2.1.4) Células ósseas e mecanismos de regeneração	11
2.1.5) Estudos relacionados ao uso de ultrassom de baixa intensidade	18
3- MATERIAL E MÉTODO	25
3.1) Fase I	25
3.2) Fase II	27
4- RESULTADOS	31
4.1) Fase I	31
4.2) Fase II	33
5- DISCUSSÃO	35
5.1) Fase I	35
5.2) Fase II	40
6- CONCLUSÕES	43
7- REFERÊNCIAS	44
ANEXOS	48
Artigo I	48
Artigo II	63

## **1- INTRODUÇÃO**

As lesões que acometem o sistema músculo-esquelético como as fraturas ósseas são muito comuns na sociedade atual, representando um alto custo de saúde para o tratamento das mesmas, principalmente se esses tipos de lesões levarem um longo tempo de cicatrização ou regeneração e trouxerem doenças associadas, caracterizando morbidade e comorbidade. A instalação dessa condição clínica leva à limitação funcional significativa que compromete a qualidade de vida das atividades diárias, profissionais e de lazer.

Existem diferentes caminhos fisiológicos que o próprio organismo responde a uma dada lesão que culminará com a cura do tecido. Entretanto, por diferentes fatores, muitas vezes a cicatrização ou a regeneração do tecido não acontece ou ocorre lentamente. Desse modo, o uso de recursos terapêuticos busca acelerar o processo de cura dos tecidos lesionados e a sua recuperação funcional.

Dentre os recursos terapêuticos utilizados para cicatrização do tecido ósseo e muscular está o uso de sonioterapia, ou seja, ultrassom pulsátil de baixa intensidade (USPBI) como modalidade terapêutica mundialmente conhecida e utilizada clinicamente, para cura dos tecidos lesionados, por meio do fenômeno Lippmann, que representa a vibração nos cristais Titanato de Bário e Ziconato-Titanato de Chumbo, transformando energia elétrica em energia mecânica. Esta energia por meio de ondas ultrassônicas atingem os tecidos biológicos. A partir da propagação da energia ultrassônica que atinge os tecidos biológicos, ocorre uma sequência de eventos fisiológicos que culmina com a cicatrização ou regeneração tecidual.

Apesar de se encontrar na literatura mundial diferentes estudos *in vivo* e *in vitro* que apontam os efeitos fisiológicos promovidos pelo ultrassom, alguns estudos de revisão sistemática e de meta-análise descrevem trabalhos que apontam resultados antagônicos entre aqueles que recomendam ou não recomendam o uso clínico do ultrassom pulsátil.

A variabilidade metodológica dos estudos citados em meta-análises e revisões sistemáticas aponta para maior variação nos parâmetros de uso da intensidade e do tempo de aplicação, durante o uso do ultrassom com finalidade terapêutica, não havendo uma padronização e/ou critérios bem estabelecidos para a dose terapêutica a ser empregada nos diferentes tecidos. Assim sendo, o nível de recomendação para uso do ultrassom pulsátil para

cicatrização tecidual varia entre fraco e moderado, dados os critérios de evidência recomendados, pela literatura mundial em saúde, para aplicação de determinadas técnicas ou procedimentos terapêuticos.

O nível de recomendação para o uso de ultrassom pulsátil é III ou IV, principalmente pela variabilidade dos parâmetros de uso clínico e experimental, empregados quanto ao tempo, intensidade e frequência terapêutica. Trata-se de uma modalidade de terapia ainda com algumas questões para serem respondidas e, posteriormente, serem aplicadas com maior segurança no processo de cura dos tecidos. Desta forma, a pergunta que norteia esse estudo é: *Quais os parâmetros dosimétricos de ultrassom pulsátil de baixa intensidade (USPBI) que promovem a regeneração de células osteoblásticas?*

A evolução social conquistada nas últimas décadas permitiu um comportamento humano e animal cada vez mais interativo nos diversos níveis de atividade social, principalmente nas atividades de lazer. Observa-se que os problemas de saúde que acometem os animais são cada vez mais similares àqueles que acometem os homens, como as fraturas ósseas e as lesões de tecidos elásticos e contráteis representados pelos músculos. Ao mesmo tempo, os recursos empregados para o tratamento das lesões músculo-esqueléticas dos animais são, em muitos casos, os mesmos empregados para o tratamento lesões semelhantes nos seres humanos.

Por outro lado, a evolução científica conquistada até o presente momento é baseada, entre outras coisas, no aumento crescente da inter e transdisciplinaridade das profissões, permitindo maior benefício social de saúde, seja para o homem, seja para o animal. Nesse contexto de integração do conhecimento e seus benefícios, com a descoberta de como acelerar os efeitos fisiológicos e terapêuticos que os recursos utilizados na fisioterapia podem oferecer nos processos de cura das lesões músculo-esqueléticas que acometem os animais, será possível aprimorar as estratégias de recuperação clínica e funcional dos mesmos. Fato este que possibilita ainda maior clareza dos critérios de dosimetria empregados pelos profissionais que se utilizam da sonidoterapia.

Por fim, o maior beneficiado com as respostas encontradas neste estudo será a sociedade, que poderá continuar interagindo com seus animais com maior qualidade de vida, sobretudo para aquele cidadão que necessita de cães para sua locomoção e execução de atividades de vida diária, como os portadores de deficiência visual, cuja saúde do seu cão é essencial para maior precisão e eficiência em suas tarefas.

Diante do exposto, este estudo tem por objetivos: 1) estabelecer critérios metodológicos para o uso de ultrassom pulsátil de baixa intensidade (U.S.P.B.I.) para regeneração de células osteoblásticas; 2) definir parâmetros de dosagem terapêutica do U.S.P.B.I. para regeneração de monocamada osteoblástica *in vitro* quanto ao tempo, à intensidade e à frequência; 3) relacionar os parâmetros utilizados de dosagem terapêutica com o comportamento de Metaloproteinases de Matriz (MMP-2).

## **2- DESENVOLVIMENTO**

### *2.1- Revisão de Literatura*

#### *2.1.1- O Ultrassom*

O ultrassom terapêutico de baixa intensidade (USPBI) é uma ferramenta eletrotermoterapêutica da fisioterapia que utiliza materiais piezoelétricos, como cristais de quartzo, titanatozirconato de chumbo (PZT) e o titanato de bário. Quando esses materiais sofrem exposição de uma tensão elétrica alternada, produzem mudanças contínuas, convertendo-se em fonte de vibrações mecânicas. Um circuito apropriado pode manter uma carga elétrica oscilando constantemente para fazer com que o cristal piezoelétrico mude seu formato na mesma frequência e, assim, mova a placa de metal para frente e para trás também na mesma alta frequência, produzindo um trem de ondas sonoras de compressão em algum meio com que esteja em contato (LOW, J. & REED, A., 2001).

Durante a aplicação, é fornecido um circuito com resistência apropriada para controlar a amplitude das oscilações elétricas que, por sua vez, controla a magnitude da vibração mecânica do cristal e, portanto, a amplitude da onda sonora. Essa amplitude é chamada de intensidade e é a energia que cruza a unidade de área, na unidade de tempo, perpendicular ao feixe sonoro, sendo medida em watts por centímetro quadrado (LOW, J. & REED, A., 2001).

As ondas ultrassônicas podem ser aplicadas por dois métodos conhecidos como contínuo e pulsado, sendo que a diferença entre os modos está na interrupção da propagação das ondas. No contínuo, a voltagem através do transdutor do ultrassom deve ser aplicada continuamente, e seus ciclos de frequência são acima de 100% durante todo o período de tratamento. No pulsado, a voltagem é aplicada em rajadas, com ciclos de frequência menores que 100%. Assim, 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, como exemplo, o tratamento de dor (FREITAS, T.P. et al., 2011).

### 2.1.2- Mecanismos de Interação do Ultrassom com os Tecidos

Experimentos utilizando cultura de células têm demonstrado efeitos do ultrassom no aumento da síntese proteica colágena e não colágena, de acordo com a intensidade de aplicação. Fibroblastos expostos ao ultrassom contínuo (0,5 w/cm<sup>2</sup>) mostraram aumento de 20% na secreção de colágeno que, em comparação com ultrassom pulsado na mesma intensidade, o aumento foi de 30%. A ação do ultrassom sobre os tecidos depende grandemente da intensidade empregada e, por isso, a calibração inadequada pode levar à ineficiência do tratamento ou a produzir novas lesões (JINGUSHI, S.K. et al., 2007).

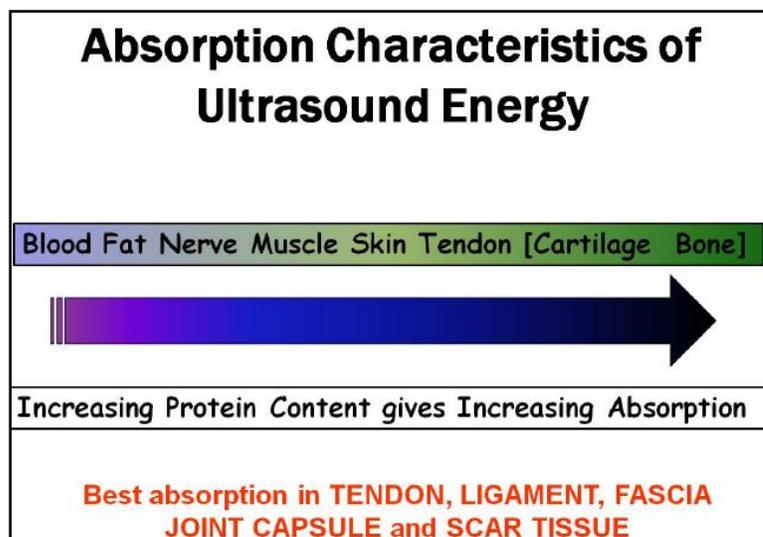


Figura 01: Características da absorção de energia ultrassônica.  
FONTE: WATSON, T., 2013.

A produção de ondas ultrassônicas é um fenômeno físico baseado no processo de criar, aumentar e implodir cavidades de vapor e gases em um líquido, denominado cavitação, promovendo efeitos de ativação em reações químicas. Durante a etapa de compressão, a pressão é positiva, enquanto que a expansão resulta em vácuo, chamado de pressão negativa, constituindo-se em um ciclo de compressão/expansão que gera as cavidades. A origem da cavitação se deve ao fato de que, durante a expansão, os gases absorvidos nos líquidos ao redor da cavidade ou na interface evaporam-se, resultando na expansão da cavidade, podendo provocar

a formação de bolhas ou cavidades micrométricas nos líquidos contendo gás (OLSSON, D.C. et al., 2008).

A perda de energia do feixe de ultrassom nos tecidos é chamada de atenuação e depende tanto da absorção quanto do alastramento. A absorção é em torno de 60-80% da energia perdida do feixe, também podendo ser absorvida em outras regiões. O alastramento é causado por reflexões e refrações que ocorrem entre as interfaces dos tecidos, quando há grande diferença na impedância acústica entre os tecidos moles e o osso (LOW, J. & REED, A., 2001).

### *2.1.3- Mecanismo Térmico*

Durante a absorção das ondas ultrassônicas nos tecidos, a vibração celular e de suas partículas provocam atritos entre as mesmas, produzindo, assim, o efeito térmico, sendo a produção de calor maior nas áreas de músculos e tecidos moles. Os efeitos térmicos são produzidos pelo aquecimento decorrente de um trabalho mecânico dos cristais, sendo esse calor transferido para os tecidos, podendo atingir de 4 a 5 cm de profundidade. Quando uma forma de energia é convertida em outra, o processo não é completamente eficiente e somente parte da energia é convertida em calor dentro do tecido. A quantidade de absorção depende da natureza tissular, do grau de vascularização e da frequência gerada. Tecidos com elevados conteúdos proteicos absorvem mais rapidamente do que aqueles com conteúdo elevado de gordura, e quanto maior a frequência, maior a absorção. Um efeito térmico biologicamente significativo pode ser obtido se a temperatura tecidual for elevada para 40 ou 45°C, durante um mínimo de 5 minutos. O ultrassom térmico causa pouca elevação de temperatura nos tecidos superficiais e tem maior profundidade de penetração na musculatura e em outros tecidos moles do que a diatermia de ondas curtas e micro-ondas (FREITAS, T.P. et al., 2011).

Depois de emitido, o calor é dissipado por difusão térmica e pelo fluxo sanguíneo local, o que pode ser um problema ao tratar locais com restrição de fluxo sanguíneo, tecido de natureza vascular ou uso de prótese metálica, sendo que, neste último caso, a complicação pode ocorrer pela reflexão de 30% que atinge os tecidos moles ao redor (OLSSON, D.C. et al., 2008).

Os efeitos térmicos do ultrassom incluem alívio da dor, da inflamação crônica, inibição dos espasmos musculares e aumento da extensibilidade do colágeno. Esses efeitos são

determinados por diversos fatores, tais como: o tempo de irradiação local; a técnica de aplicação (estacionária ou móvel); as dimensões do corpo aquecido e a presença de superfícies refletoras proximais ou distais ao tecido de interesse. A intensidade da radiação ultrassônica é fator essencial para o sucesso de qualquer terapia (FREITAS, T.P. et al., 2011).

#### 2.1.4- Mecanismo Mecânico (Não Térmico)

O tratamento com efeitos mecânicos envolve a produção de baixos níveis de calor que, possivelmente, sejam convertidos em alterações químicas no interior da célula. No modo de aplicação pulsado, o ultrassom reduz os efeitos térmicos, devido à interrupção cíclica da emissão de energia, mantendo os efeitos biológicos (MITRAGOTRI, S., 2005).

Os efeitos físicos não térmicos desejáveis causam o aumento: da permeabilidade celular, da síntese proteica, do fluxo de íons de cálcio, do reparo ósseo e da passagem de metabólitos através da membrana celular, o que contribui de forma positiva na reparação tecidual e mudanças celulares, alterando o gradiente de concentração das moléculas e íons (cálcio e potássio), estimulando a atividade celular, caso esta vibração ocorra nos limites da membrana com o líquido circunjacente. Esse fenômeno requer um meio elástico e deformável para a sua propagação, o que causa expansão e compressão nos tecidos na mesma frequência de transmissão, produzindo micromassagens teciduais, aumentando a secreção de mastócitos e mobilidade dos fibroblastos (DALECKI, D., 2004).

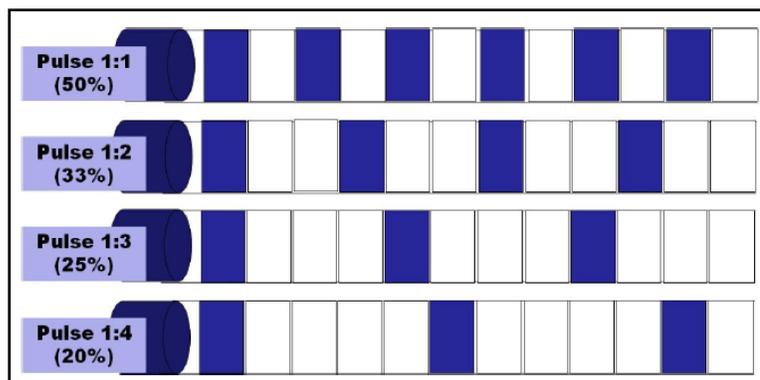


Figura 02: Descrição do percentual de pulso (*duty cycle*) do USPBI.  
FONTE: WATSON, T., 2013

Durante a aplicação no modo pulsado, ocorre um fenômeno denominado cavitação, que consiste em pequenas bolhas gasosas nos tecidos como resultado da vibração do ultrassom, podendo ficar bem maior em algumas circunstâncias, classificando-se em dois tipos, cavitação estável e transitória. A cavitação estável acontece quando as bolhas oscilam de um lado para o outro se mantendo intactas. A cavitação transitória ocorre quando as bolhas aumentam de volume se alterando rapidamente e implodem, mudando a temperatura e causando prejuízo ao tecido (FISHER, B. et al., 2003).

### *2.1.2 - Metaloproteínas de Matrix Extracelular (MMPs)*

As MMPs constituem uma família de endopeptidases estruturalmente relacionadas e dependentes de zinco, que estão entre as principais moléculas envolvidas na reorganização da matriz extracelular (MEC). As MMPs são classificadas de acordo com a especificidade de seu substrato e estrutura de domínios em collagenases, gelatinases, estromelinas e tipo membrana (MT)-MMPs. São produzidas por muitos tipos celulares, incluindo tecidos endoteliais, epiteliais e conectivos, e células hematopoéticas. A estrutura básica do multidomínio das MMPs inclui um domínio amino-terminal, um domínio catalítico e um domínio carboxi-terminal, e seus substratos abrangem uma ampla variedade de proteínas, como moléculas quimiotáticas, moléculas de adesão, inibidores de proteinases, receptores de superfície celular e fatores de crescimento (VON DEN HOFF, J.W. et al., 2005).

Por sua capacidade de modular efetivamente a MEC, MMPs estão envolvidas em processos normais e também em processos patológicos, como invasão tumoral e metástase. Uma variedade de estímulos bioquímicos, incluindo citocinas, fatores de crescimento, hormônios ou componentes da MEC modulam a transcrição de MMPs. Uma vez liberadas das células, a atividade proteolítica é controlada pela ativação de pró-enzimas e inibição de proteases ativadas por inibidores teciduais de MMPs (TIMPs), altamente específicos, frequentemente secretados a partir de células produtoras de MMPs. A regulação da expressão e função de MMPs e de seus inibidores naturais (TIMPs) é essencial para a manutenção da homeostase da matriz extracelular, a degradação tecidual e a migração de células inflamatórias. A interação de MMPs com os TIMPs nestes sítios é, provavelmente, o mecanismo-chave para a regulação da ativação de

MMPs de superfícies celular e, eventualmente, para o controle do fenótipo invasivo das células (VON DEN HOFF, J.W. et al., 2005; KLEIN, T. & BISCHOFF, R., 2010).

Entre a família de MMPs, as colagenases / gelatinases (MMP-2 e MMP-9) não só desempenham um papel importante na migração celular, no remodelamento tecidual e na angiogênese durante o desenvolvimento, mas também, estão envolvidas na progressão de doenças inflamatórias. A significância de gelatinases em processos invasivos é considerada consequência de sua capacidade de degradar o colágeno do tipo IV, o maior componente da membrana basal que, normalmente, representa uma barreira não permeável para células migratórias. A MMP-2 (gelatinase A, 72-kDa) é continuamente expressa em alguns tipos celulares. A MMP-9 (gelatinase B, 92-kDa) é uma enzima induzível, que pode ser expressa em um número de células sob a ação de TNF-alfa, IL-1Beta, PDGF e outros fatores de crescimento (PAGE-MCCAW, A. et al., 2007).

A migração leucocitária é um processo complexo, controlado por um amplo espectro de moléculas de adesão celular, endoteliais e leucocitárias, e pela presença de moléculas quimiotáticas. Estas moléculas, assim como, os fatores de crescimento, são responsáveis pelo estabelecimento de uma migração celular polarizada. A migração de leucócitos é essencial para respostas imunes, reparo tecidual e desenvolvimento embrionário. A motilidade leucocitária é dependente tanto de Beta2-integrinas como de gelatinases, que medeiam a adesão leucocitária e a proteólise necessária para a invasão, respectivamente (VON DEN HOFF, J.W. et al., 2005; KLEIN, T. & BISCHOFF, R., 2010).

### *2.1.3- Inibidores Teciduais de Metaloproteinases de Matriz Extracelular (TIMPs),*

#### *Estrutura e Função*

As TIMPs são proteínas que constituem um sistema proteolítico que participa não apenas de quebra dos componentes da MEC e subsequente remodelamento do tecido, mas também providencia um importante papel regulatório no microambiente celular. Esta família é composta por quatro membros com alta homologia de sequência e identidade estrutural, mas com diferentes expressões teciduais, regulação e características inibitórias (VON DEN HOFF, J.W. et al., 2005; KLEIN, T. & BISCHOFF, R., 2010).

A família das TIMPs de mamíferos é constituída por pequenas proteínas enzimáticas com peso molecular entre 21 e 28 kDa. Estas enzimas são codificadas por genes altamente conservados e têm sobreposições de funções. Elas são compostas basicamente por dois domínios estruturais: um domínio N-terminal, consistindo de seis resíduos de cisteína conservados, formando três pontes de sulfeto, as quais possuem atividade inibitória de MMP e um domínio C-terminal que também contém seis resíduos de cisteína conservados, formando três pontes de sulfeto. Essa família de enzimas apresenta função inibitória contra a maioria das MMPs, com algumas predileções: TIMP-1 que inibe principalmente a MMP-9, e a TIMP-2 que inibe a MMP-2 e, paradoxalmente, contribui para a ativação de pró-MMP-2; e a TIMP-2 inibe a MMP-2 e, paradoxalmente, contribui para a ativação da pró-MMP-2. Isso ocorre após a formação de complexo trimolecular com pró-MMP2 e com a MT1-MMP, também conhecida como MMP-14. A TIMP-3 é a única ligada à matriz extracelular, inibindo várias proteinases responsáveis pela clivagem de ectodomínios de proteínas de membrana, desempenhando, portanto, um importante papel no crescimento e morte celular no reparo tecidual (VON DEN HOFF, J.W. et al., 2005; KLEIN, T. & BISCHOFF, R., 2010).

