

**ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO CELULAR EM FIBROBLASTOS (L929)
SUBMETIDOS À TERAPIA ULTRASSÔNICA PULSADA E CONTÍNUA**

Adrielle Flausino dos Santos (Bolsista FUNADESP/UNOPAR), e-mail: adrielleflausino.fisio@gmail.com. Priscila Daniele de Oliveira (Colaboradora), e-mail: prisciladanielefisio@hotmail.com. Ana Flávia Spadaccini Silva (Colaboradora), e-mail: ana_spadaccini@hotmail.com. Stheace Kelly Fernandes Szezerbaty (Colaboradora), e-mail: szezerbaty@hotmail.com. Rodrigo Franco de Oliveira (Orientador), e-mail: rfrancoli@yahoo.com.br.

Universidade Norte do Paraná (UNOPAR) | Laboratório de Cultura Celular –
LACCEL | Mestrado em Ciência da Reabilitação

Área: Biologia Celular e Molecular**Introdução**

O ultrassom abrange diversas aplicações com relevantes repercussões no meio acadêmico devido a sua abrangente utilização, por tratar-se de um recurso seguro, pouco invasivo e de baixo investimento para a prática clínica. Especialmente, quando voltado à reparação de diversos tecidos, em particular, o musculoesquelético (VÁSQUEZ *et al.*, 2014).

Em ambos os regimes de pulso, pulsado ou contínuo, o ultrassom induz respostas como analgesia, regressão de edema e aceleração cicatricial em injúrias teciduais, propiciando assim, maior celeridade no retorno da função (VÁSQUEZ *et al.*, 2014). Tais respostas são provenientes de dois efeitos, o térmico e atérmico (mecânico) (NUSSBAUM; LOCKE, 2007).

O primeiro, usualmente acompanhado com intensidades mais altas é proveniente do modo contínuo e condiciona a célula a uma excitação que aumenta a atividade celular, por meio da associação entre a cavitação estável e a transmissão acústica (WATSON, 2008) e o segundo, atérmico, obtido na saída com pulsos, habitualmente é direcionado ao tratamento de lesões mais graves ou agudas, por melhorar a qualidade e velocidade da recuperação sem aumentar a temperatura local (WATSON, 2006).

Neste sentido, diversos autores referem a eficiência do ultrassom de baixa e média intensidades no aumento percentual de células viáveis cultivadas *in vitro*, com aceleração da proliferação (OLIVEIRA *et al.*, 2015, BERTIN *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2008) e, com o regime contínuo, efeitos terapêuticos relevantes, tanto *in vivo* (VÁSQUEZ *et al.*, 2014) quanto *in vitro* (DOMENICI *et al.*, 2014).

Desta maneira, este estudo teve por objetivo avaliar a influência da irradiação ultrassônica pulsada e contínua na viabilidade de células fibroblástica L929 *in vitro* em diferentes tempos de incubação.

Material e Métodos

As análises realizadas no presente estudo empregaram como material biológico as células L929 (Mouse conjunctive tissue - ATCC CCL-1 NCTC) (Instituto

Adolfo Lutz - SP, Brasil). O estudo recebeu aprovação do Comitê de Ética da Universidade Norte do Paraná (UNOPAR), sob o protocolo de nº 462.478/2013.

Cultura Celular

As células fibroblásticas foram cultivadas em garrafas de 25 cm² (TPP, Switzerland, Europe) utilizando meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Gibco™ - Invitrogen Corporation, Grand Island, USA) + HAM F12 Nutrient Mixture (Gibco™ - Invitrogen Corporation, Grand Island, USA) suplementadas com 5% FBS (Fetal Bovine Serum) (Cultilab, Brazil) e 1% de antibiótico e antimicótico, mantidos em uma estufa de CO₂ em atmosfera 5% a 37°C. As células utilizadas foram subcultivadas sempre que atingiam uma confluência de 80-100%. Células do tecido conjuntivo de camundongo foram utilizadas neste experimento, conforme a norma ISO 10993-5 que recomenda a utilização desta linhagem de célula in vitro para testes de citotoxicidade.

