

UNIVERSIDADE PAULISTA – UNIP

PROGRAMA DE MESTRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**VIABILIDADE DE MACRÓFAGOS *IN VITRO* APÓS
ESTIMULAÇÃO COM ULTRA-SOM TERAPÊUTICO DE
1MHz**

Dissertação Apresentada ao
Programa de Mestrado em Medicina
Veterinária da Universidade Paulista
– UNIP para obtenção do Título de
Mestre. Área de concentração:
Imunopatologia Veterinária.

LUIZ WANDERLEY MENDONÇA JUNIOR

São Paulo

2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE PAULISTA – UNIP

PROGRAMA DE MESTRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**VIABILIDADE DE MACRÓFAGOS *IN VITRO* APÓS
ESTIMULAÇÃO COM ULTRA-SOM TERAPÊUTICO DE
1MHz**

Dissertação Apresentada ao
Programa de Mestrado em Medicina
Veterinária da Universidade Paulista
– UNIP para obtenção do Título de
Mestre. Área de concentração:
Imunopatologia Veterinária, sob
orientação do Prof. Dr. Mario
Mariano

LUIZ WANDERLEY MENDONÇA JUNIOR

São Paulo

2006

Ao meu orientador Prof. Dr. Mario Mariano:

*“A melhor maneira de realizar seus sonhos é ajudar o maior número possível de pessoas a realizar os delas.”
(Roberto Schinyashiki)*

Sua confiança em mim tornou possível a realização do maior sonho de minha vida, meu mestrado! Conviver lado a lado com uma mente tão brilhante, uma inteligência tão privilegiada e ao mesmo tempo um ser humano com tamanha grandeza e humildade me fizeram acreditar novamente nas pessoas e nas coisas boas que podemos construir.

Obrigada por sua amizade, sua confiança, sua dedicação e acima de tudo por seu exemplo!

Aos meus pais Luiz Wanderley e Maria Francisca, agradeço pelo apoio, pelo suporte, pela compreensão e todo amor a mim dedicados.

Mas acima de tudo meu agradecimento pelos exemplos de vida, de caráter, de conduta e de valores que vocês me passaram.

A vocês o meu amor e admiração eternos.

Às minhas irmãs, Rita, Fernanda e Flavia por sua contribuição e amizade sempre.

A minha namorada Luciana Viero, mulher linda, inteligente, companheira, batalhadora, forte e dona dos olhos verdes mais lindos que já vi, o meu agradecimento pela ajuda e paciência, muita paciência em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha co-orientadora Profa. Dra. Lucia C. Jamli Abel pela atenção e auxílio na execução deste trabalho, mas acima de tudo pela sua dedicação e competência em me introduzir ao estudo desta fascinante área que é a Imunologia.

Ao Prof. Dr. Richard Eloin Liebano, pelo apoio, amizade e ensinamentos o meu reconhecimento e agradecimento.

Agradeço a todos os professores da Pós-graduação, pelos ensinamentos e lições durante esses anos.

Agradeço aos funcionários da Pós-graduação da UNIP pela amizade e convivência nesse período.

Agradeço a CAPES pelo apoio financeiro para realização deste mestrado.

Agradeço a BIOSET® – Industria de Tecnologia Eletrônica Ltda, especialmente ao Dr. Antonio José Bucalon, por acreditar e incentivar a pesquisa científica e pela colaboração e orientações sobre o aparelho de ultra-som terapêutico.

Agradeço aos meus colegas de Pós-graduação, Veranice, Heloisa, Maria Carolina, Ruggero, Adriano e Renato, por tantos momentos juntos e por tantos auxílios recebidos. Hoje além de colegas sei que tenho em vocês grandes amigos.

Agradeço a todos do Laboratório de Imunologia do Prof. Dr. Mario Mariano – UNIFESP-EPM, Ana Flavia, Helena, Bia, Maria Fernanda, Ricardo, Mauro, Maiko, Felipe, Ronni e Gennaro. Estejam certos que a convivência com todos vocês me trouxe muitos conhecimentos, muitos exemplos, muita admiração, novos e valiosos amigos e um grande desejo de que esta seja a primeira de muitas etapas em que possamos estar juntos.

Pessoas especiais merecem agradecimentos especiais; porque estas pessoas têm condutas especiais, por isso meu amigo Ricardo Russo, pelo seu acompanhamento, por sua dedicação, pela sua disponibilidade, pelo compartilhamento dos seus conhecimentos deixo aqui um agradecimento muito especial.

Agradeço ao Prof. Ms. Luiz Carlos de Azevedo Filho (*in memoriam*), engenheiro mecânico, por sua valorosa contribuição na execução do projeto do tanque de irradiação.

Agradeço a Fernando e Hideraldo, pela amizade e presença nos momentos difíceis.

As meus familiares que direta ou indiretamente contribuíram para esta conquista o meu muito obrigado.