#### *2.1.4 - Células Ósseas e Mecanismos de Regeneração*

O tecido ósseo pode ser classificado de acordo com as suas características macroscópicas em compacto (cortical) e esponjosas (trabecular). O tecido ósseo compacto apresenta funções mecânicas e de proteção, enquanto o tecido ósseo esponjoso se ocupa das funções metabólicas e funções de suporte relativas ao osso compacto. O tecido ósseo existente é majoritariamente compacto (cerca de 70%). O tecido ósseo compacto diz respeito à diáfise dos ossos longos e à zona externa da maioria dos ossos, situando-se o osso esponjoso no seu interior, no nível das metáfises e epífises dos ossos longos, e na região central da maioria dos ossos planos e irregulares, formando uma rede de trabéculas ósseas (JUNQUEIRA, L.C. & CARNEIRO, J., 2013).

Os ossos longos encontram-se subdivididos em três zonas: a) epífises, que são as extremidades dos ossos longos, constituídas por tecido ósseo esponjoso rodeado por uma fina camada de tecido ósseo compacto, normalmente revestido por cartilagem articular; b) metáfises,

que se encontram entre as finas camadas de cartilagem e a zona intermédia, sendo constituídas por abundante tecido ósseo esponjoso rodeado por tecido ósseo compacto (durante a fase de crescimento, encontram-se separadas das epífises pela placa epifisária de crescimento); c) diáfise, uma estrutura cilíndrica, onde o córtex é constituído por tecido ósseo compacto e a cavidade medular central por medula óssea e algum tecido ósseo esponjoso. A superfície externa do osso é revestida por uma camada fibrocelular constituída por uma membrana de tecido conjuntivo osteogênico, denominada perióstio, apresentando, em sua superfície interna, uma estrutura semelhante, denominada endóstio. A principal função do endóstio e do perióstio é a nutrição do tecido ósseo onde estão presentes osteoblastos, osteoclastos e outras células importantes do metabolismo ósseo, que contribuem significativamente para o processo regenerativo e remodelativo do osso (JUNQUEIRA, L.C. & CARNEIRO, J., 2013).

Em termos microscópicos, o perióstio é formado por uma membrana vascularizada de tecido conjuntivo que apresenta uma camada externa fibrosa, com uma função de suporte e aporte sanguíneo e nervoso à superfície do tecido ósseo compacto, e uma camada interna osteogênica, formada por células osteoprogenitoras, com especial importância no crescimento e regeneração ósseos. O endóstio pode ser considerado como uma camada periférica condensada do estroma da medula óssea e, tal como o perióstio, também possui células osteoprogenitoras e o seu próprio sistema vascular. Apresenta um potencial osteogênico e hematopoético, encontra-se envolvido na regeneração, sendo uma fonte de células osteoprogenitoras capazes de se diferenciarem em osteoblastos e tem ainda a função de restabelecer o suprimento sanguíneo à área em regeneração (JUNQUEIRA, L.C. & CARNEIRO, J., 2013).

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo altamente vascularizado, constituído por células e por uma matriz orgânica firme, enriquecida por depósitos de sais de cálcio, com a característica exclusiva de se mineralizar. A matriz extracelular óssea constitui cerca de 90% do peso total do osso compacto, e é formada por matéria orgânica (30 a 35%) e matéria inorgânica (65 a 70%). Para além das células do tecido ósseo, a matriz apresenta constituintes orgânicos importantes, tais como: colágeno tipo I, V, osteocalcina, proteínas não colagênicas da matriz e constituintes inorgânicos, tais como, compostos de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e de fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) que se depositam sob a forma de cristais de hidroxiapatita  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , bem como, compostos amorfos de fosfato de cálcio (hidrogenofosfato de cálcio -  $\text{CaHPO}_4$ ). São exemplos de proteínas não colagênicas, as glicoproteínas (fosfatase alcalina, osteonectina), os proteoglicanos (biglicano e a decorina) e

os fatores de crescimento, tais como: o fator de transformação de crescimento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), as várias proteínas morfogenéticas ósseas (BMP), o fator de crescimento tipo insulina (IGF), o fator de crescimento fibroblástico (FGF) e o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) (JUNQUEIRA, L.C. & CARNEIRO, J., 2013; DIMITRIOU, R. et al., 2011).

Deste modo, o número de células presentes no tecido ósseo é relativamente pequeno quando comparado com o grande volume de matriz extracelular óssea. A população celular ativa presente neste tecido deriva de duas linhas celulares distintas: células pluripotentes indiferenciadas do mesênquima que, por sua vez, se diferenciam em células de linhagem osteoblástica (osteoblastos, osteócitos e células de revestimento) e células hematopoéticas da medula óssea (células progenitoras de granulócitos e macrófagos, “granulocyte-macrophage colony-forming unit: GM-CFU”) que dão origem aos osteoclastos (DIMITRIOU, R. et al., 2011).

Os osteoblastos, osteócitos e células de revestimento encontram-se localizados no nível da camada interna do perióstio e da medula óssea, na linha osteoprogenitora. Estas células de linhagem osteoblástica são responsáveis pela formação do tecido ósseo durante o desenvolvimento embrionário, o crescimento, a remodelação, a reparação de fraturas ou de qualquer outro defeito ósseo (mesmo quando induzido experimentalmente). Têm origem em células pluripotentes indiferenciadas do mesênquima, também designadas por células pluripotentes do estroma fibroblástico da medula óssea, e possuem grande capacidade de diferenciação, podendo originar vários tipos celulares, tais como: osteoblastos, condroblastos, mioblastos, fibroblastos e adipócitos, dependendo de vários mecanismos de regulação, nomeadamente, de fatores de crescimento. O fator de transformação de crescimento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e as proteínas morfogenéticas ósseas (BMP) têm uma importante função na diferenciação em osteoblastos (UDDIN, S.M.Z. & QIN, Y., 2013).

A linhagem osteoblástica inicia-se com o osteoprogenitor, observando-se uma diferenciação progressiva em pré-osteoblasto, osteoblasto e osteócito. Vários estudos sugerem que o pré-osteoblasto é o precursor do osteoblasto nas regiões de crescimento ósseo. O osteoblasto ativo é caracterizado por possuir uma membrana citoplasmática rica em fosfatase alcalina (FA), receptores para uma variedade de hormonas e fatores de crescimento, sendo responsável pela formação da matriz orgânica, bem como, pela produção de colágeno e proteínas

não colagênicas da matriz extracelular óssea, além da síntese da enzima fosfatase alcalina (FA), necessária para o processo de mineralização (UDDIN, S.M.Z. & QIN, Y., 2013).

O osteócito é considerado a célula terminal e a mais madura da diferenciação celular da linhagem osteoblástica. Esta célula fica rodeada pela matriz óssea, ocupando pequenos espaços no interior do osso, e está ligada às células adjacentes por prolongamentos citoplasmáticos que se situam dentro de canais, através da matriz mineralizada. Outras células derivadas dos osteoblastos são as células de revestimento do tecido ósseo, contudo, estas não estão envolvidas na matriz extracelular óssea. Estas células podem ter um papel importante na diferenciação de células mesenquimatosas, na regulação da homeostasia mineral, inibem a atividade anabólica dos osteoblastos e também parecem influenciar a atividade dos osteoclastos. Estas células de revestimento do tecido ósseo podem produzir colagenase, enzima com capacidade de digerir a matriz orgânica, e preparar a reabsorção osteoclástica (UDDIN, S.M.Z. & QIN, Y., 2013).

Os osteoclastos são células que diferem da linhagem celular dos osteoblastos, uma vez que suas células precursoras presentes no nível da medula óssea são também as responsáveis pela diferenciação nas várias linhas das células hematopoiéticas (monócitos, macrófagos e outros leucócitos presentes no sangue periférico). Estas células apresentam a função de reabsorção do tecido ósseo, em áreas de remodelação ativa, pela degradação enzimática da matriz proteica e dissolução ácida dos minerais da matriz extracelular óssea. Para que o processo de reabsorção ocorra, é fundamental que os osteoclastos repousem diretamente sobre a matriz extracelular óssea mineralizada. Vale salientar que o processo pelo qual os locais de reabsorção óssea são selecionados ainda não é bem conhecido, contudo, sabe-se que o primeiro sinal de um futuro local de reabsorção na superfície do endóstio é a retração das células de revestimento do tecido ósseo pela influência de fatores sistêmicos (como, por exemplo, a hormona da paratireoide - PTH). O estímulo que induz os osteoclastos na reabsorção é mediado por osteoblastos (JUNQUEIRA, L.C. & CARNEIRO, J., 2013).

Para além da reabsorção óssea, os osteoclastos participam na manutenção, a longo prazo, da homeostasia do cálcio sanguíneo, por meio da sua resposta ao hormônio da paratireoide e à calcitonina, desempenhando um papel importante no desenvolvimento e crescimento ósseos, mediante a liberação de fatores de crescimento, a partir da matriz extracelular mineralizada. Deste modo, o tecido ósseo está continuamente num processo de remodelação, adaptando-se e

criando uma estrutura otimizada de forma a suportar as cargas habituais, às quais se encontra sujeito, ou a reparar lesões que possam surgir.

As propriedades plásticas deste tecido tornam-no capaz de se remodelar em resposta a forças externas, apesar da resistência e dureza que o caracterizam. Contudo, o tecido ósseo apresenta outras funções de extrema importância no corpo humano, tais como: 1) Sustentação e proteção: é o esqueleto que serve de apoio às partes moles e órgãos internos vitais e onde se inserem os músculos, ligamentos, tendões necessários à cinética da locomoção; tem função de proteção para o sistema nervoso central (cérebro e canal medular) e para a medula óssea. Esta função torna-se possível devido à existência de uma matriz extracelular mineralizada (matriz orgânica impregnada por cristais inorgânicos de hidroxiapatita), que lhe confere dureza e resistência necessárias, bem como, elasticidade. A proteção da medula óssea (constituída por adipócitos e células da linhagem hematopoiética) deve-se ao fato de esta se situar no interior das cavidades medulares dos ossos. 2) Reserva de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$ : é essencial à realização de grande parte das reações fisiológicas do organismo vivo, uma vez que a manutenção da calcemia deve estar dentro de determinados limites. O tecido ósseo contém 99% do cálcio do organismo e funciona como reserva deste elemento, havendo um intercâmbio constante entre o cálcio do plasma sanguíneo e os ossos. O cálcio é essencial em diversos sistemas enzimáticos, sendo responsáveis pela contração muscular e pela transmissão do impulso nervoso, assim como, em todo o sistema de coagulação (JUNQUEIRA, L.C. & CARNEIRO, J., 2013).

Por todas estas funções de extrema importância para o nosso organismo, o processo de regeneração óssea é fundamental. Para tal, é necessária a indução de células precursoras osteogênicas (presentes na medula óssea), para que exista um número de células capazes de formar o osteoide, uma vez que o seu nível de atividade, no momento da ocorrência de uma fratura, seria incapaz de produzir a quantidade de tecido ósseo necessário para a regeneração nessa área. A regeneração óssea, desde a fase da lesão à remodelação final, envolve uma série de fenômenos (migração, diferenciação, proliferação celular e síntese da matriz extracelular óssea) que se encontra controlada e coordenada pela expressão de genes específicos, por sua vez, induzida por fatores de crescimento e citocinas. Os fatores de crescimento são peptídeos ou glicoproteínas que organizam e coordenam os processos de mitose, quimiotaxia, diferenciação, crescimento e produção de matriz extracelular óssea pelas células. Podem atuar como fatores endócrinos, parácrinos ou autócrinos de forma a ativar receptores específicos da superfície

celular e estimular a atividade celular. Os fatores que atuam ao nível do tecido ósseo podem ser produzidos por células do próprio tecido ósseo, ou por células que se encontram situadas em locais do organismo distantes daquele em que atuam ou que se encontram em estreita associação com a zona do tecido ósseo afetado (DIMITRIOU, R. et al., 2011; LIM K. et al., 2013).

A maioria dos estudos *in vitro* menciona que o TGF- $\beta$  aumenta a expressão dos marcadores de diferenciação osteoblástica, tais como, a fosfatase alcalina, o colágeno tipo I e a osteonectina. A importância do TGF- $\beta$  na regulação da formação do tecido ósseo está demonstrada pela promoção da proliferação dos osteoblastos, estimulação da síntese de colágeno e da potente ação de quimiotaxia. No que diz respeito às proteínas morfogenéticas ósseas, vários estudos demonstraram que estas proteínas estão presentes nas fases iniciais do processo de regeneração das fraturas, difundindo-se na matriz extracelular óssea reabsorvida e induzindo a diferenciação de células osteoprogenitoras na linha osteoblástica. Assim sendo, são importantes fatores de regulação na diferenciação osteogênica durante o processo de regeneração do tecido ósseo (HANKENSON, K. D. et al., 2011).

#### *2.1.5- Estudos Relacionados à Aplicação de Ultrassom de Baixa Intensidade*

Robertson, V.J. & Baker, K.G. (2001), em revisão sistemática sobre a eficiência dos efeitos terapêuticos do ultrassom pulsátil e contínuo, no tratamento da dor e lesões músculo-esqueléticas, descritos em ensaios clínicos randomizados, sugerem que as evidências para uso de ultrassom são fracas. Dos 35 trabalhos investigados, apenas dois possuíam desenho metodológico aceitável. Os autores consideram que o maior problema é encontrar uma dose comum para atingir os efeitos terapêuticos desejados. Essa mesma recomendação foi sugerida na revisão sistemática de Speed, C.A. (2001), na qual o autor destaca ainda a carência de ensaios clínicos com doses específicas para cada tecido a ser tratado.

Rubin, C. et al. (2001), em revisão sistemática sobre as evidências *in vivo* e em ensaios clínicos do uso do ultrassom pulsátil para cicatrização de fraturas, descrevem vários trabalhos que evidenciaram a prática do uso de ultrassom pulsátil no tratamento de fraturas em ratos, coelhos, cachorros e humanos, desde o início da década de 50 até o final da década de 90.

Destaca-se, nos trabalhos listados, uma tendência ao uso de ultrassom pulsátil em doses baixas e com o tempo terapêutico de 20 minutos no modo estacionário.

Busse, J.W. et al. (2002), em estudo de meta-análise, destacaram a dificuldade de encontrar um número consistente de ensaios clínicos randomizados que recomendasse o uso do ultrassom pulsátil para cicatrização de fraturas. Nesse estudo, dos 138 trabalhos revisados, apenas seis possuíam desenhos metodológicos considerados consistentes para recomendar o uso de ultrassom pulsátil. A dificuldade maior dos trabalhos é não apresentar um controle rigoroso das variáveis de confundimento, como a saída efetiva da dose terapêutica, bem como a extensa variação de tempo terapêutico.

Reher, P. et al. (2002), em ensaio *in vitro*, quantificaram um aumento significativo de óxido nítrico e prostaglandina E2 como promotores do aumento da atividade osteoblástica, após a aplicação de ultrassom pulsátil em dosagem que variaram entre  $0.1 \text{ W/cm}^2$  e  $1.0 \text{ W/cm}^2$ , principalmente ao completar 18 horas após a irradiação. Sugerindo, assim, que a vibração mecânica oriunda da energia ultrassônica promove significativo estímulo para produção de osteoblastos.

Carvalho, D.C.L. & Cliquet Jr., A. (2003), com mesma dosagem e tempo de irradiação em ratas osteopênicas, encontraram, em análise histológica, uma menor deterioração microarquitetural do que o grupo não tratado, além da ocorrência de neoformação óssea, a qual não foi observada no grupo-controle.

Wilkin, L.D. et al. (2004), em estudo *in vivo* em ratos após a lesão do músculo gastrocnêmio por contusão, quantificaram os efeitos do ultrassom pulsátil por 5 minutos sobre a massa muscular, concentração total de proteínas e área de secção transversa do músculo. Os resultados encontrados não foram diferentes do músculo-controle contralateral, sugerindo que, de acordo com as variáveis estudadas, o ultrassom não promove efeitos positivos no processo de cura do tecido muscular.

Hayton, J.M. et al. (2005) demonstraram em ensaio *in vitro*, com cultura de células osteoblásticas, que, após diferentes tempos de irradiação ultrassônica, ocorre aumento da atividade adenosina trifosfato (ATP) e da proliferação celular osteoblástica. Fenômeno observado com maior incremento nos tempos de 15 e 40 minutos de irradiação. Ao se aplicar um intervalo de 3 horas em aplicações de 20 minutos, observou-se que o aumento da atividade

celular é maior e que isto poderia justificar o uso do ultrassom, na prática clínica, por 20 minutos.

Qin, L. et al. (2006) demonstraram *in vivo* o aumento significativo da densidade mineral, tamanho e maturação óssea, em coelhos submetidos à patelectomia parcial e irradiação ultrassônica por 20 minutos à intensidade de  $0.3 \text{ W/cm}^2$ , na junção tendão-osso iniciada 3 dias após a cirurgia. Este estudo foi um dos pioneiros a demonstrar aceleração da atividade osteogênica na junção tendão-osso. Em 8 semanas de aplicação diária de ultrassom, a formação de nova massa óssea, a mineralização e a remodelação do tecido apresentaram significativa resposta de crescimento em análise radiográfica, histológica e por meio de tomografia computadorizada.

Tang, C-H. et al. (2006), em estudo *in vitro* com cultura de células osteoblásticas, encontraram aumento significativo de integrinas 3, prostaglandina E2, níveis de proteína e RNA mensageiro oriundos da ciclooxigenase-2, após uma única irradiação de 20 minutos sobre a cultura celular.

Souza, V.L. et al. (2008) recomendaram o uso de ultrassom pulsátil por 20 minutos à dose de  $0.3 \text{ W/cm}^2$  para acelerar, em cães pós-osteotomizados, a regeneração de fraturas em fêmur, rádio, ulna e tibia. Em análise clínica e radiológica, ficou demonstrado que o grupo de cães submetido à irradiação ultrassônica (n=8), por 21 dias, evoluiu clínica e radiologicamente mais rápido e melhor, quando comparado ao grupo de cães-controle (n=8). Fato que corrobora os dados de Romano, C.L. et al. (2008) que, em estudo de revisão sobre estudos *in vitro*, *in vivo* e ensaios clínicos, sugeriram que o ultrassom pulsátil deva ser utilizado para facilitar a regeneração das fraturas que possuem ou não dificuldades de consolidação, com base nos efeitos facilitadores da osteogênese disponíveis nos estudos revisados.

John P.S. et al. (2008), em ensaios consecutivos com fraturas de animais e humanos, respectivamente, utilizaram o mesmo protocolo de ultrassom pulsátil para os grupos experimentais ( $0.3 \text{ W/cm}^2$  por 20 minutos em 10 dias consecutivos) e encontraram sinais radiológicos de formação precoce de calo ósseo, assim como aumento da atividade celular de timidina, sugerindo aumento da atividade osteoblástica no grupo experimental de fraturas em humanos.

Paliwal, S. & Mitragotri, S. (2008), em estudo de revisão, descreveram que, a partir da década de 90, diversos trabalhos *in vitro* e *in vivo* têm apontado o uso do ultrassom pulsátil de

baixa intensidade como significativo estímulo para cicatrização/regeneração de tecidos com grande quantidade de colágeno, como tendões, músculos e ossos. Efeitos de cavitação estável e vibração mecânica modificam o potencial de membrana com consequente aumento da síntese proteica de colágeno. Ao mesmo tempo em que ocorre maior estímulo para chegada de células anti-inflamatórias, para o foco de uma lesão, promove a aceleração da cura do tecido. No que diz respeito à regeneração do tecido ósseo, os autores destacam o uso do ultrassom em fratura com retardo na união, com má união e em fraturas por estresse, promovendo maior atividade osteoblástica, fibroblástica e de monócitos, encontrando-se ainda aumento na produção de citocinas inflamatórias (IL-1b) e fatores que induzem a angiogênese (IL-8, b-FGF e VEGF) e a proliferação celular, produção de colágeno e formação óssea.

A variabilidade metodológica dos estudos citados em meta-análises e revisões sistemáticas aponta para maior variação nos parâmetros de uso da intensidade e do tempo de aplicação, durante o uso do ultrassom com finalidade terapêutica, não havendo uma padronização e/ou critérios bem estabelecidos para a dose terapêutica a ser empregada. Assim sendo, o nível de evidência científica para recomendação do uso de ultrassom pulsátil para regeneração óssea varia entre fraco e moderado, principalmente pela variabilidade dos parâmetros empregados de uso clínico e experimental (BUSSE, J. et al., 2009).