Irradiação ultrassônica

Para irradiação ultrassônica, utilizou-se o equipamento da marca KLD® – (Biosistemas Equipamentos Eletrônicos Ltda – Amparo SP-Brasil), modelo Avatar III, com cabeçote de 1 MHz e com área de radiação efetiva (ERA) de 1 cm², devidamente calibrado pelo fabricante e placas TPP 12 poços, com 24 mm de diâmetro e 18 mm de profundidade, contendo 5x10⁵ células/ µL. Com o intuito de avaliar a faixa estimulatória do ultrassom, criaram-se os seguintes grupos: Controle (não recebeu radiação), 0,5 W/cm² com regime de pulso de 30% (pulsado); 0,5 W/cm² com regime de pulso contínuo.

Teste de Citotoxicidade Celular (MTT)

Os experimentos de citotoxicidade foram avaliados pelo método de MTT Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol)- 2,5-difeniltetrazólio]. Este método quantitativo é utilizado para avaliar citotoxicidade, proliferação e ativação de células viáveis com precisão (MOSMANN, 1983). As culturas de células L929 receberam irradiação ultrassônica nos intervalos de 24, 48 e 72 horas em placas TPP 12 poços, sendo que após 24 horas de cada irradiação foi realizado teste de MTT de acordo com ensaio a seguir: foi retirado o meio de cultura de cada poço, adicionado 200 µl MTT e incubado por 01 hora a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂. Em seguida foi retirado o MTT e foram adicionados 200 µl de DMSO (Dimetil sulfóxido) em cada poço. As placas foram submetidas a agitação por 15 minutos para solubilização dos cristais de formazana e posteriormente as células foram transferidas para uma placa TPP 96 poços e sua concentração quantificada espectroscopicamente por meio de um leitor de microplacas (Leitor ELISA – SpectraCount – Packards Instrument, Offeburg – Alemanha), em comprimento de onda de 570 nm. Os dados foram analisados através do teste Shapiro Wilk para verificar a viabilidade celular.

Resultados e Discussão

Todos os testes apresentaram distribuição normal. Portanto, partiu-se por um caminho paramétrico, optando pelo teste ANOVA one way para a análise de variância intra e entre grupos.

Os grupos foram analisados de acordo com o tempo de incubação, conforme demonstrado no Quadro 1. Dentre os 3 grupos analisados, apenas o grupo 0,5W/cm² - 30% apresentou diferença significativa entre os tempos.

Quadro 1- Comparação intra-grupo nos diferentes tempos de incubação da viabilidade celular

	24 H	48 H	72 H	p
Controle	85%	89%	82%	ns
0,5 W/cm² - 30%	57%	118%	66%	0,04*
0,5 W/cm² - 100%	57%	48%	54%	ns

*: valores significativos ($p \leq 0,05$); ns: não significativo.

Fonte: Dados da pesquisa.

Quando analisados segundo o pós-teste Tukey foi possível observar a diferença entre os pares. O grupo 0,5W/cm² - 30% apresentou diferença significativa entre o tempo 48 e 72 horas ($p=0,05$), no qual o valor variou de 118% para 66%, apresentando uma diferença de 52% de células viáveis. O grupo contínuo não apresentou diferença entre os tempos.

A dose 0,5W/cm² tem sido estudada e mostrou-se não significativa em estudos realizados em tecido ósseo de cães de raça não definida *in vivo* (Silveira et al., 2008), conflitando os achados de Silva et al (2010), que mostravam tanto o epitendão quanto o endotendão de ratos wistar alargados por aumento do número de tenoblastos ao serem irradiados na mesma dosimetria de 0,5W/cm² na modalidade pulsada a 10%, em comparação com um grupo controle. No presente estudo, o grupo irradiado com dose 0,5w/cm² no regime de pulso 30%, apresentou aumento da proliferação celular entre o tempo 48 horas e 72 horas ($p=0,05$). No estudo de Oliveira et al., (2015), realizado de forma *in vitro* onde foram utilizados fibroblastos da linhagem L929 a significância estatística foi encontrada apenas no grupo irradiado com ultrassom de mesma dose (0,5W/cm²) com regime de pulso de 10% ($p=0,003$). Nesse grupo, ocorreu aumento da viabilidade celular tanto de 24 para 48 horas, como de 48 para 72 horas.