RESUMO

MENDONÇA JUNIOR, L. W. Viabilidade de macrófagos *in vitro* após estimulação com ultra-som terapêutico de 1MHz (Therapeutic ultrasound of 1MHz do not alter the viability of macrophages *in vitro*). Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, área de concentração Imunopatologia Veterinária) – Instituto de Ciências e Saúde, Universidade Paulista 2006.

Macrófagos têm importante papel nos processos de inflamação e cicatrização tecidual. O ultra-som terapêutico (UST) é utilizado eficazmente com a finalidade de acelerar tais processos, aumentando a síntese, a qualidade e a organização do colágeno depositado. Considerando a importância do uso do UST como forma de acelerar o processo de cicatrização, nosso estudo propôs a avaliação da viabilidade dos macrófagos *in vitro* pós-estimulação com UST na frequência de 1MHz, em três regimes de tratamento onde o primeiro nos modos pulsado a 100 Hz (1/2) e contínuo, a intensidade de 0,5W/cm² durante 5 minutos, o segundo no modo contínuo nas intensidades de 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0W/cm² durante 5 minutos, e o terceiro regime de tratamento no modo contínuo nas intensidades 0,5; 2,0; 2,5 e 3,0W/cm² durante 5 minutos. A viabilidade celular observada no primeiro regime de tratamento foi de: 97,64% no grupo placebo; 94,62% no grupo pulsado e 94,91% no grupo contínuo. O segundo regime de tratamento apresentou resultados em relação à viabilidade de 99,76% a 0,5W/cm², 84,11% a 1,0W/cm², 83,88% a 1,5W/cm² e 86,49% a 2,0W/cm². No terceiro regime de tratamento os resultados observados em relação à viabilidade celular foram de 99,76% a 0,5W/cm², 86,49% a 2,0W/cm², 68,14% a 2,5W/cm² e 36,86% a 3,0W/cm². Os resultados sugerem que estimulações em intensidades de 0,5 a 2,0 W/cm² mantêm a viabilidade das células, visto que não houve alteração significativa na viabilidade celular, e mostram também que intensidades acima de 2,0 W/cm² podem levar a morte celular no modelo estudado.

ABSTRACT

MENDONÇA JUNIOR, L. W. Therapeutic ultrasound of 1MHz do not alter the viability of macrophages *in vitro*.

Macrophages play a key role in the inflammation and healing tissue process. The therapeutic ultrasound (TUS) is efficiently used to accelerate this process, increasing the synthesis, quality and organization of the deposited collagen. Considering the importance of the TUS as an accelerator of the healing process, our study focus on the evaluation of the viability of macrophages *in vitro* upon stimulation with TUS in the frequency of 1MHz in three different forms of treatment. The first form of treatment was with the TUS pulsed at 100 Hz (1/2) and continuous, in an intensity of $0.5\text{W}/\text{cm}^2$ during 5 minutes, the second in continuous way in the intensities of 0.5; 1.0; 1.5 and $2.0\text{W}/\text{cm}^2$ during 5 minutes, and the third form of treatment in continuous way in intensities of 0.5; 2.0; 2.5 and $3.0\text{W}/\text{cm}^2$ during 5 minutes. The observed cellular viability in the first form of treatment was: 97.64% in the non irradiated group; 94.62% in the pulsed group and 94.91% in the continuously irradiated group. The second form of treatment presented viability results in relations of 99.76% to $0.5\text{W}/\text{cm}^2$, 84.11% to $1.0\text{W}/\text{cm}^2$, 83.88% to $1.5\text{W}/\text{cm}^2$ and 86.49% to $2.0\text{W}/\text{cm}^2$. In the third form of treatment the results observed in relation to cellular viability were 99.76% to $0.5\text{W}/\text{cm}^2$, 86.49% to $2.0\text{W}/\text{cm}^2$, 68.14% to $2.5\text{W}/\text{cm}^2$ and 36.86% to $3.0\text{W}/\text{cm}^2$. The results suggest that stimulations in the intensities from 0.5 to $2.0\text{W}/\text{cm}^2$ keep the cells viability, due the lack of significant alteration in the cellular viability. It is also shown that, in the model studied, intensities above $2.0\text{W}/\text{cm}^2$ can cause cellular death

Lista de Figuras

Figura 1 - Imagem representativa do procedimento de retirada da musculatura (A), desarticulação e retirada do fêmur direito (B), fêmur direito desarticulado e retirado (C), lavagem medular do fêmur (D).....	18
Figura 2 - Imagem do tanque de irradiação e UST.....	20
Figura 3 - Análise gráfica apresentando a percentagem de macrófagos viáveis em cada grupo após a estimulação com UST dos 3 experimentos realizados. Os desvios padrões são apresentados. Grupo 1: Placebo, Grupo 2: Pulsado, Grupo 3 Contínuo.(P>0,05).....	24
Figura 4 - Análise gráfica apresentando a percentagem de macrófagos viáveis em cada grupo após a estimulação com UST. Os desvios padrões são apresentados. Grupo 1: 0,5W/cm ² , Grupo 2: 1,0W/cm ² , Grupo 3: 1,5W/cm ² , Grupo4: 2,0W/cm ²	25
Figura 5 - Análise gráfica apresentando a percentagem de macrófagos viáveis em cada grupo após a estimulação com UST. Os desvios padrões são apresentados. Grupo 1: 0,5W/cm ² , Grupo 2: 2,0W/cm ² , Grupo 3: 2,5W/cm ² , Grupo4: 3,0W/cm ²	26