Cheung, W-H. et al. (2010) induziram osteoporose em camundongos (n=30) por ovariectomia, 3 meses após a fratura diafisária de fêmur unilateral. Em seguida, submeteram os animais à irradiação ultrassônica de baixa intensidade por 2, 4 e 8 semanas após a fratura, 5 dias por semana. Ao término de cada período, os animais foram submetidos à eutanásia, e retirados tecidos no foco da fratura para análise histomorfométrica e quantificação de genes de expressão. Além disso, os animais foram avaliados por raio X ao término da 1ª semana de tratamento até a 8ª. Os resultados deste estudo demonstraram maior e melhor qualidade do calo ósseo no grupo submetido à irradiação, bem como, todos os elementos de expressão gênica, tais como, Col-1 e BMP-2, com consequente aumento de 30% do peso e da área de calo ósseo. Foi observada também uma maior formação endocondral quando comparada à do grupo-controle, assim como a formação de VEGF, potencializando a angiogênese no foco da fratura. Esses dados corroboram a ideia de que o ultrassom pulsátil promove a aceleração e regeneração de fratura.

Signori U.L. et al. (2011) avaliaram o efeito do ultrassom de baixa intensidade na dinâmica hematológica após a indução de lesão muscular, em camundongos na fase aguda, e

sugerem que a energia ultrassônica possui um efeito anti-inflamatório que possibilita a aceleração cicatricial do tecido, por aumentar a chegada de células satélites e fatores de crescimento inerentes ao tecido lesionado, e modificar o comportamento da resposta hematológica na fase aguda de uma lesão muscular. Destaca-se, neste estudo citado, o uso de parâmetros dosimétricos muito similares aos que se utilizam na prática clínica,  $0.4 \text{ W/cm}^2$ , com 20% de frequência. O tempo de aplicação, 3 minutos, é que ficou bem distante do recomendado na maioria dos trabalhos revisados, que é de 20 minutos.

Katano, M. et al. (2011) investigaram, em estudo experimental em camundongos, a regeneração da cicatrização óssea e ossificação endocondral pós-fratura fechada, induzida em diáfise de fêmur e com retardo da união. Após a utilização de ultrassom de baixa intensidade por 20 minutos, observaram, por meio de análise radiológica e histológica, maior e mais rápida cicatrização nos fêmures irradiados quando comparados aos não irradiados. Neste estudo, não foi descrito o tempo utilizado, apenas o uso de ultrassom de baixa intensidade que foi compreendida entre  $0.1 \text{ W/cm}^2$  e  $0.7 \text{ W/cm}^2$ .

Albornoz P.M. et al. (2011), em estudo de revisão, descrevem diferentes desenhos experimentais com o uso de ultrassom pulsátil, *in vitro*, *in vivo* e em humanos. Em todos os modelos, existem diferentes hipóteses para justificar os efeitos fisiológicos benéficos do ultrassom. No modelo animal, destaca-se o efeito de regeneração de fraturas caracterizado por uma neoformação óssea abundante e maior resistência tênsil do osso. Em modelos *in vitro*, destaca-se o estímulo à angiogênese pela liberação de VEGF, assim como, a alguns fatores de crescimento nas células osteoblásticas. Nos estudos clínicos, os resultados são controversos devido à grande variedade metodológica em que os mesmos são desenvolvidos. Os dados mais consistentes são aqueles que demonstram que o uso do ultrassom acelera a consolidação de fraturas com retardos na consolidação ou mal consolidadas. Estes dados são corroborados pela revisão sistemática de Costa M.L. et al. (2012).

Kinami Y. et al. (2013) demonstraram, em estudo multicêntrico de coorte, maior e melhor regeneração de fraturas diafisárias de membros inferiores do tipo C bem estabilizadas, quando submetidas ao uso de ultrassom pulsátil, reduzindo em até 30% o período de união do traço de fratura. Praticamente o mesmo percentual encontrado no estudo de Urita, A. et al. (2013), em que o uso de ultrassom pulsátil acelerou a união cortical de fratura de antebraço, tratada com osteotomia, quando comparada à do grupo não irradiado.

Lim, K et al. (2013), em estudo *in vitro* com células tronco mesenquimais alveolares derivadas de osso, encontraram maior concentração de fosfatase alcalina e expressão gênica nas culturas de células submetidas a 10 minutos de ultrassom de baixa intensidade, quando comparada à do grupo-controle.

### 3- MATERIAL E MÉTODO

#### 3.1 - Fase I:

Foi realizado um estudo *in vitro* com cultura de células osteoblásticas humanas (Hob). Para determinar se o USPBI induz, *in vitro*, a proliferação e regeneração das células osteoblásticas, foi aplicada estimulação ultrassônica, uma única vez, em poços de cultura de 60x15mm com os seguintes parâmetros: USPBI de 1MHZ, frequência de 100HZ, taxa de emissão de 10%, tempos de irradiação de 5, 10, 15 e 20 minutos e intensidades em W/cm<sup>2</sup> de: 0.26; 0.52 e 1.0. Para cada tempo de irradiação, foi utilizada a técnica estacionária. Cada combinação de tempo e intensidade irradiada sobre a cultura celular, em suas respectivas placas, teve uma única placa de cultura como grupo-controle durante todo o experimento.

O cabeçote (*probe*) do aparelho USPBI permaneceu imerso horizontalmente e em contato com o meio de cultura celular, de modo a permitir a passagem da onda sonora para o meio e, assim, para as células aderidas no fundo da placa. O cabeçote (*probe*) permaneceu suspenso e em contato com meio de cultura, ficando cerca de 3 a 4 mm de distância das células no fundo da placa. Foi concebido um aparato de suporte para imersão da *probe* no meio de cultura celular, como mostra a Figura 03:

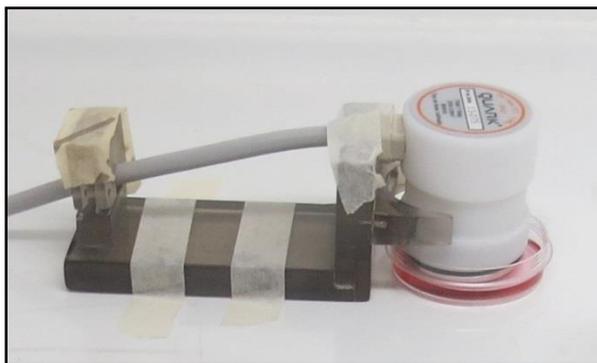


Figura 03: Descrição esquemática da irradiação de ultrassom sobre a cultura de células osteoblásticas.

Inicialmente, foram plaqueadas  $1 \times 10^6/\text{ml}$  células/poço (60x15mm) e, nas primeiras 24 horas, as células permaneceram em 5 ml de meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 1% de gentamicina. Após 24 horas, o meio de cultura foi trocado por 5 ml de meio DMEM, suplementado com 1% SFB e 1% de gentamicina, para a sincronização do ciclo celular. As células na concentração de  $1 \times 10^6/\text{ml}$  e a 1% de SFB foram incubadas *overnight* em estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. No tempo considerado 0 (zero), com um *tip* de uma pipeta de 100 µl, foi provocado um ferimento na porção mediana da camada de células do poço (Figura 04). O ferimento foi fotografado e medido usando-se o *software* Axio Vision Release 4.8.2 nos tempos 0 (zero), 12 e 24 horas, para acompanhamento do fechamento da ferida em microscópio óptico invertido Zeiss, usando objetiva de 5 vezes. Para obter a distância percorrida pelas células, foi usada a seguinte fórmula: Distância final =  $\text{Dist}_{0\text{h}} - \text{Dist}_{12\text{h}}$  e  $\text{Dist}_{0\text{h}} - \text{Dist}_{24\text{h}}$ . Os parâmetros empregados foram realizados em triplicata e escolhida uma micrografia ao acaso, para cada tempo/ intensidade, e análise da regeneração do ferimento. Cada ferimento: controle; 0.26; 0.52 e 1.0 w/cm<sup>2</sup>, nos seus respectivos tempos 5, 10, 15 e 20 minutos, foi submetido a 40 medidas de distância linear entre os seus bordos nos tempos: 0 (zero), 12 e 24 horas (Figura 05). O tempo 0 (zero) foi utilizado para a normalização dos demais tempos, como 100% da distância a ser percorrida, caracterizando a regeneração celular. Para análise estatística dos dados normalizados, foi empregado o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov e, como os mesmos apresentaram uma curva normal, foi empregado o teste de análise da variância com um caminho (ANOVA ONE-WAY) com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ). Para identificar a diferença mínima entre os grupos, foi empregado o teste de Tukey com o mesmo nível de significância.



Figura 04: *tip* de uma pipeta de 100  $\mu$ l utilizado para provocar um ferimento na porção mediana da camada de células de cada poço.

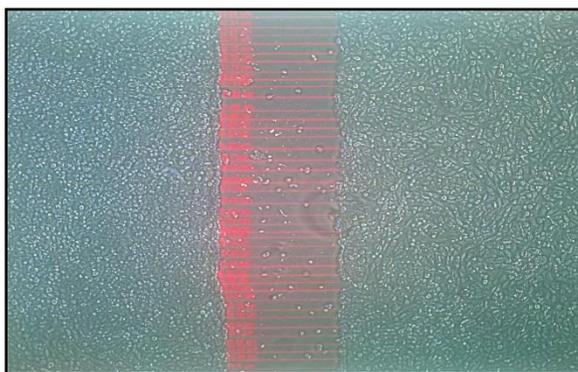


Figura 05: Medidas realizadas no ferimento da monocamada osteoblástica para análise de evolução temporal da regeneração.

### 3.2 - Fase II

Após o plaqueamento e a incubação celular descritos na fase I de estudo, no tempo considerado 0 (zero) e antes de provocar o ferimento nas células aderidas nos poços de cultura, foi coletado 1 ml de sobrenadante para cada poço de irradiação e do poço-controle, com os

respectivos parâmetros utilizados para análise de regeneração: tempo de 5, 10, 15 e 20 minutos e 0.26, 0.52 e 1.0 W/cm<sup>2</sup> de intensidade à taxa de irradiação de 10% de USPBI. Após 12 e 24 horas de aplicação de USPBI sobre o ferimento de cada poço e poço-controle, foram realizadas novas coletas de 1 ml de sobrenadante. Todas as coletas nos seus respectivos tempos, 0 (zero), 12 e 24 horas, foram congeladas a -70°C para análise de zimografia. (Figura 06)



Figura 06: Armazenamento de sobrenadante da cultura de células osteoblásticas.

O sobrenadante coletado foi utilizado para análise de zimografia de MMP-2, seguindo o protocolo: imunoprecipitação das amostras com 15µl de proteína G+ 200 µl de tampão de ligação, centrifugados por 10 minutos a 11.000 rpm e a uma temperatura de 4°C. Após a centrifugação, foi descartado o sobrenadante, e foram incubados 15 µl de anticorpos MMP-2 (rabbitpolyclonal IgG), mantidos por 90 minutos em agitação com velocidade 2.5 rpm. Em seguida, as amostras foram mantidas em *overnight* na geladeira em agitação por 24 horas. Após este período, as amostras incubadas foram submetidas à eletroforese para análise zimográfica. O gel formado foi corrido a 8%: RUNNING (10 ml por gel) e STACK (4 ml por gel) com 0,01% de gelatina, com os seguintes reagentes: Bis Acrilamida (30%), Tris 1,5 M, Tris 0,5 M, SDS, APS, Temed e água destilada. As amostras foram inicialmente centrifugadas por 10 minutos a 4°C e 11.000 rpm e, em seguida, acrescidas de 30 µl de tampão de amostras 1x sem Beta-

mercaptoetanol. Em seguida, foi realizada a eletroforese a 80 volts nos primeiros 40 minutos, e 120 volts até finalizar toda a corrida do gel. (Figuras 7A e 7B)



Figura 7A: colocação de amostras nos poços de gel para realização da eletroforese.

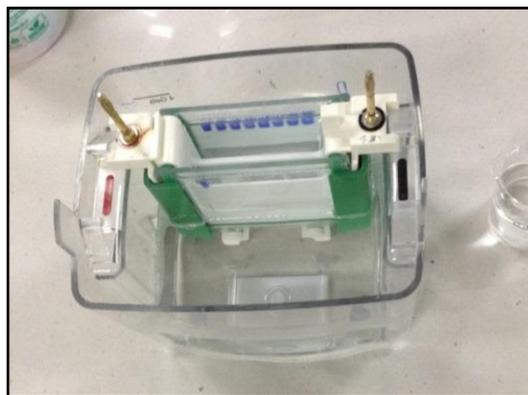


Figura 7B: poços de gel com amostras para realização da eletroforese.

Após a eletroforese, o gel foi mantido no tampão de lavagem para zimografia por 1 hora e 30 minutos e lavado por três vezes com intervalo de 30 minutos. Em seguida, o gel foi incubado com tampão de incubação para zimografia e mantido na estufa por 48 horas a 37°C. Após este período, o gel foi corado com *Coomassie blue* por 30 minutos e lavado com descorante de gel por três vezes. Foi realizado este procedimento em triplicata e as bandas foram analisadas e quantificadas por densitometria, utilizando-se o *software* Image J (Image Processing and Analysis in Java – Image J 1.41).

### 3.3 - Análise estatística

As medidas de distâncias geradas pela análise de Microscopia Óptica Invertida e densitométricas pelo Image J foram analisadas pela ANOVA one way, com nível de significância de  $p < 0,05$ . As diferenças mínimas significantes entre elas foram medidas pelo

teste de Tukey. O *software* empregado para análise estatística foi o GraphPad Prism 5.0 (versão DEMO, GraphPad Prism Software, San Diego, CA, E.U.A).

## **4- RESULTADOS**

### *4.1- Fase I:*

Os resultados encontrados, após análise estatística, indicam que a dose equivalente a  $0.26 \text{ w/cm}^2$  ao tempo de 10 minutos, com taxa de emissão de 10% e frequência de 100 Hz, promoveu maior velocidade na regeneração do ferimento das células osteoblásticas, submetidas a este protocolo, visto que, 12 horas após a irradiação, todo o ferimento estava regenerado. Em seguida, a dose de  $0.52 \text{ w/cm}^2$  ao tempo de 5 minutos, nas mesmas condições de emissão e frequência, também demonstrou eficiência para regeneração, porém, necessitando de um tempo maior, 24 horas após a irradiação. A dose de  $1.0 \text{ w/cm}^2$ , com taxa de emissão de 10% e frequência de 100 Hz, demonstrou ausência de regeneração celular em todas as doses e tempos testados. Figuras 8 (A,B,C,D) e 9 (A,B,C,D).

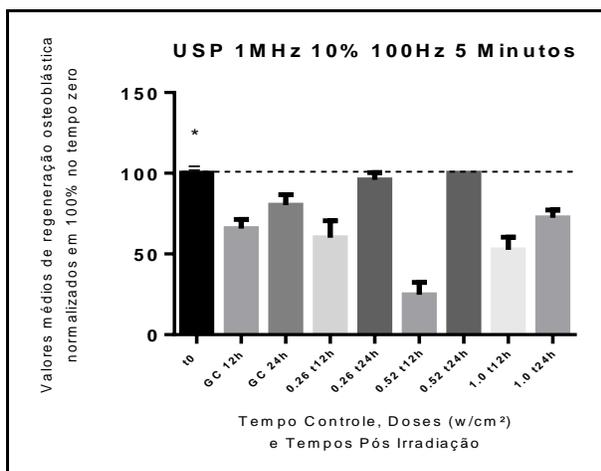


Figura 8A: Valores médios da distância celular percorrida durante a regeneração osteoblástica, normalizados em 100% no tempo-controle igual a t0, após a aplicação da análise de variância (ANOVA one way,  $p < 0,05$ ). \* Quando t0 é igual para a dose 0.52 t24h e diferente para as demais.

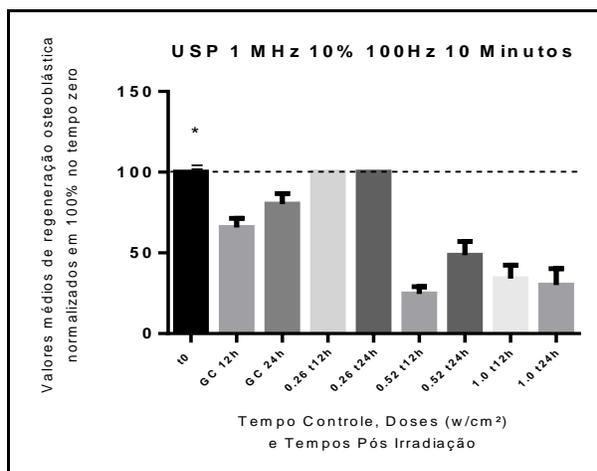


Figura 8B: Valores médios da distância celular percorrida durante a regeneração osteoblástica, normalizados em 100% no tempo-controle igual a t0, após a aplicação da análise de variância (ANOVA one way,  $p < 0,05$ ). \* Quando t0 é igual para a dose 0.26 em t12h e t24h e diferente para as demais.

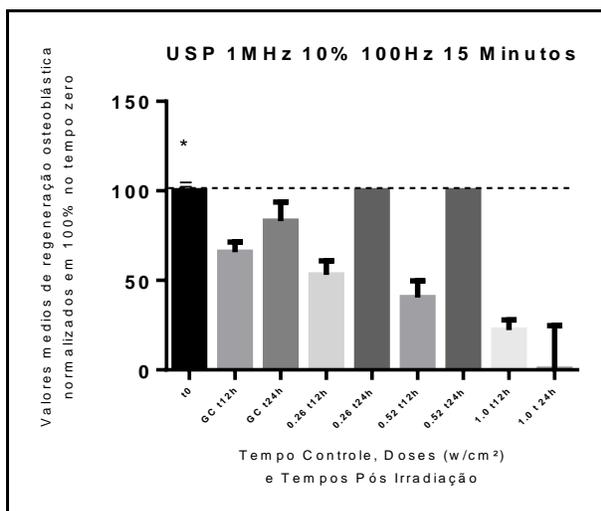


Figura 8C: Valores médios da distância celular percorrida durante a regeneração osteoblástica, normalizados em 100% no tempo-controle igual a t0, após a aplicação da análise de variância (ANOVA one way,  $p < 0,05$ ). \* Quando t0 é igual para a dose 0.26 em t12h e t24h e diferente as demais.

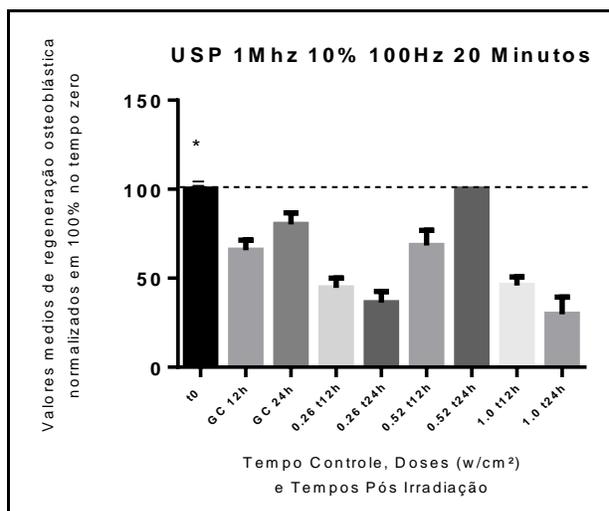
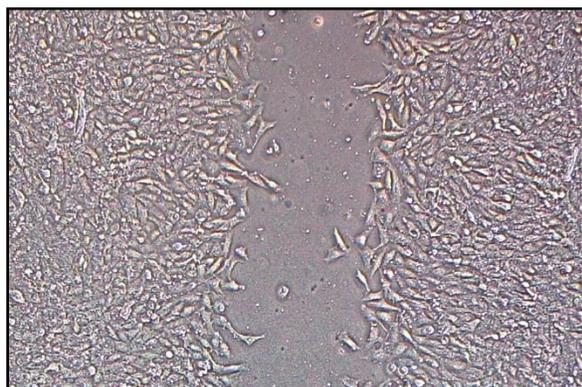
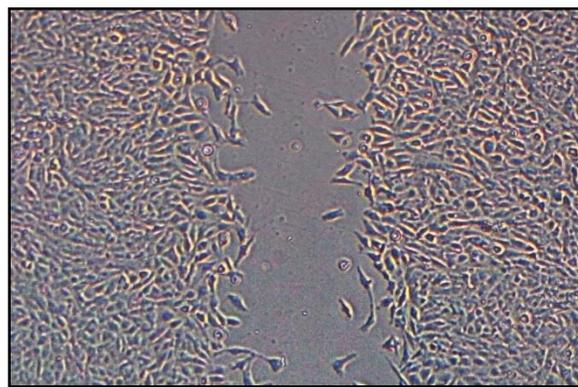


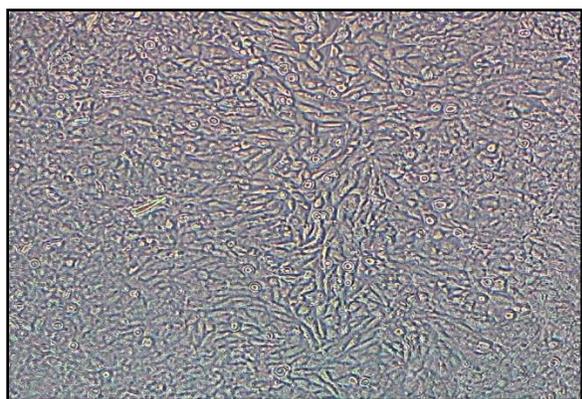
Figura 8D: Valores médios da distância celular percorrida durante a regeneração osteoblástica, normalizados em 100% no tempo-controle igual a t0, após a aplicação da análise de variância (ANOVA one way,  $p < 0,05$ ). \* Quando t0 é igual para a dose 0.52 t24h e diferente para as demais.