Do mesmo modo, segundo Oliveira *et al.* (2008), a irradiação nas doses de 0,2 W/cm² e 0,6 W/cm² tanto no regime de pulso 10% e 20%, no período de 72 horas, aumentou a viabilidade de células fibroblásticas L929, sendo ela significativamente maior do que no grupo não irradiado.

Em contrapartida, células de membrana sinovial de joelhos de coelho, em condições não inflamatórias, não expressaram nenhum efeito sobre a proliferação, quando expostas ao ultrassom pulsado de baixa intensidade. Estes autores justificam tais resultados referindo que os efeitos biomoduladores do ultrassom podem ter sido minimizados pela alta produção de CO₂ mediante grandes concentrações de células, bem como, pela apoptose celular (NAKAMURA *et al.*, 2011).

Conclusão

Com base nos resultados deste estudo, pode-se concluir que, de acordo com os parâmetros definidos, o tempo, a intensidade e especialmente, o regime de pulso, podem ser fundamentais para o melhor emprego do ultrassom terapêutico, visto que a irradiação ultrassônica pulsada apresentou maior proliferação de fibroblastos L929 no tempo 48 horas, enquanto que, no grupo irradiado em modo contínuo, não houve diferença estatisticamente significativa entre os tempos.

Agradecimentos

FUNADESP. CNPq.

Referências

OLIVEIRA, R.F. *et al.* Assessment of fibroblast cells submitted to ultrasonic irradiation. *Cell. Biol. Int.*, v.32, n.10, p.1329-1335, 2008.

OLIVEIRA, R.F.; OLIVEIRA, D.A.A.P.; PACHECO-SOARES, C. Efeito do ultra-som pulsado de baixa intensidade em culturas fibroblásticas L929. *ConScientiae Saúde*, v.7, n.3, p.315-321, 2008.

BERTIN, L.D. *et al.* A influência da irradiação ultrassônica de baixa intensidade em cultura de células fibroblásticas. *Rev. Ter. Man.*, v.13, p.306, 2015.

DOMENICI, F. *et al.* Structural and permeability sensitivity of cells to low intensity ultrasound: Infrared and fluorescence evidence in vitro. *Ultrasonics*, v.54, p.1020-1028, 2014.

MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Method*, v.64, n.1/2, p.55-63, 1983.

NAKAMURA, T. *et al.* Effects of low-intensity pulsed ultrasound on the expression and activity of hyaluronan synthase and hyaluronidase in IL-1b-stimulated synovial cells. *An. Biom. Eng.*, v.38, n.11, p.3363-3370, 2010.

Nussbaum, E.L.; LOCKE, M. Heat shock protein expression in rat skeletal muscle after repeated applications of pulsed and continuous ultrasound. *Arch. Phys. Med. Rehabil.*, v.88, n.6, p.785-790, 2007.

OLIVEIRA, P.D. *et al.* Effect of low-intensity pulsed ultrasound therapy on fibroblasts cell culture. *Fisioter. Pesq.*, v.22, n.2, p.112-118, 2015.

SILVA, J.M.N. *et al.* Estudo da ação do ultrassom terapêutico em modelo experimental de tendinite em ratos Wistar. *ConScientiae Saúde*, v.9, n.4, p.625-632, 2010.

SILVEIRAI, D.S. *et al.* O ultra-som terapêutico de 1 MHz, na dose de 0,5 W cm⁻², sobre o tecido ósseo de cães avaliado por densitometria óptica em imagens radiográficas. *Ciênc. Rural*, v.38, n.8, p. 2225-2231, 2008.

WATSON, T. Electrotherapy and tissue repair. *Sportex Med.*, v.29, p.7-13, 2006.

WATSON, T. Tissue repair: The current state of the art. *Sportex Med.*, v.28, p.8-12, 2006.

WATSON, T. Ultrasound in contemporary physiotherapy practice. *Ultrasonics*, v.48, n.4, p.321-329, 2008.

VÁSQUEZ, B. *et al.* Effect of pulsed and continuous therapeutic ultrasound on healthy skeletal muscle in rats. *Int J. Clin.Exp.Pathol.*, v.7, n.2, p.779-783, 2014.