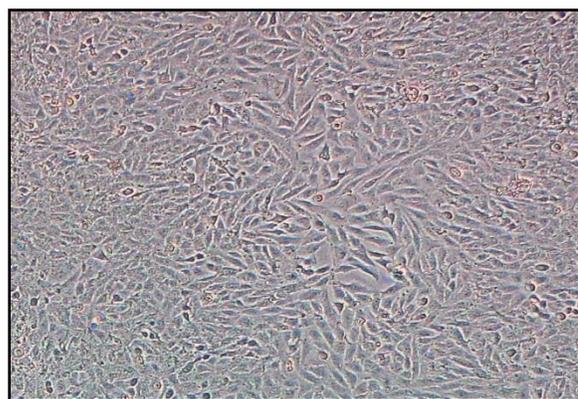
A: Tempo 24h GC



B: 1.0 w/cm² 24h



C: Dose de 0.26 w/cm² 12 horas após a irradiação



D: Dose de 0.52 w/cm² 24 horas após a irradiação

Figura 9: Descrição do processo de regeneração via Microscópio Óptico Invertido. A e B representam exemplos de piores resultados. C e D representam exemplos de melhores resultados. Legenda: CG= Grupo-Controle

#### 4.2 - Fase II

Após a análise das fotos, via Microscopia Óptica Invertida, do processo de regeneração celular nas diferentes doses e tempos de irradiação pelo USPBI, estabeleceram-se, pelo critério de tempo de regeneração e percentual de fechamento do ferimento provocado na monocamada de células osteoblásticas, os melhores e os piores resultados da fase I. Observou-se que, na dose de 0.26 w/cm² de intensidade por 10 minutos de irradiação, ocorreu maior atividade da forma

pró-ativa e ativa de MMP-2, após 12 horas de irradiação, quando comparada à do grupo-controle no mesmo período e quando comparada com as demais intensidades, seja dos melhores e dos piores resultados. Estes dados indicam uma relação entre o fechamento do ferimento em 12 horas e a maior atividade de MMP-2 neste mesmo período. (Figuras 10A e 10B)

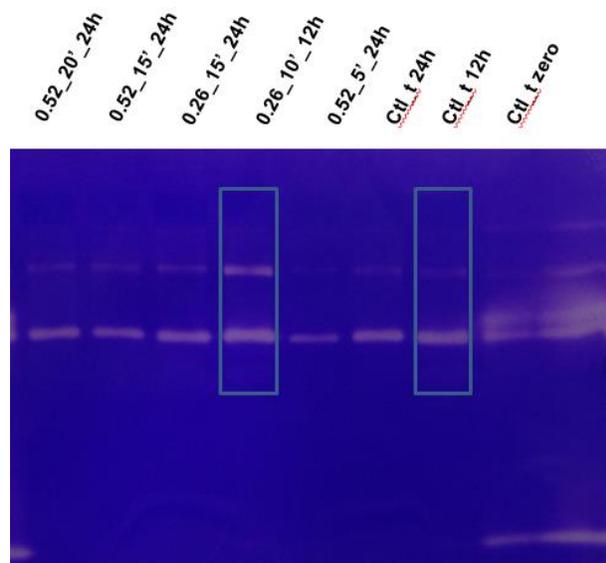


Figura 10A: Análise de zimografia para MMP-2 dos melhores resultados após a análise microscópica. Observa-se maior atividade na forma pró-ativa e ativa a 0.26w/cm<sup>2</sup> por 10 minutos após 12 horas da irradiação.

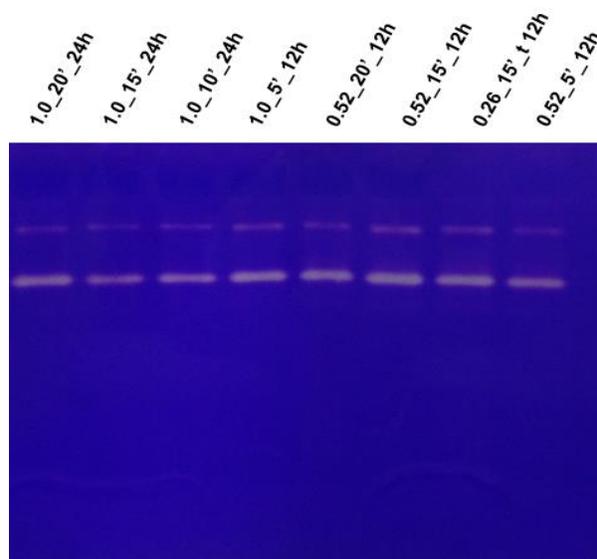


Figura 10B: Análise de zimografia para MMP-2 dos piores resultados após a análise microscópica. Observa-se que não houve maior atividade na forma pró-ativa e ativa em nenhum parâmetro de irradiação quando comparada à do melhor resultado (0.26w/cm<sup>2</sup> por 10 minutos após 12 horas da irradiação).

## 5- DISCUSSÃO

### 5.1 - Fase I:

Os resultados encontrados neste estudo *in vitro* vão ao encontro da maioria dos estudos revisados, *in vitro* e *in vivo*. As evidências descritas até aqui apontam para o uso do ultrassom pulsátil em doses baixas e tempos variados. Nossos melhores resultados apontam que, entre  $0.26\text{w/cm}^2$  e  $0.52\text{ w/cm}^2$  ao tempo de 10 e 5 minutos, respectivamente, obtém-se uma regeneração mais acelerada do ferimento inicialmente realizado na cultura de células osteoblásticas.

Albornoz, P.M. et al. (2011), em estudo de revisão sobre trabalhos *in vitro*, *in vivo* e em humanos, destacam sobre a variabilidade de metodologias empregadas para investigar os efeitos do ultrassom pulsátil de baixa intensidade em que a dose e o tempo são bastante variados, embora a maioria dos trabalhos opte por baixas intensidades e tempos que variam entre 10, 15 e 20 minutos. Este último, principalmente em ensaio clínicos para regeneração óssea pós-fratura em humanos. Estes dados foram corroborados pela revisão sistemática de Costa, M.L. et al. (2012).

Ribeiro, R. et al. (2009) submeteram culturas de células mioblásticas, C2C12, em diferentes parâmetros de ultrassom pulsátil: tempo de terapia entre 2 e 5 minutos, intensidade entre  $0.2$  e  $0.5\text{ w/cm}^2$  e taxa de emissão de 20%, caracterizando parâmetros de baixa dosagem. Após 72 horas de irradiação, não se encontrou diferença na proliferação celular de mioblastos, quando comparada à do grupo-controle. Tang et al. (2006) utilizaram um equipamento de ultrassom pulsátil de 1.5 MHz, com frequência de 1 kHz, intensidade de  $0.3\text{ w/cm}^2$  e 20 minutos de tratamento sobre culturas de células osteoblásticas para avaliar seu efeito sobre a expressão de integrinas na membrana celular e diferenciação osteoblástica. Os parâmetros empregados foram de baixíssima intensidade e os resultados, apesar dos 20 minutos de irradiação, demonstraram um efeito significativo do ultrassom por aumentar a produção de COX2 e promover neoformação osteoblástica via integrinas. Este estudo vai ao encontro de nossos resultados, no que diz respeito à intensidade da dose, porém não ao tempo empregado. Entretanto, o

equipamento utilizado por tais autores difere do empregado em nosso, por este último obter maior penetração e absorção na cultura (1kHz).

De Bem, D.M. et al. (2009), em estudo com ultrassom pulsátil de 3 MHz, sobre a pele sadia de ratos por 2 minutos em diferentes intensidades, 0.5; 1.0; 1.5 e 2.0  $w/cm^2$ , quatro vezes na semana, encontraram lesões inflamatórias promovidas pelas doses mais altas a partir de 1.0, o que sugere que doses mais elevadas, mesmo em ultrassom de menor penetração, 3 MHz, podem promover danos ao tecido, quando comparados aos ocorridos com ultrassom de menor intensidade. Em nosso estudo, 1.0  $w/cm^2$  não promoveu regeneração em nenhum tempo de aplicação realizado, 5, 10, 15 ou 20 minutos. Acredita-se que esta intensidade pode promover um excesso de estímulos mecânicos sobre a cultura celular e provocar danos, ao invés do efeito bioestimulante desejado.

Sousa, V.L. (2008), ao investigarem o efeito do ultrassom de baixa intensidade em fraturas diafisárias de cães (n=16), utilizaram tempo de 20 minutos de irradiação, uma vez ao dia, durante 21 dias, a partir do período pós-operatório, compreendido entre o 1º e o 9º dia. Os resultados deste estudo demonstram que tais parâmetros empregados promoveram uma consolidação óssea mais acelerada no grupo irradiado (n=8), quando comparada à do grupo de cães não irradiados (n=8). Os autores consideraram o ultrassom um recurso adjuvante para consolidação de fraturas diafisárias de cães. Tal conclusão corrobora os dados de Romano, C.L. e colaboradores (2008) que sugerem que o ultrassom pulsátil deve ser utilizado para facilitar a cicatrização das fraturas que possuem ou não dificuldades de consolidação, com base nos efeitos facilitadores da osteogênese disponíveis nos estudos revisados.

O tempo de irradiação utilizado por Alvarenga E.C. et al. (2010) também foi de 20 minutos, cujo objetivo foi verificar o papel estimulante do ultrassom para induzir a liberação de ATP/purinas e aumentar a presença de alguns receptores P2Y, para a proliferação de osteoblastos. O estudo foi realizado em células osteoblásticas de ratos recém-nascidos e com um equipamento de 1.5 MHz e intensidade de 0.3  $w/cm^2$ . Os resultados indicam que as respostas moleculares encontradas são promovidas pelo estímulo mecânico do ultrassom. Olkku, A. et al. (2010), em estudo *in vitro*, para verificar a principal via de sinalização para osteoblastogênese e massa óssea em osteoblastos humanos (MG-63), utilizaram ultrassom de baixa intensidade com taxa de emissão de 20% e frequência de 1 KHz. O tempo de irradiação foi de 10 minutos, e foi constatado que o estímulo promovido pelos parâmetros utilizados estimula a via Wnt que, por

sua vez, promove a proliferação osteoblástica da linhagem estudada. Em nosso estudo, 10 minutos foi o tempo que caracterizou maior eficiência para regeneração celular estudada, o que sugere ser um tempo intermediário consistente a ser aplicado.

Vários estudos em humanos descritos em revisões sistemáticas e meta-análises indicam o uso do ultrassom para promover a regeneração do tecido ósseo pós-fratura. Busse, J.W. et al. (2009), em trabalho de revisão sistemática, consideraram que as evidências científicas para o uso do ultrassom de baixa intensidade no tratamento de fraturas é moderado para baixo e, em alguns casos, os resultados são conflitantes. Miller, D.L. et al. (2012), em estudo de revisão, corroboraram as conclusões de Busse, destacando a perspectiva de maior aprofundamento no uso do ultrassom para regeneração óssea com parâmetros de 20 minutos, 1.5 MHz e 0.3 w/cm<sup>2</sup>. Costa M.L. et al. (2012), em revisão sistemática, não recomendaram o uso de ultrassom pulsátil na rotina de tratamento das fraturas, por não haver consenso nos parâmetros de uso nos ensaios clínicos investigados em 12 estudos, envolvendo 622 participantes.

Nossos dados indicam melhores respostas de regeneração osteoblástica para intensidades menores, 0.26 w/cm<sup>2</sup> e 0.52 w/cm<sup>2</sup> e em tempos que variaram entre 5 e 10 minutos. Estes vão ao encontro das revisões realizadas por Olsson, D.C. et al. (2008); Feitosa, S.M. et al. (2007); Blume, K. et al. (2005) e Parizotto, N.A. et al. (2003). Estes trabalhos destacam diferentes mecanismos fisiológicos que podem fundamentar as respostas de regeneração óssea, seja em fraturas em humanos ou animais ou em estudos *in vitro*. Estes mecanismos foram elucidados por uma revisão mais recente de Albornoz P.A. et al. (2011). Estes autores destacaram os trabalhos com modelo animal que, por meio de radiografia, análise histológica e biomecânica, os animais com fraturas foram submetidos ao ultrassom com baixa intensidade, ocorrendo o reparo acelerado da fratura, maior densidade de calo ósseo, maior dureza óssea e resistência ao torque torsional.

Nos trabalhos *in vitro*, foram destacados os seguintes efeitos promovidos pelo ultrassom: maior atividade celular osteogênica, levando a maior mineralização, produção de colágeno, e maior atividade da fosfatase alcalina nos osteoblastos, assim como, a aceleração da formação óssea periosteal. Ao mesmo tempo, ocorreu maior produção de fatores de crescimento endoteliais (VEGF) essenciais para neoformação óssea. Ao destacarem os efeitos do ultrassom sobre a consolidação de fraturas em humanos, os autores relataram maior rapidez na consolidação,

melhor qualidade do calo ósseo e regeneração óssea, principalmente nas fraturas com retardo na consolidação ou com má união.

Os mecanismos fisiológicos que fundamentam o uso de ultrassom, destacados nos estudos de revisão sistemática ou meta-análises, sugerem que as forças mecânicas promovidas pelo princípio físico piezoelétrico do aparelho levam ao aumento de fluxo sanguíneo no foco da lesão óssea, *in vitro* ou *in vivo*, e esta tem uma aceleração no seu reparo, visto que há evidências de aumento da produção de óxido nítrico e de fatores de crescimento endotelial, essenciais para neoangiogênese e formação osteoblástica. Ao mesmo tempo, há aumento do estímulo de citocinas, IGF e IL-8, nas células periósticas e osteoblásticas, também essenciais para angiogênese. Há ainda maior mobilização de cálcio intracelular, bem como o aumento da produção de proteoglicans, colágeno do tipo II e RNAm. Estes são alguns mecanismos moleculares já elucidados que permitem a utilização do USPBI, seja *in vitro*, *in vivo* ou em humanos. O que ainda parece faltar é uma maior uniformização metodológica dos parâmetros empregados para que o nível de evidência científica seja forte o suficiente para a sua recomendação para a utilização clínica em animais e/ou em humanos. Paliwal, S. & Mitragotri, S. (2008), em estudo de revisão, descreveram que, a partir da década de 90, diversos trabalhos *in vitro* e *in vivo* têm apontado o uso do ultrassom pulsátil de baixa intensidade como significativo estímulo para cicatrização de tecidos com grande quantidade de colágeno, como tendões, músculos e ossos.

Kinami Y. et al. (2013) demonstraram, em estudo multicêntrico de coorte, maior e melhor regeneração de fraturas diafisárias de membros inferiores do tipo C bem estabilizadas, quando submetidas ao uso de ultrassom pulsátil, reduzindo em até 30% o período de união do traço de fratura. Praticamente, este foi o mesmo percentual encontrado no estudo de Urita, A. et al. (2013), no qual o uso de ultrassom pulsátil acelerou a união cortical de fratura de antebraço, tratada com osteotomia, quando comparada à do grupo não irradiado.

Lim, K. et al. (2013), em estudo *in vitro* com células-tronco mesenquimais alveolares derivadas de osso, encontraram maior concentração de fosfatase alcalina e expressão gênica nas culturas de células submetidas a 10 minutos de ultrassom de baixa intensidade, quando comparada à do grupo-controle. Os parâmetros utilizados vão ao encontro dos nossos resultados quanto ao tempo e à baixa intensidade, já que a intensidade empregada pelos autores foi de 0.05 w/cm<sup>2</sup> com taxa de emissão de 20% e 50%. O que corrobora que os parâmetros de menor

intensidade e tempo intermediário favorecem as respostas fisiológicas desejadas, quando se utiliza o ultrassom pulsátil.

### 5.2 - Fase II:

Os resultados encontrados na análise da atividade da MMP-2 após o uso de USPBI na dose de 0.26 w/cm<sup>2</sup> por 10 minutos vão ao encontro do melhor resultado considerado pela análise microscópica óptica invertida, quando ocorreu o fechamento do ferimento após 12 horas de irradiação. Nas demais doses e grupo-controle, não ocorreram tal atividade e fechamento do ferimento. Ribeiro, R. (2009), em estudo com mioblastos (C2C12), analisou a atividade e proliferação genatinolítica de MMP-2 e MMP-9 após a irradiação de ultrassom em diferentes doses e tempos, e não encontrou diferenças entre as mesmas. O tempo de irradiação empregado variou entre 2 e 5 minutos e a intensidade variou entre 0.2 e 0.5 w/cm<sup>2</sup>. Sua taxa de emissão de irradiação foi de 20%. Os parâmetros utilizados pelos autores deste estudo diferem daqueles empregados em nosso estudo, quando foram encontrados melhores resultados de fechamento do ferimento.

O remodelamento da matriz extracelular em condições fisiológicas e patológicas é realizado pela alta atividade das Metaloproteinases de Matriz (MMPs), que compõem uma família de enzimas zinco-dependente que tem a capacidade de regular a composição da matriz (PAGE-MCGRAW, A. et al., 2007; VON DEN HOFF, J.W. et al., 2005). Nossos resultados na dose de 0.26 w/cm<sup>2</sup> por 10 minutos sugerem que o ultrassom, por suas propriedades mecânicas de alta frequência, favoreceu esta resposta fisiológica de recomposição da matriz extracelular, possibilitando o fechamento da monocamada de osteoblastos em apenas 12 horas quando comparado ao dos demais parâmetros utilizados.

Mosig, R.A. et al. (2007) descreveram os primeiros dados, *in vitro* e *in vivo*, sobre o papel das MMP-2 no desenvolvimento ósseo precoce, crescimento e proliferação das células ósseas. Estas passaram a não ser mais consideradas enzimas destrutivas e sim aquelas que podem alterar o microambiente celular, modular a atividade de moléculas bioativas, regular a atividade de outras proteases e, além disso, atuar no papel de proliferação, diferenciação e apoptose celular. Estes dados fisiológicos parecem estar ligados ao efeito bioestimulante do ultrassom em

baixas intensidades ou ao efeito desnaturante, ambos com possibilidade de levar à apoptose celular quando em alta intensidade e por um tempo mais prolongado. Respostas que sugerem justificar o não fechamento do ferimento das monocamadas osteoblásticas de nosso estudo, fase I, na dose de 1.0 w/cm<sup>2</sup> em todos os tempos de irradiação empregados. Ao contrário do que ocorreu nas intensidades de 0.26 w/cm<sup>2</sup> e 0.52 w/cm<sup>2</sup> nos tempos de 10 e 5 minutos, respectivamente. A dose menor levou ao fechamento em 12 horas e a dose maior levou ao fechamento em 24 horas.

Klein, T. & Bischoff, R. (2010), em estudo de revisão, descrevem que as MMP-2 degradam o colágeno na membrana basal vascular em condições fisiológicas ou em condições patológicas e, desta forma, estão envolvidas na neovascularização. O seu estado de ativação parece ser crucial para atuar na angiogênese, sendo sua forma ativa intermediária considerada o estado ideal para promover a formação de novos vasos. Ao mesmo tempo, Albarnoz et al. (2011); Paliwal, S. & Mitragotri, S. (2008) e Cheung, W-H. et al. (2010) descreveram, em diferentes estudos com ultrassom de baixa intensidade, o aumento da produção de VEGF com consequente aumento da angiogênese em células ósseas, seja em condições *in vitro* ou *in vivo*. Ao relacionar estes dados com os nossos resultados, podemos hipotetizar que o aumento da forma pró-ativa e ativa de MMP-2 na dose de 0.26 w/cm<sup>2</sup> pode ser atribuída às respostas fisiológicas descritas acima.

Lieu, S. et al. (2011) demonstraram, em estudo com camundongos submetidos à fratura induzida, que há um retardo da formação de calo ósseo nos primeiros 10 dias pós-fratura na ausência de MMP-2, cuja atividade, nesta fase, é crucial para a remodelação óssea. Considerando que, em nosso estudo, realizamos uma análise numa fase considerada aguda do ferimento, podemos hipotetizar que o uso de USPBI na fase aguda de uma lesão celular óssea, *in vitro* ou *in vivo*, irá favorecer a produção de MMP-2 e, conseqüentemente, facilitar e/ou potencializar a remodelação celular necessária à regeneração da mesma.

## ***6- CONCLUSÕES***

De acordo com a metodologia empregada neste estudo, pode-se concluir que o ultrassom de baixa intensidade promove a regeneração osteoblástica em doses baixas e em tempos intermediários com maior velocidade, quando comparado com o uso de maiores intensidades e tempo mais longos.

As doses baixas, nos tempos intermediários de duração, promovem aumento da atividade de MMP-2, que são essenciais para a manutenção das características fisiológicas e funcionais do tecido ósseo, seja em condições de injúria ou na sua condição de homeostase.

Os resultados encontrados neste estudo estabelecem um protocolo de tratamento que poderá ser aplicado em pequenos animais na prática clínica e, possivelmente, em humanos, para a obtenção de maior eficiência nas respostas clínico-funcionais desejadas.

## 7- REFERÊNCIAS

ALBORNOZ, P.M. et al. The evidence of low-intensity pulsed ultrasound for in vitro, animal and human fracture healing. **British Medical Bulletin**, vol. 100, p. 39-57, 2011.

BUSSE, J.W. et al. The effect of low-intensity pulsed ultrasound therapy on time to fracture healing: a meta-analysis. **Canadian Medical American Journal**, vol. 19, 2002.

BUSSE, W.J. et al. Low intensity pulsed ultrasonography for fractures: systematic review of randomized controlled trials. **Britain Medical Journal**, vol. 338: B351, p. 1-9, 2009.

CARVALHO, D.C.L. & CLIQUET JR., A. Ação do ultrassom de baixa intensidade sobre ossos de ratas osteopênicas. **Atualização Ortopédica Brasileira**, vol. 11, 2003.

CHEUNG, W-H. et al. Low-Intensity pulsed ultrasound accelerated callus formation, angiogenesis, and callus remodeling in osteoporotic fracture healing. **Ultrasound in Medicine & Biology**, vol. 37, n. 2, p. 231-238, 2011.

DALECKI, D. Mechanical bioeffects of ultrasound. **Annu Rev. Biomed. Eng.** vol. 6, p. 229-248, 2004.

DIMITRIOU, R. et al. Bone Regeneration: Current Concepts and Future Direction. **Biomed Central Medicine**, vol. 9. p. 1-10, 2011.

FREITAS, T.P.; FREITAS, L.S. STRECK, E.L. Ultrassom terapêutico no mecanismo da cicatrização: uma revisão. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, vol. 40, n. 1, 2011.

FISHER, B.D; HILLER, C.M; RENNIE, S.G.A. A Comparison of Continuous Ultrasound and Pulsed Ultrasound on Soft tissue Injury Markers in the Rat. **J Phys Ther Sci**, vol. 15, p. 65-70, 2003.

HANKENSON, K.D. et al. Angiogenesis in Bone Regeneration. **Injury**, vol. 42 (6), p. 556-561, 2011.

HAYTON, J.M. et al. Involvement of Adenosine 5 - Triphosphate In Ultrasound-Induced Fracture Repair. **Ultrasound in Medicine & Biology**, vol. 31, n. 8, 2005.

JOHN P.S. et al. Therapeutic ultrasound in fracture healing: The mechanism of osteoinduction. **International Journal Orthopaedic**, vol. 42, n.4, p. 444-447, 2008.

JUNQUEIRA, L.C & CARNEIRO, J. Histologia Básica: texto e atlas, 12 Ed. Guanabara Koogan. RJ. 2013.

JINGUSHI, S.K. et al. Low-intensity pulsed ultrasound treatment for postoperative delayed union or nonunion of long bone fractures. **Journal of Orthopaedic Science**, vol. 12 (1), p. 35-41, 2007.

KATANO, M. et al. Low Intensity Pulsed Ultrasound Accelerates Delayed Healing Process by Reducing the Time Required for the Completion of Endochondral Ossification in the Aged Mouse Femur Fracture Model. **Experimental Animal**, vol. 60, n. 4, p. 385-395, 2011.

KINAMI, Y. et al. Efficacy of low-intensity pulsed ultrasound treatment for surgically managed fresh diaphyseal fracture of the lower extremity: multi-center retrospective cohort study. **Journal of Orthopaedic Science**, vol. 18, p. 410-418, 2013.

KLEIN, T. & BISCHOFF, R. Physiology and Pathophysiology of Matrix Metalloproteinases. **Amino Acids**, vol. 41, p. 271-290, 2011.

LIM, K. et al. In vitro effects of low-Intensity Pulsed Ultrasound Stimulation on the Osteogenic Differentiation of Human Alveolar Bone-Derived Mesenchymal Stem Cells for Tooth Tissue Engineering. **Biology Medicine Research International**, vol. 1, p. 1-15, 2013.

LIEU, S. et al. Impaired Remodeling Phase of Fracture Repair in the Absence of Matrix Metalloproteinase-2. **Disease Models & Mechanisms**, vol. 4, p. 213-211, 2011.

LOW, J.; REED, A. **Eletroterapia Explicada, Princípios e Práticas**. Ed. Manole, 3ª ed., 2001.

MOSIG, R.A. et al. Loss of MMP-2 Disrupts Skeletal and craniofacial development and results in decreased bone mineralization, joint erosion, and defects in osteoblast and osteoclast growth. **Human Molecular Genetic**, vol. 16(9), p. 1113-1123, 2007.

MITRAGOTRI, S. Healing sound: the use of ultrasound in drug delivery and other therapeutic applications. **Nat Rev Drug Discov**, vol. 4, p. 255-260, 2005.

NYMAN, J.S. et al. Differential Effects Between the Loss of MMP-2 and MMP-9 on Structural and Tissue-Level Properties of Bone. **Journal of Bone and Mineral Research**, vol. 26, n. 6, p. 1252-1260, 2011.

OLSSON D.C. et al. Ultrassom Terapêutico na cicatrização tecidual: Revisão Bibliográfica. **Ciência Rural**, vol. 38, n. 4, p. 1190-1207, 2008.

PALIWAL, S. & MITRAGOTRI, S. Therapeutic opportunities in biological responses of ultrasound. **Ultrasonics**, vol. 48, p. 231-238, 2008.

PAGE-MCCAW, A. et al. Matrix Metalloproteinases and Regulation of Tissue Remodeling, **Nature Review Molecular Cell Biology**, vol. 8(3), p. 221-233, 2007.

QIN, L. et al. Low-Intensity pulsed ultrasound accelerates osteogenesis at bone-tendon healing junction. **Ultrasound in Medicine & Biology**, vol. 32, n. 12, p. 1905-1911, 2006.

RIBEIRO, R. et al. Efeito do ultrassom terapêutico pulsado na proliferação e atividade gelatinolítica de células musculares. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Nove de Julho - UNINOVE. São Paulo, 2009.

ROBERTSON, V.J. & BAKER, K.G.A Review of Therapeutic Ultrasound: Effectiveness Studies. **Physical Therapy**, vol. 81, n. 7, p. 1339- 1350, 2001.

RUBIN, C. et al. The Use of Low-Intensity Ultrasound to Accelerate the Healing of Fractures. **The Journal of Bone & Joint Surgery**, vol. 83-A, n. 2, p. 259-270, 2001.

REHER, P. et al. Ultrasound Stimulates Nitric Oxide and Prostaglandin E2 Production by Human Osteoblasts. **Bone**, vol. 31, n. 1, p. 236-241, 2002.

SPEED, C.A. Therapeutic Ultrasound in soft tissue lesions. **Reumatology**, vol. 40, p. 1331-1336, 2001.

SOUZA, V. L. et al. Ultrassom pulsado de baixa intensidade em fraturas diafisárias: aplicação clínica em cães. **Ciência Rural**, vol. 38, n. 4, p. 1030-1037, 2008.

SIGNORI U.L. et al. Haematological effect of pulsed ultrasound in acute muscular inflammation in rats. **Physiotherapy**, vol. 97, p. 163-169, 2011.

TANG, C.H. et al. Ultrasound Stimulates Cyclooxygenase-2 Expression and Increases Bone Formation through Integrin, Focal Adhesion Kinase, Phosphatidylinositol 3-Kinase, and Akt Pathway in Osteoblasts. **Molecular pharmacology**, vol. 69, n. 6, p. 2047-2057, 2006.

UDDIN, S.M.Z et al. Enhancement of Osteogenic Differentiation and Proliferation in Human Mesenchymal Stem Cells by a Modified Low Intensity Ultrasound Stimulation Under Simulated Microgravity. **PLOS ONE**, vol. 8(9), p. 73914, 2013.

VON DEN HOFF, J.W. et al. Zimographic Techniques for the Analysis of Matrix Metalloproteinases and their Inhibitors. **BioTechniques**, vol. 38, p. 73-83, 2005.

WATSON, T. **Therapeutic Ultrasound**. Disponível em:  
<<http://www.electrotherapy.org/assets/Downloads/Therapeutic%20Ultrasound%202013.pdf>

WILKIN, L.D. et al. Influence of therapeutic Ultrasound on Skeletal muscle regeneration following blunt contusion. **International Journal Sports Medicine**, vol. 25, p. 73-77, 2004.

## **8- ANEXOS**

### **8.1 - ARTIGO I (Submetido à Revista Ciência Rural)**

**Regeneração de monocamadas osteoblásticas lesionadas *in vitro* após o tratamento com ultrassom pulsátil de baixa intensidade**

**Osteoblastic monolayer regeneration after low-intensity pulsed ultrasound treatment *in vitro***

**Jefferson da Silva<sup>I</sup>, Kaciane LopesFerreira<sup>II</sup>, Thais RiguetiBrasil<sup>III</sup>, Andrea C. Veto Arnholdt<sup>IV</sup>, AntonioPeixoto Albernaz<sup>V</sup>.**

#### ***RESUMO***

O objetivo deste estudo foi definir parâmetros de dosagem terapêutica do ultrassom pulsátil de baixa intensidade (USPBI) para regeneração de células osteoblásticas quanto ao tempo e à intensidade. Foi aplicada irradiação uma vez ao dia em diferentes tempos, 5, 10, 15 e 20 minutos em três intensidades, 0.26, 0.52 e 1.0 w/cm<sup>2</sup>. O equipamento de USPBI utilizado foi de 1 MHz, 10% de emissão (*duty cycle*) e 100 Hz de frequência. Foram plaqueadas 1x10<sup>6</sup> células/poço (placas de 60x15 mm), e as células permaneceram em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) com 1% Soro Fetal Bovino - SFB e 1% de gentamicina para sincronização do ciclo celular. Para análise dos resultados, utilizamos a análise de variância

(ANOVA one way) com nível de significância de  $p < 0,05$ . Os resultados encontrados indicam que a dose equivalente a  $0.26 \text{ w/cm}^2$  ao tempo de 10 minutos promove maior velocidade na regeneração do ferimento das células osteoblásticas, visto que, em 12 horas após a irradiação, todo o ferimento regenerou-se, podendo-se sugerir que o USPBI promove a regeneração osteoblástica com maior velocidade em intensidades baixas e em tempos intermediários, quando comparado com o uso de maior intensidade e tempos mais longos. Os resultados nos abre a possibilidade de serem utilizados em pequenos animais ou, até mesmo, em humanos, para que possamos obter maior eficiência nas respostas clínicas e funcionais desejadas.

**PALAVRAS-CHAVE:** Dosagem, Osteoblastos e Lipus

### ***ABSTRACT***

The aim of this study was to define parameters of therapeutic dosage of low-intensity pulsed ultrasound (USPBI) for regeneration of osteoblastic cells as: time and intensity. Irradiation was applied once a day at different times (5, 10, 15 and 20 minutes) in three levels, 0.26, 0.52 and  $1.0 \text{ W / cm}^2$ . The equipment used was USPBI of 1MHz, 10% of emissions (duty cycle) and 100Hz frequency.  $1 \times 10^6$  cells / well (60x15mm dishes) were seeded and the cells remained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) with 1% FBS and 1% gentamycin for synchronization of the cell cycle was plated. We employed analysis of variance (one-way ANOVA) with a significance level of  $p < 0.05$ . The results indicate that the dose equivalent to  $0.26 \text{ W/cm}^2$  to 10 minute time promotes higher speed in the regeneration of the wound by osteoblastic cells because after 12 h a complete wound healing was observed. We can suggest that USPBI promotes osteoblast proliferation in vitro systems of wound healing at higher speed and lower intensities and intermediate times of regeneration. The results obtained open up the

prospect of applying this protocol to small animals or humans, in order to you can achieve greater efficiency in the desired clinical and functional responses.

Keywords: dosage, osteoblasts and lipus.

<sup>I</sup> Programa de pós-graduação em Ciência Animal, laboratório de Sanidade Animal, hospital veterinário da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro-RJ, Brasil. E-mail: [jsfisiot@gmail.com](mailto:jsfisiot@gmail.com) Autor para correspondência

<sup>II</sup> Programa de iniciação científica da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

<sup>III</sup> Programa de pós-graduação em Biociências e Biotecnologia, laboratório de Biologia do Reconhecer da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro-RJ, Brasil.

<sup>IV</sup> Programa de pós-graduação em Biociências e Biotecnologia, Chefe do laboratório de Biologia do Reconhecer da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro-RJ, Brasil

<sup>V</sup> Programa de pós-graduação em Ciência Animal, Chefe do laboratório de Sanidade Animal, Hospital Veterinário da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro-RJ, Brasil

## INTRODUÇÃO

O Ultrassom Pulsátil de Baixa Intensidade (USPBI) é uma modalidade terapêutica mundialmente conhecida e utilizada clinicamente para a cura dos tecidos lesionados, principalmente aqueles que possuem maior quantidade de colágeno, tendão e osso (WATSON T, 2013; BUSSE, J. et al., 2009).

Hayton, J.M. et al. (2005); Qin, L. et al. (2006) demonstraram *in vivo* o aumento significativo da densidade mineral, tamanho e maturação óssea, em coelhos submetidos às patelectomia parcial e irradiação ultrassônica por 20 minutos à intensidade de 0.3 W/cm<sup>2</sup>, na junção tendão/osso iniciada 3 dias após a cirurgia. Este estudo foi um dos pioneiros a demonstrar aceleração da atividade osteogênica na junção tendão/osso. Em 8 semanas de aplicação diária de ultrassom, a formação de nova massa óssea, a mineralização e a remodelação do tecido apresentaram significativas respostas de crescimento em análise radiográfica, histológica e por meio de tomografia computadorizada.

Signori U.L. et al. (2011) avaliaram o efeito do ultrassom de baixa intensidade na dinâmica hematológica após a indução de lesão muscular em camundongos na fase aguda e sugerem que a energia ultrassônica possui um efeito anti-inflamatório que possibilita a aceleração cicatricial do tecido, por aumentar a chegada de células-satélites e fatores de

crescimento inerentes ao tecido lesionado e por modificar o comportamento da resposta hematológica na fase aguda de uma lesão muscular. Destacam-se, neste estudo, o uso de parâmetros dosimétricos muito similares aos utilizados na prática clínica,  $0.4 \text{ W/cm}^2$ , com 20% de frequência. O tempo de aplicação, 3 minutos, é que ficou bem distante do recomendado na maioria dos trabalhos revisados, que é de 20 minutos.

Katano, M et al. (2011) investigaram, em estudo experimental em camundongos, a evolução da cicatrização óssea e ossificação endocondral pós-fratura fechada induzida em diáfise de fêmur e com retardo da união. Após a utilização de ultrassom de baixa intensidade por 20 minutos, observaram, por meio de análise radiológica e histológica, maior e mais rápida cicatrização nos fêmures irradiados quando comparada à dos não irradiados. Neste estudo, não foi descrito a intensidade utilizada, apenas descrito o uso de ultrassom de baixa intensidade que é compreendida entre  $0.1 \text{ W/cm}^2$  e  $0.7 \text{ W/cm}^2$ .

Diante da variabilidade dos parâmetros terapêuticos descritos na literatura empregados para regeneração de células osteoblásticas e do tecido ósseo, por meio do uso de ultrassom pulsátil, este estudo pretende identificar quais as doses terapêuticas de ultrassom pulsátil são mais indicadas para regeneração tecidual, definindo tempo de aplicação e intensidade de emissão em sistemas *in vitro* de regeneração de monocamada osteoblástica.

## ***MATERIAL E MÉTODOS***

Foi realizado um estudo *in vitro* com cultura de células osteoblásticas humanas (Hob). Para determinar se o USPBI induz, *in vitro*, a proliferação e a regeneração das células osteoblásticas, foi aplicada estimulação ultrassônica uma única vez em poços de cultura de  $60 \times 15 \text{ mm}$ , com os seguintes parâmetros: USPBI de 1MHZ, frequência de 100HZ, taxa de emissão de 10% e 20%, tempos de irradiação de 5, 10, 15 e 20 minutos e intensidades em  $\text{W/cm}^2$

de: 0.26; 0.52 e 1.0. Para cada tempo de irradiação, foi utilizada a técnica estacionária. Todas as combinações de tempo e intensidade irradiadas, sobre a cultura celular em suas respectivas placas, tiveram uma única placa de cultura como a do grupo-controle, durante todo o experimento.

O cabeçote (*probe*) do aparelho USPBI permaneceu imerso horizontalmente e em contato com o meio de cultura celular, de modo a permitir a passagem da onda sonora para o meio e, assim, para as células aderidas ao fundo da placa. O cabeçote (*probe*) permaneceu suspenso e em contato com meio de cultura, ficando cerca de 3 a 4 mm de distância das células do fundo da placa.

Inicialmente, foram plaqueadas  $1 \times 10^6$  células/poço (placas de petri: 60 x 15 mm) e, nas primeiras 24 horas, as células permaneceram em 5 ml de meio DEMEM com 10% de Soro Fetal Bovino - SFB e 1% de gentamicina. Após 24 horas, o meio de cultura foi trocado por 5 ml de meio DEMEM suplementado com 1.0% SFB e 1% de gentamicina para a sincronização do ciclo celular. As células na concentração de  $1 \times 10^6$  e a 1% de SFB foram incubadas *overnight* em estufa a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. No tempo considerado 0 (zero), com um tipo de uma pipeta de 100 µl foi provocado um ferimento na porção mediana da camada de células do poço. O ferimento foi fotografado e medido, usando o *software* Axio Vision Release 4.8.2, nos tempos 0 (zero) hora, 12 horas e 24 horas, para o acompanhamento do fechamento da ferida em Microscópio Óptico Invertido Zeiss, usando objetiva de 5 vezes. Para obter a distância percorrida pelas células, foi usada a seguinte fórmula: Distância final = Dist<sub>0h</sub> - Dist<sub>12h</sub> e Dist<sub>0h</sub> - Dist<sub>24h</sub>. Os parâmetros empregados foram realizados em triplicata e escolhida uma micrografia ao acaso, para cada tempo/intensidade, para análise da regeneração do ferimento. Cada ferimento, controle, 0.26; 0.52 e 1.0 w/cm<sup>2</sup>, nos seus respectivos tempos 5, 10, 15 e 20 minutos, foi submetido a 40

medidas de distância linear entre os seus bordos, nos tempos 0 (zero) hora, 12 horas e 24 horas. O tempo 0 (zero) foi utilizado para normalização dos demais tempos, como 100% da distância a ser percorrida, caracterizando a regeneração celular. Para análise estatística dos dados normalizados, foi empregado o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov e, como os mesmos apresentaram uma curva normal, foi empregado o teste de análise da variância com um caminho (ANOVA one-way), com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ). Para identificar a diferença mínima entre os grupos, foi empregado o teste de Tukey com o mesmo nível de significância.

## **RESULTADOS**

Os resultados encontrados, após a análise estatística, indicam que a dose equivalente a  $0.26 \text{ w/cm}^2$  ao tempo de 10 minutos, com taxa de emissão de 10% e frequência de 100 Hz, promoveu maior velocidade na regeneração do ferimento das células osteoblásticas submetidas a este protocolo, visto que, em 12 horas após a irradiação, todo o ferimento estava regenerado. Em seguida, a dose de  $0.52 \text{ w/cm}^2$  ao tempo de 5 minutos, nas mesmas condições de emissão e frequência, também demonstrou eficiência para regeneração, porém, necessitando de um tempo maior, 24 horas após a irradiação. A dose de  $1.0 \text{ w/cm}^2$ , com taxa de emissão de 10% e frequência de 100 Hz, demonstrou ausência de regeneração celular em todas as doses e tempos testados. (Figura 1A,B,C,D).

## **DISCUSSÃO**

Os resultados encontrados neste estudo *in vitro* vão ao encontro da maioria dos estudos revisados, *in vitro* e *in vivo*. As evidências descritas até aqui, apontam para o uso do ultrassom pulsátil em doses baixas e tempos variados. Nossos melhores resultados apontam que entre

0.26w/cm<sup>2</sup> e 0.52 w/cm<sup>2</sup> ao tempo de 10 e 5 minutos respectivamente, obtém-se uma regeneração mais acelerada do ferimento realizado na cultura de células osteoblásticas.

Albornoz, P.M. et al. (2011), em estudo de revisão sobre trabalhos *in vitro*, *in vivo* e em humanos, destacam sobre a variabilidade de metodologias empregadas para investigar os efeitos do ultrassom pulsátil de baixa intensidade, no qual a dose e o tempo são bastante variados, mas com a maioria dos trabalhos optando para as baixas intensidades e tempos que variam entre 10, 15 e 20 minutos. Em relação a este último tempo, ocorreu principalmente em ensaio clínicos para regeneração óssea pós-fratura em humanos. Estes dados foram corroborados pela revisão sistemática de Costa M.L. et al. (2012).

Ribeiro, R. (2009) submeteu culturas de células mioblásticas, C2C12, em diferentes parâmetros de ultrassom pulsátil: tempo de terapia entre 2 e 5 minutos, intensidade entre 0.2 e 0.5 w/cm<sup>2</sup> e taxa de emissão de 20%, caracterizando parâmetros de baixa dosagem. John, P.S. et al. (2008), em ensaios consecutivos com fraturas de animais e humanos, utilizaram 0.3 W/cm<sup>2</sup> por 20 minutos em 10 dias consecutivos. Tang et al. (2006) utilizaram um equipamento de ultrassom pulsátil de 1,5 MHz, com frequência de 1 kHz, intensidade de 0.3 w/cm<sup>2</sup> e 20 minutos de tratamento sobre culturas de células osteoblásticas, para avaliar seu efeito sobre a expressão de integrinas na membrana celular e diferenciação osteoblástica. Os parâmetros de intensidade destes trabalhos vão ao encontro dos nossos parâmetros, porém o tempo varia entre 2 e 20 minutos.

De Bem, D.M. et al. (2009), em estudo com ultrassom pulsátil de 3 MHz, sobre a pele sadia de ratos por 2 minutos, em diferentes intensidades, 0.5; 1.0; 1.5 e 2.0 w/cm<sup>2</sup> por 2 minutos, quatro vezes na semana, encontraram lesões inflamatórias promovidas pelas doses mais altas a partir da intensidade 1.0. Este fato sugere que doses mais elevadas, mesmo em ultrassom de

menor penetração, 3 MHz, podem promover danos ao tecido, quando comparados aos ocorridos em doses de menor intensidade. Em nosso estudo, a intensidade  $1.0 \text{ w/cm}^2$  não promoveu regeneração em nenhum tempo de aplicação realizado, 5, 10, 15 ou 20 minutos. Acredita-se que esta intensidade pode promover um excesso de estímulos mecânicos sobre a cultura celular e provocar danos, em vez do efeito bioestimulante desejado.

Sousa, V.L. (2008), ao investigar o efeito do ultrassom de baixa intensidade em fraturas diafisárias de cães (n=16), utilizou tempo de 20 minutos de irradiação, uma vez ao dia, durante 21 dias, a partir do período pós-operatório, compreendido entre o 1º e o 9º dia. Os resultados deste estudo demonstram que tais parâmetros empregados promoveram uma consolidação óssea mais acelerada no grupo irradiado (n=8), quando comparada à do grupo de cães não irradiados (n=8). Os autores consideraram o ultrassom um recurso adjuvante para consolidação de fraturas diafisárias de cães, o que corrobora os dados de Romano, C.L. e colaboradores (2008). O tempo de irradiação utilizado por Alvarenga E.C. et al. (2010) também foi de 20 minutos e  $0.3 \text{ w/cm}^2$ , para verificar o papel estimulante do ultrassom para induzir a liberação de ATP/purinas e aumentar a presença de alguns receptores P2Y para a proliferação de osteoblastos.

Olkku, A. et al. (2010), em estudo *in vitro* para verificar a principal via de sinalização para osteoblastogênese e massa óssea em osteoblastos humanos (MG-63), utilizaram ultrassom de baixa intensidade com taxa de emissão de 20% e frequência de 1 KHz. O tempo de irradiação foi de 10 minutos, e foi constatado que o estímulo promovido pelos parâmetros utilizados estimula a via Wnt que promove proliferação osteoblástica da linhagem estudada. Em nosso estudo, 10 minutos foi o tempo que caracterizou maior eficiência para regeneração celular estudada, o que sugere ser um tempo intermediário consistente para aplicação.

Vários estudos em humanos, descritos em revisões sistemáticas e meta-análises, indicam o uso do ultrassom para promover a regeneração do tecido ósseo pós-fratura, como os de Busse, J.W. et al. (2009); Miller D.L. et al. (2012). Entretanto, Costa M.L. et al. (2012), em revisão sistemática, em 12 estudos, envolvendo 622 participantes, não recomendaram o uso de ultrassom pulsátil na rotina de tratamento das fraturas, por não haver consenso nos parâmetros de uso nos ensaios clínicos investigados.

Nossos dados indicam melhores respostas de regeneração osteoblástica para intensidades menores,  $0.26 \text{ w/cm}^2$  e  $0.52 \text{ w/cm}^2$  e em tempos que variaram entre 5 e 10 minutos. Estes dados vão ao encontro das revisões realizadas por Olsson, D.C. et al. (2008); Feitosa, S.M. et al. (2007); Blume, K. et al. (2005); Parizotto, N.A. et al. (2003); Paliwal, S. & Mitragotri, S. (2008) e Farcicet, et al. (2013). Estes trabalhos destacam diferentes mecanismos fisiológicos que podem fundamentar as respostas de regeneração óssea, seja em fraturas em humanos ou animais ou em estudos *in vitro*.

Nos trabalhos *in vitro*, foram destacados os seguintes efeitos promovidos pelo ultrassom: 1) há maior atividade celular osteogênica, levando a maior mineralização, produção de colágeno, e maior atividade da fosfatase alcalina nos osteoblastos, assim como a aceleração da formação óssea periostal; 2) ocorre maior produção de fatores de crescimento endoteliais (VEGF), essenciais para neoformação óssea.

Os mecanismos fisiológicos que fundamentam o uso de ultrassom destacados nos estudos de revisão sistemática ou meta-análises sugerem que: 1) as forças mecânicas promovidas pelo princípio físico piezoelétrico que possui o aparelho levam ao aumento de fluxo sanguíneo no foco da lesão óssea, *in vitro* ou *in vivo*, e esta sofre uma aceleração no seu reparo, já que há evidências de aumento da produção de óxido nítrico e fatores de crescimento endotelial,

essenciais para a neoangiogênese e formação osteoblástica; 2) há aumento do estímulo de citocinas, IGF e IL-8 nas células periósticas e osteoblásticas, também essenciais para a angiogênese; 3) há maior mobilização de cálcio intracelular, bem como aumento da produção de proteoglicans, colágeno do tipo II e RNAm.

Estes são alguns mecanismos moleculares já elucidados, que permitem a utilização do USPBI, seja *in vitro*, *in vivo* ou em humanos. O que ainda parece faltar é uma maior uniformização metodológica dos parâmetros empregados para que o nível de evidência científica seja forte o suficiente para sua recomendação clínica em animais e/ou em humanos.

Kinami Y. et al. (2013) demonstraram, em estudo multicêntrico de coorte, maior e melhor regeneração de fraturas diafisárias de membros inferiores do tipo C bem estabilizadas, quando submetidas ao uso de ultrassom pulsátil, reduzindo em até 30% o período de união do traço de fratura. Este foi praticamente o mesmo percentual encontrado no estudo de Urita, A. et al. (2013), no qual o uso de ultrassom pulsátil acelerou a união cortical de fratura de antebraço, tratada com osteotomia, quando comparada à do grupo não irradiado.

Lim, K. et al. (2013), em estudo *in vitro* com células tronco mesenquimais alveolares derivadas de osso, encontraram maior concentração de fosfatase alcalina e expressão gênica nas culturas de células submetidas a 10 minutos de ultrassom de baixa intensidade, quando comparada à do grupo-controle. Os parâmetros utilizados vão ao encontro dos nossos resultados quanto ao tempo e à baixa intensidade, visto que a intensidade empregada pelos autores foi de 0.05 w/cm<sup>2</sup> com taxa de emissão de 20% e 50%, corroborando a ideia de que os parâmetros de menor intensidade e tempo intermediário favorecem as respostas fisiológicas desejadas, quando se utiliza o ultrassom pulsátil.

## **CONCLUSÕES**

De acordo com a metodologia empregada neste estudo, pode-se concluir que o ultrassom de baixa intensidade promove a regeneração osteoblástica em doses baixas e em tempos intermediários com maior velocidade, quando é comparado com os de maiores intensidades e tempos mais longos. Os resultados encontrados neste estudo estabelecem um protocolo de tratamento que poderá ser aplicado em pequenos animais na prática clínica e, possivelmente, em humanos, para a obtenção de maior eficiência nas respostas clínico-funcionais desejadas.

## **AGRADECIMENTOS:**

À Professora Andrea Cristina V. Arnholdt, por ceder o laboratório de Biologia do Reconhecer (LBR) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro e participar da coorientação da pesquisa; e às agências de fomento e pesquisa CAPES/CNPq, pelo financiamento de parte do trabalho realizado.

## **REFERÊNCIAS**

- ALBORNOZ, P.M. et al. The evidence of low-intensity pulsed ultrasound for in vitro, animal and human fracture healing. **British Medical Bulletin**, vol. 100, p. 39-57, 2011.
- ALVARENGA, E.C. et al. Low-intensity pulsed ultrasound-dependent osteoblast proliferation occurs by via activation of the P2Y receptor: Role of the P2Y1 receptor. **Bone**, vol. 46, p. 355-362. 2010.
- BLUME, K. et al. Dosimetria proposta para o tratamento por ultrassom: uma revisão de literatura. **Fisioterapia em Movimento**, vol. 18, n. 3, p. 55-64, 2005.

BUSSE, W.J. et al. Low intensity pulsed ultrasonography for fractures: systematic review of randomized controlled trials. **Britain Medical Journal**, vol. 338: B351, p. 1-9, 2009.

COSTA, M.L. et al. Ultrasound and Shockwave Therapy for acute fracture in adults (Review). The Cochrane Collaboration and the published in Cochrane Library, 2012, Issue 2.

CHEUNG, W.H. et al. Low-Intensity pulsed ultrasound accelerated callus formation, angiogenesis, and callus remodeling in osteoporotic fracture healing. **Ultrasound in Medicine & Biology**, vol. 37, n. 2, p. 231-238, 2011.

DE BEM, D.M. et al. Análise histológica em tecido epitelial sadio de ratos Wistar (in vivo) irradiados com diferentes intensidades do ultrassom. **Revista Brasileira de Fisioterapia**. Vol. 14, n. 2, p. 114-120, 2010.

FARCIC, T.S. Treatment time of ultrasound therapy interferes with the organization of collagen fibers in rat tendons. **Brazilian Journal of Physical Therapy**. Vol. 17(3), p. 263-271, 2013.

FEITOSA S.M. et al. Os efeitos osteogênicos do ultrassom e do laser terapêutico de baixa intensidade no processo de consolidação de fraturas: uma revisão bibliográfica. **Fisioterapia Especialidades**, vol. 1, n. 1, p. 44-49, 2007.

HAYTON, J.M. et al. Involvement of Adenosine 5<sub>′</sub>-Triphosphate In Ultrasound-Induced Fracture Repair. **Ultrasound in Medicine.& Biology**, vol. 31, n. 8, p. 1131-138, 2005.

JOHN P.S. et al. Therapeutic ultrasound in fracture healing: The mechanism of osteoinduction. **International Journal Orthopaedic**. vol. 42, n. 4, p. 444-447, 2008.

KATANO, M. et al. Low Intensity Pulsed Ultrasound Accelerates Delayed Healing Process by Reducing the Time Required for the Completion of Endochondral Ossification in the Aged Mouse Femur Fracture Model. **Experimental Animal**, vol. 60, n. 4, p. 385-395, 2011.

KINAMI, Y. et al. Efficacy of low-intensity pulsed ultrasound treatment for surgically managed fresh diaphyseal fracture of the lower extremity: multi-center retrospective cohort study. **Journal of Orthopaedic Science**, vol. 18, p. 410-418, 2013.

LIM, K. et al. In vitro effects of low-Intensity Pulsed Ultrasound Stimulation on the Osteogenic Differentiation of Human Alveolar Bone-Derived Mesenchymal Stem Cells for Tooth Tissue Engineering. **Biology Medicine Research International**, vol. 1, p. 1-15, 2013.

MILLER, D.L. et al. Overview of Therapeutic Ultrasound Applications and Safety Considerations. **Journal of Ultrasound in Medicine**, vol. 31, p. 623-634, 2012.

OLSSON D.C. et al. Ultrassom Terapêutico na cicatrização tecidual: Revisão Bibliográfica. **Ciência Rural**, vol. 38, n. 4, p. 1190-1207, 2008.

OLKKU A. et al. Ultrasound-induced activation of Wnt signaling in human MG-63 osteoblastic cells. **Bone**, vol. 47, p. 320-330, 2010.

PALIWAL, S. & MITRAGOTRI, S. Therapeutic opportunities in biological responses of ultrasound. **Ultrasonics**, vol. 48, p. 231-238, 2008.

PARIZOTTO, N.A. et al. Utilização da fonoforese em desordens músculo-esqueléticas: uma meta-análise. **Revista Brasileira de Fisioterapia**. Vol. 17, n. 1, p. 9-15, 2003.

QIN, L. et al. Low-Intensity pulsed ultrasound accelerates osteogenesis at bone-tendon healing junction. **Ultrasound in Medicine & Biology**, vol. 32, n. 12, p. 1905-1911, 2006.

ROMANO, C.L. et al. Low- Intensity Pulsed Ultrasound for the treatment of bone delayed union or nonunion: A Review. **Ultrasound in Medicine & Biology**, vol. 35, n. 4, p. 529-536, 2008.

SOUZA, V.L. et al. Ultra-som pulsado de baixa intensidade em fraturas diafisárias: aplicação clínica em cães. **Ciência Rural**, vol. 38, n. 4, p. 1030-1037, 2008.

SIGNORI U.L. et al. Haematological effect of pulsed ultrasound in acute muscular inflammation in rats. **Physiotherapy**, vol. 97, p. 163-169, 2011

TANG. C-H. et al. Ultrasound Stimulates Cyclooxygenase-2 Expression and Increases Bone Formation through Integrin, Focal Adhesion Kinase, Phosphatidylinositol 3-Kinase, and Akt Pathway in Osteoblasts. **Molecular pharmacology**, vol. 69, n. 6, p. 2047-2057, 2006.

URITA, A. et al. Effect of Low-Intensity Pulsed Ultrasound on Bone Healing at Osteotomy Sites After Forearm Bone Shortening. **The Journal of Hand Surgery**, vol. 38A, p. 498-503, 2013.

WATSON, T. **Therapeutic Ultrasound**. Disponível em:

<<http://www.electrotherapy.org/assets/Downloads/Therapeutic%20Ultrasound%202013.pdf>

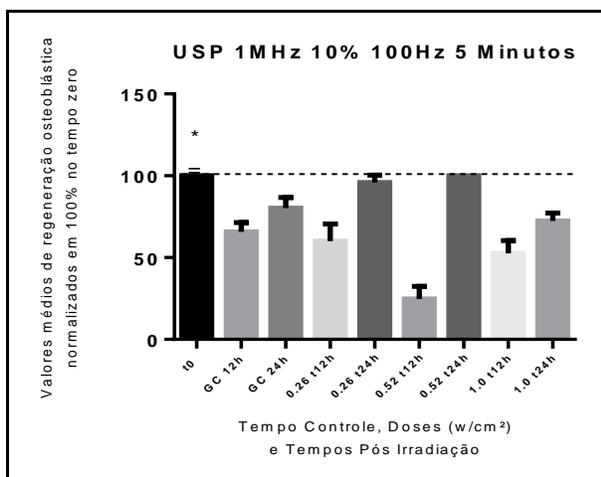


Figura 1A: Valores médios da distância celular percorrida durante a regeneração osteoblástica, normalizados em 100% no tempo controle igual a t0, após aplicada a análise de variância (ANOVA one way,  $p < 0,05$ ). \* quando t0 é diferente dos demais, exceto para a dose 0.52 t24h (= quando igual).

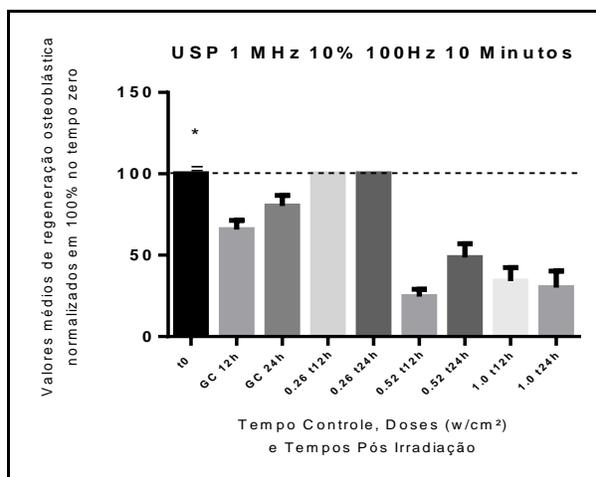


Figura 1B: Valores médios da distância celular percorrida durante a regeneração osteoblástica, normalizados em 100% no tempo controle igual a t0, após aplicada a análise de variância (ANOVA one way,  $p < 0,05$ ). \* quando t0 é diferente dos demais, exceto para a dose 0.26 em t12h e t24h (= quando igual).

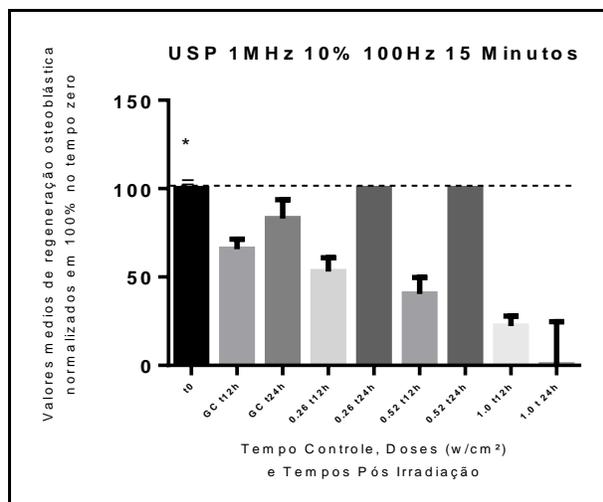


Figura 1C: Valores médios da distância celular percorrida durante a regeneração osteoblástica, normalizados em 100% no tempo-controle igual a t0, após aplicada a análise de variância (ANOVA two way,  $p < 0,05$ ). \* quando t0 é diferente dos demais, exceto para as doses 0.26 t24h e 0.52 t24h (= quando igual).

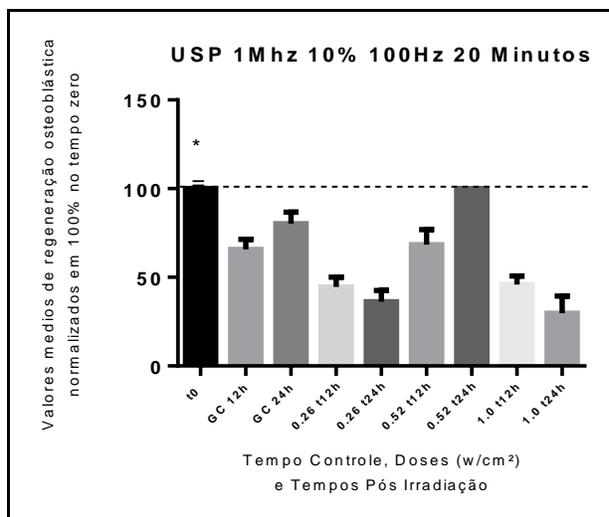
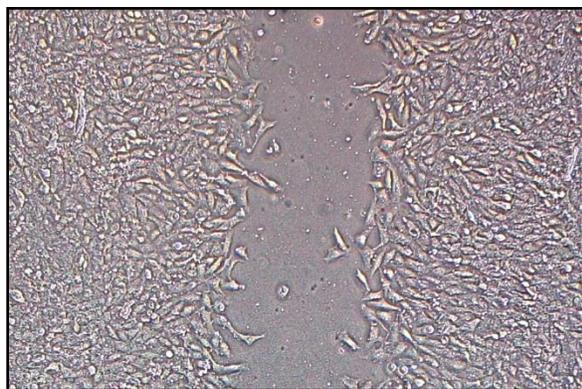
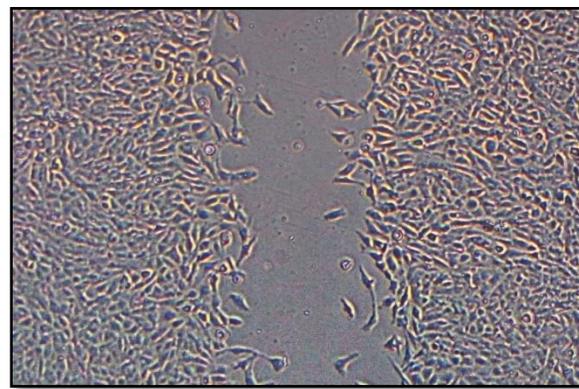


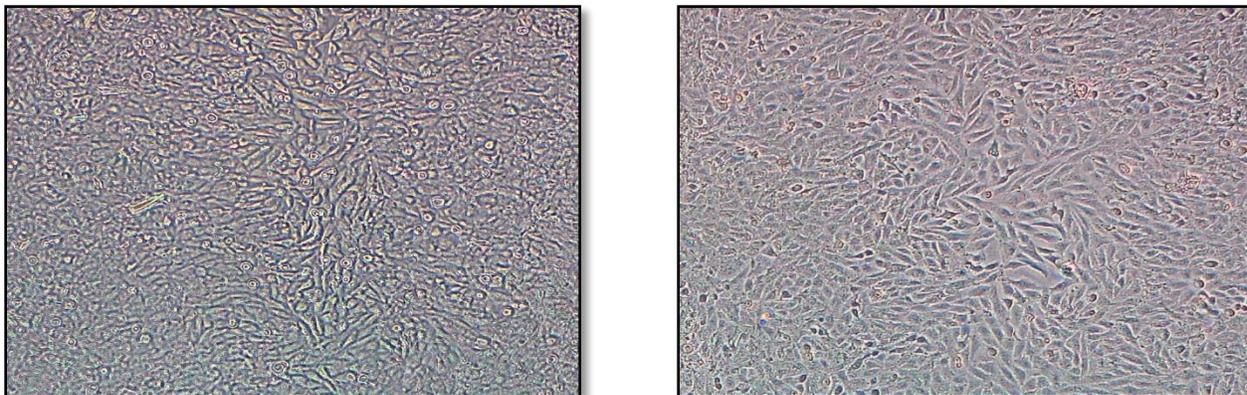
Figura 1D: Valores médios da distância celular percorrida durante a regeneração osteoblástica, normalizados em 100% no tempo-controle igual a t0, após aplicada a análise de variância (ANOVA two way,  $p < 0,05$ ). \* quando t0 é diferente dos demais, exceto para a dose 0.52 t24h (= quando igual).



A: Tempo 24h GC



B: Tempo 24h GC



D:

C: Dose de  $0.26 \text{ w/cm}^2$  12 horas após a irradiação      Dose de  $0.52 \text{ w/cm}^2$  24 horas após a irradiação

Figura 2: Descrição do processo de regeneração via microscópio confocal. A e B representam exemplos de piores resultados. C e D representam exemplos de melhores resultados. Legenda:

CG= Grupo-Controle

## 8.2 - ARTIGO II (A submeter)

**Ultrassom pulsátil de baixa intensidade aumenta a produção de Metaloproteinases de Matriz (MMP-2) durante a regeneração de monocamadas osteoblásticas lesionadas *in vitro*.**

**Low-Intensity Pulsed Ultrasound improve the production of Matrix Metalloproteases (MMP-2) during the regeneration of monolayer osteoblast injury *in vitro***

**Jefferson da Silva<sup>I</sup>, Kaciane LopesFerreira<sup>II</sup>,Thais RiguetiBrasil<sup>III</sup>, Andrea C. Veto Arnholdt<sup>IV</sup>, AntonioPeixoto Albernaz<sup>V</sup>.**

**RESUMO**

Os objetivos deste estudo foram: estabelecer critérios metodológicos para o uso de ultrassom pulsátil de baixa intensidade (USPBI) para regeneração de monocamada osteoblástica *in vitro*; definir parâmetros de dosagem terapêutica quanto ao tempo, à intensidade e à frequência, e relacionar os parâmetros utilizados de dosagem terapêutica com o comportamento de Metaloproteinases de Matriz (MMP-2). Utilizamos cultura *in vitro* de osteoblastos para determinar se o USPBI induz a proliferação destas células. Foi aplicada irradiação uma vez ao dia em diferentes tempos, 5, 10, 15 e 20 minutos em três intensidades, 0.26, 0.52 e 1.0 w/cm<sup>2</sup>. O equipamento de USPBI utilizado foi de 1 MHz, 10% de emissão (*duty cycle*) e 100 Hz de frequência. Foram plaqueadas 1x10<sup>6</sup> células/poço (placas de 60x15mm), e as células permaneceram em meio RPMI 1640 com 1% SFB e 1% de gentamicina para sincronização do ciclo celular. Após 24 horas, foi provocado um ferimento na porção mediana da camada de células de cada poço por meio de um *tip* de uma pipeta de 100 µl, sendo um controle e os demais equivalentes aos tempos e a intensidades irradiadas. O ferimento foi fotografado e medido por meio de microscopia óptica invertida e do *software* Axio Vision Release 4.8.2. nos tempos 0 (zero), 12 e 24 horas após a irradiação. As distâncias dos bordos do ferimento foram medidas pelo mesmo *software*, normalizadas a 100% no tempo 0 (zero) e comparadas nos tempos 12 e 24 horas. Para tanto, foi empregada a análise de variância (ANOVA two way) com nível de significância de  $p < 0,05$ . Os melhores e os piores resultados de fechamento do ferimento, após a irradiação do USPBI, foram submetidos à zimografia para quantificação das MMP-2. Os resultados encontrados, após análise estatística, indicam que a dose equivalente a 0.26 w/cm<sup>2</sup> ao tempo de 10 minutos, com taxa de emissão de 10% e frequência de 100 Hz promoveu maior velocidade na regeneração do ferimento das células osteoblásticas, submetidas a este protocolo, visto que, em 12 horas após a irradiação, todo o ferimento estava regenerado. Em seguida, a dose de 0.52 w/cm<sup>2</sup> ao tempo de 5 minutos, nas mesmas condições de emissão e frequência, também demonstrou eficiência para regeneração, porém, necessitando de um tempo maior, 24 horas após

a irradiação. A dose de  $1.0 \text{ w/cm}^2$ , com taxa de emissão de 10% e frequência de 100 Hz, demonstrou ausência de regeneração celular em todas as doses e tempos testados. Observou-se que, na dose de  $0,26 \text{ w/cm}^2$  de intensidade por 10 minutos de irradiação, ocorreu maior atividade da forma pró-ativa e ativa de MMP-2, após 12 horas de irradiação, quando comparada à do grupo-controle no mesmo período e quando comparada à das demais intensidades, seja dos melhores resultados e dos piores resultados. Estes achados indicam uma relação entre o fechamento do ferimento em 12 horas e maior atividade de MMP-2 neste mesmo período. De acordo com a metodologia empregada neste estudo, pode-se concluir que o ultrassom de baixa intensidade promove a regeneração osteoblástica em doses baixas e em tempos intermediários com maior velocidade, quando comparada à das maiores intensidades e tempo mais longos. As doses baixas nos tempos intermediários de duração promovem aumento da atividade de MMP-2 que são essenciais para manutenção das características fisiológicas e funcionais do tecido ósseo, seja em condições de injúria ou na sua condição de homeostase. Os resultados encontrados, neste estudo, estabelecem um protocolo de tratamento que poderá ser aplicado em pequenos animais na prática clínica e, possivelmente, em humanos, para a obtenção de maior eficiência nas respostas clínico-funcionais desejadas.

## ABSTRACT

The objectives of this study was: to establish methodological criteria for the use of pulsed low-intensity ultrasound (LIPUS) for regeneration of osteoblast monolayer in vitro; define parameters of therapeutic dosage as to time, intensity, and frequency and relate the parameters used in therapeutic dosage to the behavior of matrix metalloproteinases (MMP-2). Used in vitro culture of osteoblasts to determine whether the LIPUS induces proliferation of these cells. Irradiation was applied once daily at different times 5, 10, 15 and 20 minutes in three levels, 0:26, 0:52 and  $1.0 \text{ W/cm}^2$ . The equipment used was USPBI of 1 MHz, 10% of emissions (duty cycle) and 100 Hz frequency.  $1 \times 10^6$  cells / well (plates  $60 \times 15 \text{ mm}$ ) and the cells remained in RPMI 1640 with 1% FCS and 1% gentamycin for synchronization of the cell cycle was plated. After 24 hours, a wound was caused in the middle portion of the cell layer in each well using a pipette tip  $100 \mu\text{l}$  of one control and other equivalents to the irradiation times and intensities. The wound was photographed and measured by inverted light microscopy and Axio Vision release 4.8.2 software at zero, 12 and 24 hours after irradiation time. The distances of the edges of the wound were measured by the same software, normalized to 100% at time zero and compared in time 12 and 24 hours. Therefore, we employed analysis of variance (ANOVA two way) with a significance level of  $p < 0.05$ . The best and the worst results of wound closure after irradiation LIPUS were subjected to zymography for quantification of MMP-2. The results, after statistical analysis, indicate that the equivalent to  $0.26 \text{ W/cm}^2$  at the time of 10 minutes with emission rate of 10% and frequency of 100Hz dose promoted greater speed in the regeneration of the wound of osteoblastic cells subjected to this protocol, for 12 hours after irradiation, all wound was regenerated. Then the dose  $0.52 \text{ w/cm}^2$  to time of 5 minutes under the same conditions of issue and often also demonstrated efficiency for regeneration, however, requiring a longer time, 24 hours after irradiation. The dose of  $1.0 \text{ w/cm}^2$  with emission rate of 10% and frequency of 100Hz, showed absence of cellular regeneration at all doses and times tested. It was observed that at a dose of  $0.26 \text{ w/cm}^2$  intensity for 10 minutes of irradiation was increased activity of pro-

active and active form of MMP2, after 12 hours of irradiation, when compared to the control group in the same period and compared with the other intensities, is the best of the worst results and outcomes. These findings indicate a relationship between wound closure at 12 hours and increased activity of MMP-2 in the same period. According to the methodology employed in this study it can be concluded that low intensity ultrasound promotes osteoblastic regeneration at low doses and at intermediate times higher speed compared to higher intensities and longer time. Low doses in the intermediate duration times promote increased activity MMP-2 that are essential for maintenance of physiological and functional characteristics of bone tissue, either in terms of injury or condition in its homeostasis. The results of this study establish a treatment protocol that can be applied in small animal clinical practice, and possibly in humans, for achieving greater efficiency in the desired clinical and functional responses.

**Keywords:** dosage, osteoblasts, lipus.

I Programa de pós-graduação em Ciência Animal, laboratório de Sanidade Animal, hospital veterinário da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro-RJ, Brasil. E-mail: [jsfisiot@gmail.com](mailto:jsfisiot@gmail.com) Autor para correspondência

II Programa de iniciação científica da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

III Programa de pós-graduação em Biociências e Biotecnologia, laboratório de Biologia do Reconhecer da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro-RJ, Brasil.

IV Programa de pós-graduação em Biociências e Biotecnologia., Chefe do laboratório de Biologia do Reconhecer da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro-RJ, Brasil

V Programa de pós-graduação em Ciência Animal, Chefe do laboratório de Sanidade Animal, hospital veterinário da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro-RJ, Brasil

## INTRODUÇÃO

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo altamente vascularizado que é constituído por células e por uma matriz orgânica firme, enriquecida por depósitos de sais de cálcio, com a característica exclusiva de se mineralizar. A matriz extracelular óssea constitui cerca de 90% do peso total do osso compacto, e é formada por matéria orgânica (30 a 35%) e matéria inorgânica (65 a 70%).

A matriz óssea apresenta constituintes orgânicos principais tais como, colágeno tipo I, V, osteocalcina, proteínas não colagênicas da matriz e constituintes inorgânicos, tais como, compostos de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e de fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) que se depositam sob a forma de cristais de hidroxiapatita  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , bem como, compostos amorfos de fosfato de cálcio (hidrogenofosfato de cálcio ( $\text{CaHPO}_4$ )). São exemplos de proteínas não colagênicas, as

glicoproteínas (fosfatase 12 alcalina, osteonectina), os proteoglicanos (biglicano e a decorina) e os fatores de crescimento, tais como: o fator de transformação de crescimento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), as várias proteínas morfogenéticas ósseas (BMP), o fator de crescimento tipo insulina (IGF), o fator de crescimento fibroblástico (FGF) e o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF). (JUNQUEIRA, L.C. & CARNEIRO, J., 2013; DIMITRIOU, R. et al., 2011)

As MMPs constituem uma família de proteases (endopeptidases) dependentes de zinco, e são as principais moléculas envolvidas no remodelamento da matriz extracelular em condições fisiológicas ou em processos patológicos. O papel das MMPs em processos fisiológicos normais, dentre vários eventos fisiológicos no remodelamento ósseo, vem sendo descrito em diferentes estudos *in vitro* e *in vivo*. Este papel é desempenhado principalmente pelas MMP-2 e 9. A perda de MMP-2 pode levar a um decréscimo na mineralização óssea, erosão articular e defeitos no crescimento osteoblástico e osteoclástico (VON DEN HOFF, J.W. et al., 2011).

Nas últimas décadas, o ultrassom pulsátil de baixa intensidade (USPBI) vem sendo uma modalidade terapêutica mundialmente conhecida e utilizada clinicamente para a cura dos tecidos lesionados, principalmente aqueles que possuem maior quantidade de colágeno, como tendão e osso (WATSON T., 2013; BUSSE, J. et al., 2009)

Hayton, J.M. et al. (2005); Qin, L. et al. (2006) demonstraram *in vivo*, o aumento significativo da densidade mineral, tamanho e maturação óssea, em coelhos submetidos à pateleotomia parcial e à irradiação ultrassônica por 20 minutos, à intensidade de 0.3 W/cm<sup>2</sup>, na junção tendão/osso, iniciada 3 dias após a cirurgia. Signori U.L. et al. (2011) avaliaram o efeito do ultrassom de baixa intensidade na dinâmica hematológica após a indução de lesão muscular em camundongos na fase aguda e sugerem que a energia ultrassônica possui um efeito anti-inflamatório que possibilita a aceleração cicatricial do tecido, por aumentar a chegada de células-

satélites e fatores de crescimento inerentes ao tecido lesionado e por modificar o comportamento da resposta hematológica na fase aguda de uma lesão muscular.

Katano, M. et al. (2011) investigaram, em estudo experimental em camundongos, a evolução da cicatrização óssea e ossificação endocondral pós-fratura fechada induzida, em diáfise de fêmur e com retardo da união. Após a utilização de ultrassom de baixa intensidade por 20 minutos, observaram, por meio de análise radiológica e histológica, maior e mais rápida cicatrização nos fêmures irradiados quando comparada à dos não irradiados. Diante do exposto, este estudo tem por objetivo identificar o efeito da irradiação do ultrassom pulsátil de baixa intensidade na atividade de metaloproteinases (MMP-2) após o ferimento de monocamada osteoblástica *in vitro*.

## **MATERIAL E MÉTODOS:**

Foi realizado um *estudo in vitro* com cultura de células osteoblásticas humanas (Hob). Para determinar se o USPBI induz, *in vitro*, a proliferação e a regeneração das células osteoblásticas, foi aplicada estimulação ultrassônica uma única vez em poços de cultura de 60x15 mm, com os seguintes parâmetros: USPBI de 1MHZ, frequência de 100HZ, taxa de emissão de 10% e 20%, tempos de irradiação de 5, 10, 15 e 20 minutos e intensidades em W/cm<sup>2</sup> de: 0,26; 0,52 e 1,0. Para cada tempo de irradiação, foi utilizada a técnica estacionária. Todas as combinações de tempo e intensidade irradiadas sobre a cultura celular, em suas respectivas placas, tiveram uma única placa de cultura como grupo-controle durante todo o experimento.

O cabeçote (*probe*) do aparelho USPBI permaneceu imerso horizontalmente e em contato com o meio de cultura celular, de modo a permitir a passagem da onda sonora para o meio e,

assim, para as células aderidas no fundo da placa. O cabeçote (*probe*) permaneceu suspenso e em contato com meio de cultura ficando cerca de 3-4 mm de distância das células no fundo da placa.

Inicialmente foram plaqueadas  $1 \times 10^6$  células/poço (placas de petri: 60 x15mm) e, nas primeiras 24 horas, as células permaneceram em 5 ml de meio RPMI 1640 com 10% SFB e 1% de gentamicina. Após 24 horas, o meio de cultura foi trocado por 5 ml de meio RPMI 1640, suplementado com 1,0% SFB e 1% de gentamicina, para a sincronização do ciclo celular. As células na concentração de  $1 \times 10^6$ /ml e a 1% de SFB foram incubadas *overnight* em estufa a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. No tempo considerado 0 (zero), com um tipo de uma pipeta de 100 µl, foi provocado um ferimento na porção mediana da camada de células do poço (Figura 01). O ferimento foi fotografado e medido usando o *software* Axio Vision Release 4.8.2, nos tempos 0 (zero), 12 e 24 horas, para acompanhamento do fechamento da ferida em microscópio óptico invertido Zeiss, usando objetiva de 5 vezes. Para obter a distância percorrida pelas células, foi usada a seguinte fórmula: Distância final = Dist<sub>0h</sub> - Dist<sub>12h</sub> e Dist<sub>0h</sub> - Dist<sub>24h</sub>. Os parâmetros empregados foram realizados em triplicata e escolhida uma micrografia ao acaso, para cada tempo/ intensidade, para análise da regeneração do ferimento. Cada ferimento, controle, 0.26; 0.52 e 1.0 w/cm<sup>2</sup>, nos seus respectivos tempos 5, 10, 15 e 20 minutos, foi submetido a 40 medidas de distância linear entre os seus bordos, nos tempos 0 (zero) hora, 12 horas e 24 horas. O tempo 0 (zero) foi utilizado para normalização dos demais tempos, como 100% da distância a ser percorrida, caracterizando a regeneração celular. Para análise estatística dos dados normalizados, foi empregado o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov e, como os mesmos apresentaram uma curva Normal, foi empregado o teste de análise da variância com um caminho (ANOVA ONE-WAY) com nível de significância de 5% (p<0,05). Para identificar a diferença mínima entre os grupos, foi empregado o teste de Tukey com o mesmo nível de significância.

Após o plaqueamento e a incubação celular descritos na fase I de estudo, no tempo considerado 0 (zero) e antes de provocar o ferimento nas células aderidas nos poços de cultura, foi coletado 1 ml de sobrenadante para cada poço de irradiação e poço-controle, com os respectivos parâmetros utilizados para análise de regeneração: tempos, 5, 10, 15 e 20 minutos e 0.26, 0.52 e 1.0 W/cm<sup>2</sup> à taxa de irradiação de 10% de USPBI. Após 12 e 24 horas depois da aplicação de USPBI sobre o ferimento de cada poço e poço-controle, foram realizadas novas coletas de 1 ml de sobrenadante. Todas as coletas nos seus respectivos tempos, 0 (zero), 12 e 24 horas, foram congeladas a -70°C, para a análise de zimografia (Figura 03).

O sobrenadante coletado foi utilizado para análise de zimografia de MMP-2 e seguindo o seguinte protocolo: imunoprecipitação das amostras com 15 µl de proteína G+ 200 µl de tampão de ligação, centrifugados por 10 minutos a 11.000 rpm, a uma temperatura de 4°C; após a centrifugação, foi descartado o sobrenadante, e incubados 15 µl de anticorpos MMP-2 (rabbitpolyclonalIgG), mantidos por 90 minutos em agitação com velocidade 2.5 rpm. Em seguida, as amostras foram mantidas em *overnight* na geladeira em agitação por 24 horas. Após este período, as amostras incubadas foram submetidas à eletroforese para análise zimográfica. O gel realizado foi corrido a 8%: RUNNING (10 ml por gel) e STACK (4 ml por gel) com 0,01% de gelatina, com os seguintes reagentes: Bis Acrilamida (30%), Tris 1,5 M, Tris 0,5 M, SDS, APS, Temed, água destilada. As amostras foram inicialmente centrifugadas por 10 minutos a 4°C e 11.000 rpm e, em seguida, acrescidas de 30 µl de tampão de amostras 1x sem Beta-mercaptoetanol. Em seguida foi realizada a eletroforese a 80 volts nos primeiros 40 minutos, e 120 volts até finalizar toda corrida do gel (Figura 04).

Após a eletroforese, o gel foi mantido no tampão de lavagem para a zimografia por 1 hora e 30 minutos e lavado por três vezes no intervalo de 30 minutos. Em seguida, o gel foi

incubado com tampão de incubação para a zimografia e mantido na estufa por 48 horas a 37 °C. Após este período, o gel foi corado com *coomassie blue* por 30 minutos e lavado com descorante de gel por três vezes. Foi realizado este procedimento em triplicata e as bandas foram analisadas e quantificadas por densitometria, utilizando o *software* Image J (ImageProcessingandAnalysis in Java – Image J 1.41).

## RESULTADOS

Os resultados encontrados, após a análise estatística, indicam que a dose equivalente a 0.26 w/cm<sup>2</sup>, ao tempo de 10 minutos com taxa de emissão de 10% e frequência de 100 Hz, promoveu maior velocidade na regeneração do ferimento das células osteoblásticas submetidas a este protocolo, visto que, em 12 horas após a irradiação, todo o ferimento estava regenerado. Em seguida, a dose de 0.52 w/cm<sup>2</sup> ao tempo de 5 minutos, nas mesmas condições de emissão e frequência, também demonstrou eficiência para a regeneração, porém, necessitando de um tempo maior, 24 horas após a irradiação. A dose de 1.0 w/cm<sup>2</sup>, com taxa de emissão de 10% e frequência de 100 Hz, demonstrou ausência de regeneração celular em todas as doses e tempos testados (Figuras 1A, B, C, D).

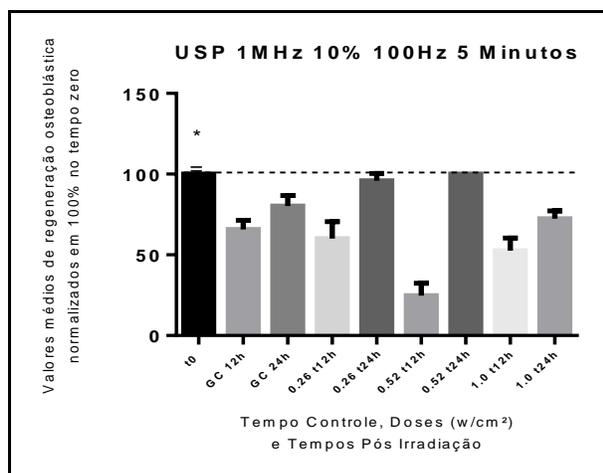


Figura 1A: Valores médios da distância celular percorrida durante a regeneração osteoblástica, normalizados em 100% no tempo-controle igual a t0, após a aplicação da análise de variância (ANOVA one way,  $p < 0,05$ ). \* quando t0 é diferente dos demais, exceto para a dose 0.52 t24h (= quando igual).

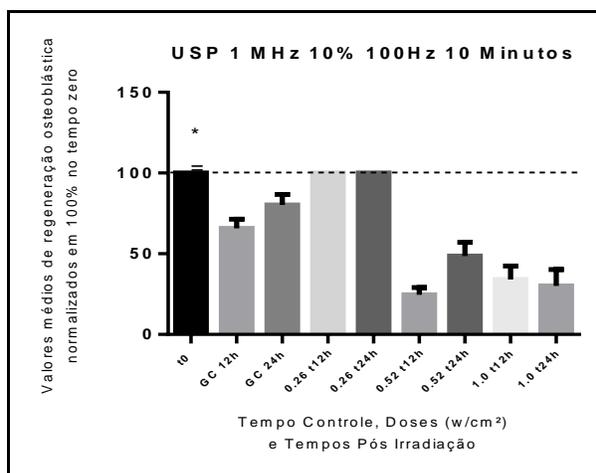


Figura 1B: Valores médios da distância celular percorrida durante a regeneração osteoblástica, normalizados em 100% no tempo-controle igual a t0, após a aplicação da análise de variância (ANOVA one way,  $p < 0,05$ ). \* quando t0 é diferente dos demais, exceto para a dose 0.26 em t12h e t24h (= quando igual).

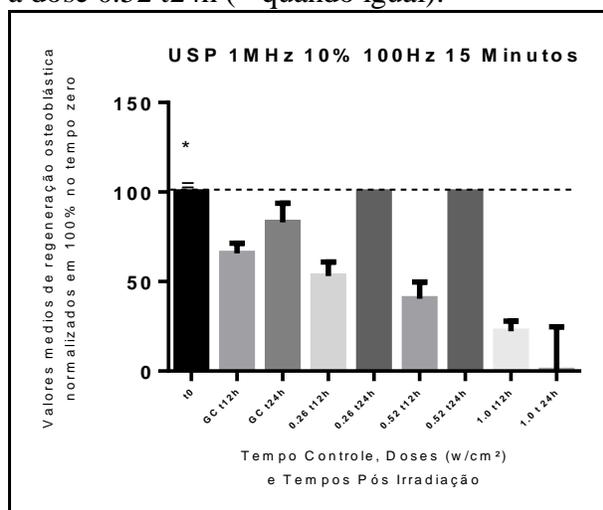


Figura 1C: Valores médios da distância celular percorrida durante a regeneração osteoblástica, normalizados em 100% no tempo-controle igual a t0, após a aplicação da análise de variância (ANOVA one way,  $p < 0,05$ ). \* quando t0 é diferente dos demais, exceto para as doses 0.26 t24h e 0.52 t24h (= quando igual).

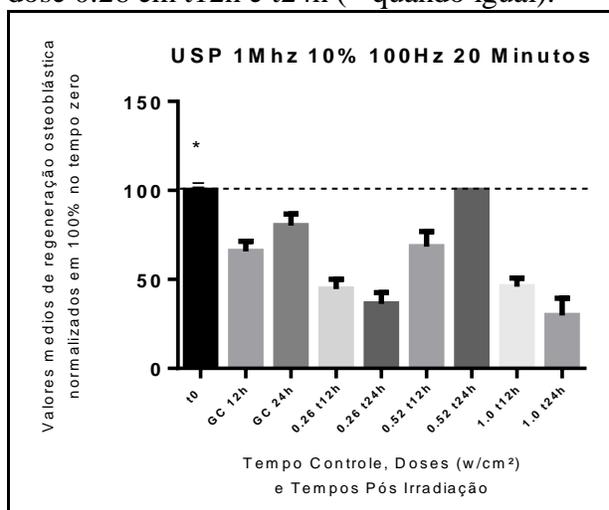
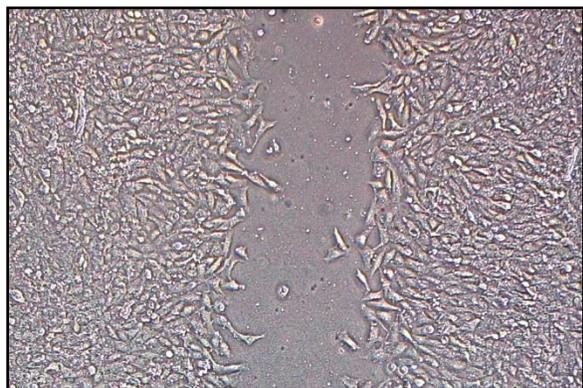


Figura 1D: Valores médios da distância celular percorrida durante a regeneração osteoblástica, normalizados em 100% no tempo-controle igual a t0, após a aplicação da análise de variância (ANOVA one way,  $p < 0,05$ ). \* quando t0 é diferente dos demais, exceto para a dose 0.52 t24h (= quando igual).



A: Tempo 24h GC

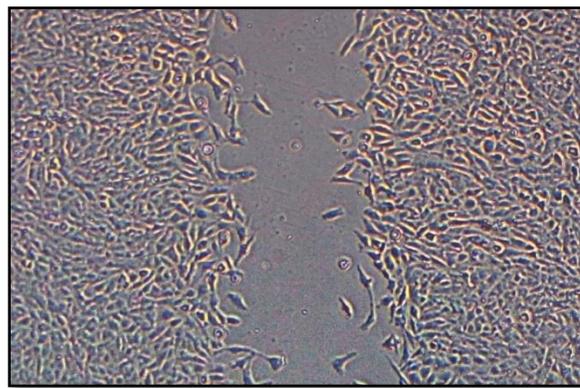
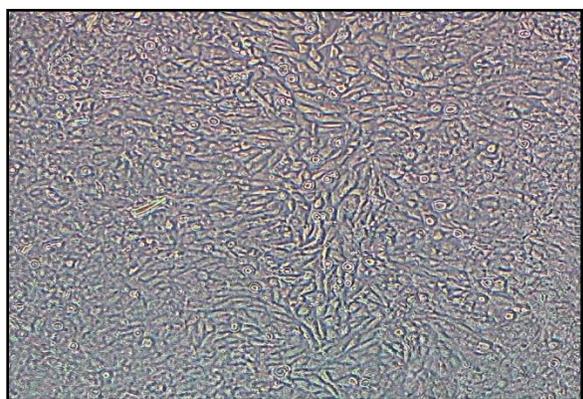
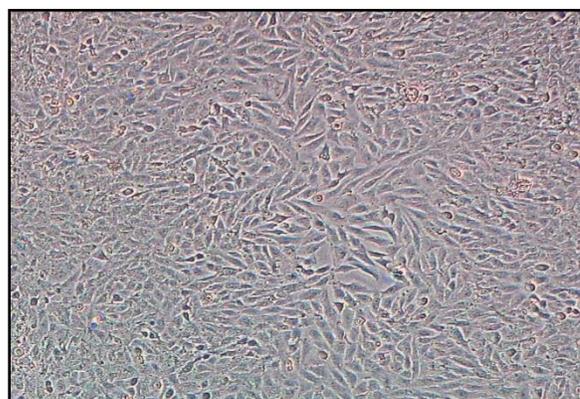
B: Dose 1.0w/cm<sup>2</sup> Tempo 24h GCC: Dose de 0.26 w/cm<sup>2</sup> 12h após a irradiaçãoD: Dose de 0.52 w/cm<sup>2</sup> 24h após a irradiação

Figura 2: Descrição do processo de regeneração via análise microscópica optical invertida. A e B representam exemplos de piores resultados. C e D representam exemplos de melhores resultados. Legenda: CG= Grupo-Controle.

Após a análise de microscopia óptica invertida do processo de regeneração celular nas diferentes doses e tempos de irradiação pelo USPBI, estabeleceram-se, pelo critério de tempo de regeneração e percentual de fechamento do ferimento provocado na monocamada de células osteoblásticas, os melhores e piores resultados da fase I. Observou-se que, na dose de 0,26 w/cm<sup>2</sup> de intensidade, por 10 minutos de irradiação, ocorreu maior atividade da forma pró-ativa e ativa

de MMP-2, após 12 horas de irradiação, quando comparada à do grupo-controle no mesmo período e quando comparada com as demais intensidades, seja dos melhores resultados e dos piores resultados. Estes achados indicam uma relação entre o fechamento do fermento em 12 horas e a maior atividade de MMP-2 neste mesmo período.

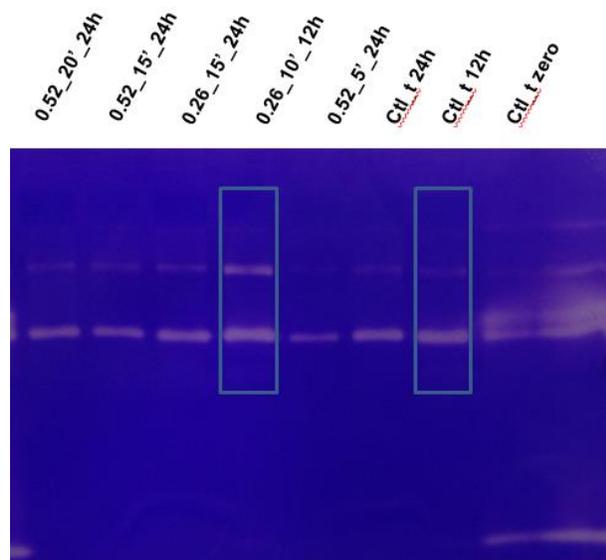


Figura 3A: Análise de zimografia para MMP-2 dos melhores resultados após a análise microscópica optical invertida. Observa-se maior atividade na forma pró-ativa e ativa a  $0.26\text{w}/\text{cm}^2$  por 10 minutos após 12 horas da irradiação.

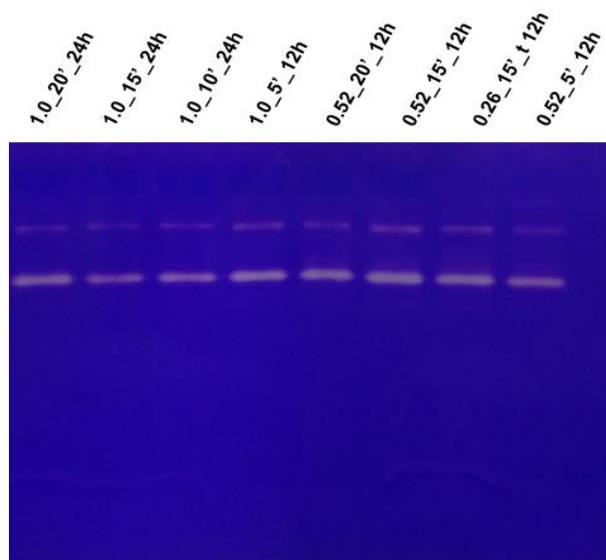


Figura 3B: Análise de zimografia para MMP-2 dos piores resultados após a análise microscópica optical invertida. Observa-se que não houve maior atividade na forma pró-ativa e ativa em nenhum parâmetro de irradiação quando comparado ao do melhor resultado ( $0.26\text{w}/\text{cm}^2$  por 10 minutos após 12 horas da irradiação).

## DISCUSSÃO

Os resultados encontrados na análise da atividade da MMP-2, após o uso de USPBI na dose de  $0,26\text{ w}/\text{cm}^2$  por 10 minutos, vão ao encontro do melhor resultado considerado pela análise microscópica óptica invertida, em que ocorreu o fechamento do fermento após 12 horas de irradiação. Nas demais doses e no grupo-controle, não ocorreram tal atividade e fechamento do fermento. Ribeiro, R. (2009), em estudo com mioblastos (C2C12), analisou a atividade e a proliferação genatinolítica de MMP-2 e MMP-9 após a irradiação de ultrassom em diferentes

doses e tempos, e não encontrou diferenças entre as mesmas. O tempo de irradiação empregado variou entre 2 e 5 minutos e a intensidade variou entre 0,2 e 0,5 w/cm<sup>2</sup>. Sua taxa de emissão de irradiação foi de 20%. Os parâmetros utilizados pelos autores deste estudo diferem daqueles que, em nosso estudo, foram encontrados, a saber, melhores resultados de fechamento do ferimento.

O remodelamento da matriz extracelular, em condições fisiológicas e patológicas, é realizado pela alta atividade das Metaloproteinases de Matriz (MMPs), que compõem uma família de enzimas zinco-dependente que tem a capacidade de regular a composição da matriz (NYMAN J.S. et al., 2011). Nossos resultados na dose de 0,26 w/cm<sup>2</sup> por 10 minutos sugerem que o ultrassom, por suas propriedades mecânicas de alta frequência, favoreceu esta resposta fisiológica de recomposição da matriz extracelular, possibilitando o fechamento da monocamada de osteoblastos em apenas 12 horas, quando comparado com os demais parâmetros utilizados.

Mosig, R.A. et al. (2007) descreveram os primeiros achados, *in vitro* e *in vivo*, sobre o papel das MMP-2 no desenvolvimento ósseo precoce, crescimento e proliferação das células ósseas. Estas passaram a não ser mais consideradas enzimas destrutivas e sim aquelas que podem alterar o microambiente celular, modular a atividade de moléculas bioativas, regular a atividade de outras proteases e, além disso, atuar no papel de proliferação, diferenciação e apoptose celular. Estes achados fisiológicos parecem estar ligados ao efeito bioestimulante do ultrassom em baixas intensidades ou ao efeito desnaturante, que poderiam levar à apoptose celular quando em alta intensidade e por um tempo mais prolongado. Tais respostas sugerem justificar o não fechamento do ferimento das monocamadas osteoblásticas de nosso estudo, fase I, na dose de 1,0 w/cm<sup>2</sup>, em todos os tempos de irradiação empregados, diferentemente do que ocorreu nas intensidades de 0.26 w/cm<sup>2</sup> e 0.52 w/cm<sup>2</sup>, nos tempos de 10 e 5 minutos, respectivamente. A dose menor levou ao fechamento em 12 horas e a dose maior levou ao fechamento em 24 horas.

Klein, T. & Bischoff, R. (2010), em estudo de revisão, descrevem que as MMP-2 degradam o colágeno na membrana basal vascular em condições fisiológicas ou em condições patológicas e, desta forma, estão envolvidas na neovascularização. O seu estado de ativação parece ser crucial para atuar na angiogênese, sua forma ativa intermediária é considerada o estado ideal para promover a formação de novos vasos. Ao mesmo tempo, Albarnoz et al. (2011); Paliwal, S. & Mitragotri, S. (2008) e Cheung, W-H. et al. (2010) descreveram, em diferentes estudos com ultrassom de baixa intensidade, o aumento da produção de VEGF com consequente aumento da angiogênese em células ósseas, seja em condições *in vitro* ou *in vivo*. Ao relacionarmos estes dados com os nossos resultados, podemos hipotetizar que o aumento da forma pró-ativa e ativa de MMP-2 na dose de 0.26 w/cm<sup>2</sup> pode ser atribuída às respostas fisiológicas descritas acima.

Lieu S. et al. (2011) demonstraram, em estudo com camundongos submetidos à fratura induzida, que há um retardo da formação de calo ósseo nos primeiros 10 dias pós-fratura na ausência de MMP-2 e que sua atividade é crucial, nesta fase, para a remodelação óssea. Considerando que, em nosso estudo, realizamos uma análise numa fase considerada aguda do ferimento, podemos hipotetizar que o uso de USPBI na fase aguda de uma lesão celular óssea, *in vitro* ou *in vivo*, irá favorecer a produção de MMP-2 e, conseqüentemente, facilitar e/ou potencializar a remodelação celular necessária à regeneração da mesma.

Nyman, J.S. et al. (2011) descreveram diferentes características do comportamento ósseo, *in vivo*, pela perda de MMP-2 como as que seguem: 1) diminuição da densidade de mineralização e conectividade trabecular; 2) diminuição da densidade de mineralização da diáfise óssea e; 3) aumento da porosidade cortical do osso. Todas estas características comprometem o processo de remodelamento e regeneração óssea seja *in vitro* e/ou *in vivo* e,

deste modo, ao utilizarmos um recurso que promova o aumento da produção de MMP-2, iremos contribuir para uma regeneração celular mais rápida e com a qualidade tecidual necessária para atender às funções inerentes ao tecido ósseo.

### **CONCLUSÕES:**

De acordo com a metodologia empregada neste estudo, pode-se concluir que o ultrassom de baixa intensidade promove a regeneração osteoblástica em doses baixas e em tempos intermediários com maior velocidade, quando comparado com os de maiores intensidades e tempos mais longos.

As doses baixas nos tempos intermediários de duração promovem um aumento da atividade das MMP-2 que são essenciais para a manutenção das características fisiológicas e funcionais do tecido ósseo, seja em condições de injúria ou na sua condição de homeostase.

Os resultados encontrados, neste estudo, estabelecem um protocolo de tratamento que poderá ser aplicado na prática profissional da saúde, para a obtenção de maior eficiência nas respostas clínico-funcionais desejadas.

### **AGRADECIMENTOS:**

À Professora Andrea Cristina Veto Arnholdt, por ceder o laboratório de Biologia do Reconhecer (LBR) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro e participar da coorientação da pesquisa e às agências de fomento e pesquisa Capes-Cnpq, pelo financiamento de parte do trabalho realizado.

**REFERÊNCIAS**

ALBORNOZ, P.M. et al. The evidence of low-intensity pulsed ultrasound for in vitro, animal and human fracture healing. **British Medical Bulletin**, vol. 100, p. 39-57, 2011.

BUSSE, W.J. et al. Low intensity pulsed ultrasonography for fractures: systematic review of randomized controlled trials. **Britain Medical Journal**, vol. 338: B351, p. 1-9, 2009.

CHEUNG, W-H. et al. Low-Intensity pulsed ultrasound accelerated callus formation, angiogenesis, and callus remodeling in osteoporotic fracture healing. **Ultrasound in Medicine & Biology**, vol. 37, n. 2, p. 231-238, 2011.

HAYTON, J.M. et al. Involvement Of Adenosine 5-Triphosphate In Ultrasound-Induced Fracture Repair. **Ultrasound in Medicine.& Biology**, vol. 31, n. 8, p. 1131-138, 2005.

KLEIN, T. & BISCHOFF, R. Physiology and Pathophysiology of Matrix Metalloproteinases. **Amino Acids**, vol. 41, p. 271-290, 2011.

KATANO, M, et al. Low Intensity Pulsed Ultrasound Accelerates Delayed Healing Process by Reducing the Time Required for the Completion of Endochondral Ossification in the Aged Mouse Femur Fracture Model. **Experimental Animal**, vol. 60, n. 4, p. 385-395, 2011,

LIEU, S. et al. Impaired Remodeling Phase of Fracture Repair in the Absence of Matrix Metalloproteinase-2. **Disease Models & Mechanisms**, vol. 4, p. 213-211, 2011.

MOSIG, R.A. et al. Loss of MMP-2 Disrupts Skeletal and craniofacial development and results in decreased bone mineralization, joint erosion, and defects in osteoblast and osteoclast growth. **Human Molecular Genetic**, vol, 16(9), p. 1113-1123, 2007.

NYMAN, J. S. et al. Differential Effects Between the Loss of MMP-2 and MMP-9 on Structural and Tissue-Level Properties of Bone. **Journal of Bone and Mineral Research**, vol, 26, n, 6, p. 1252-1260, 2011.

PALIWAL, S. & MITRAGOTRI, S. Therapeutic opportunities in biological responses of ultrasound. **Ultrasonics**, vol. 48, p. 231-238, 2008.

QIN, L. et al. Low-Intensity pulsed ultrasound accelerates osteogenesis at bone-tendon healing junction. **Ultrasound in Medicine & Biology**, vol. 32, n. 12, p. 1905-1911, 2006.

RIBEIRO, R. et al. Efeito do ultrassom terapêutico pulsado na proliferação e atividade gelatinolítica de células musculares. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Nove de Julho - UNINOVE. São Paulo, 2009.

SIGNORI, U.L. et al. Haematological effect of pulsed ultrasound in acute muscular inflammation in rats. **Physiotherapy**, vol. 97, p. 163-169, 2011.

WATSON, T. **Therapeutic Ultrasound**. Disponível

em: <<http://www.electrotherapy.org/assets/Downloads/Therapeutic%20Ultrasound%202013.pdf>