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Seleção de produtos secretados por fagócitos mononucleares.....	7
Tabela 2: intensidades do aparelho.....	19

Lista de Abreviações

UST	Ultra-som terapêutico
ERA	Área de radiação efetiva
Hz	Hertz – unidade de medida de freqüência
kHz	Kilohertz – unidade de medida de freqüência igual a mil Hertz
MHz	Mega Hertz – unidade de medida de freqüência igual a um milhão de Hertz

W	Wattes – quantidade de energia
W/cm ²	Wattes por centímetro quadrado – quantidade de energia em unidade de área por unidade de tempo
rpm	Rotações por minuto
°C	Grau Celsius
%	Porcentagem
et al	Colaboradores
Ltda	Limitada
SMF	Sistema Mononuclear Fagocítico
MEC	Matriz Extracelular
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
TGF-β	Fatores Transformadores de Crescimento β
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
EGF	Fator de Crescimento Epidérmico
FGF	Fator de Crescimento dos Fibroblastos
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral α
IL-1	Interleucina 1
IL-4	Interleucina 4
IL-8	Interleucina 8
CFU-GM	Unidade Formadora de Colônia – Granulócitos e Monócitos
IFN-?	Interferon ?
NO [•]	Óxido Nítrico
LPS	Lipopolissacarídeo
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1 Inflamação.....	12
1.2 Ultra-som.....	18
2. OBJETIVO.....	26
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1 Animais.....	27
3.2 Obtenção e cultura dos macrófagos:.....	27
3.3 Ultra-som Terapêutico (UST).....	29
3.4 Tanque de irradiação.....	30
3.5 Irradiação Celular:.....	30
3.6 Viabilidade Celular.....	31
3.7 Regime de Tratamento 1.....	31
3.8 Regime de Tratamento 2.....	32
3.9 Regime de Tratamento 3.....	32
3.10 Análise dos resultados.....	33
4. RESULTADOS.....	34
4.1 Tratamento 1.....	34
4.2 Tratamento 2.....	34
4.3 Tratamento 3.....	35
5. DISCUSSÃO.....	37
6. CONCLUSÃO.....	41
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42

1. INTRODUÇÃO

1.1 Inflamação

Quando ocorre quebra da homeostasia do tecido conjuntivo vascularizado (lesão), inicia-se reação biológica complexa denominada inflamação, que tende a reconstituir e cicatrizar a região lesada (MARIANO, M – *comunicação pessoal*).

A inflamação caracteriza-se por quatro sinais clínicos: dor, rubor, tumor e calor. Um quinto sinal, a perda de função do tecido lesado, nem sempre está presente na reação inflamatória. A dor, fenômeno complexo e ainda pouco conhecido, é causado pela liberação de mediadores químicos. O rubor decorre da vasodilatação arteriolar e conseqüente aumento do fluxo sangüíneo nas vênulas próximas ao foco inflamatório. O tumor resulta do aumento da permeabilidade venular pela contração das células endoteliais (ROBBINS, *et al.*, 1996).

A inflamação, porém, pode ser nociva. Quando da migração e da fagocitose, os leucócitos ativados podem liberar metabólitos reativos e proteases para o meio extracelular, causando lesão tecidual (ROBBINS *et al.*, 1996).

Dependendo de sua duração e características, a inflamação pode ser aguda ou crônica. A inflamação aguda caracteriza-se por ser de curta duração (de minutos, horas ou dias), havendo exsudação de líquido e proteínas plasmáticas, além da migração de leucócitos, entre os quais predominam os polimorfonucleares, principalmente os neutrófilos (ROBBINS *et al.*, 1996), que são as primeiras células a chegar no local da lesão, em aproximadamente 1 a 2 horas após a perturbação inicial da homeostasia (PARK *et al.*, 2004). Entretanto, como foi mostrado por SPECTOR *et al.*, (1967), neutrófilos e macrófagos migram concomitantemente para o local da lesão, sendo os primeiros a população predominante na fase inicial.

Esse tipo de inflamação pode evoluir para quatro desfechos: a resolução completa da lesão, a fibrose, o abscesso e a inflamação crônica. A inflamação crônica é de maior duração que a aguda, durando semanas ou meses, e apresenta eventos diferentes desta, tais como a presença de células do sistema mononuclear fagocítico (SMF) – o tipo celular predominante 48-96 horas após a lesão tecidual (SPECTOR *et al.*, 1967) – e linfócitos, além da proliferação de vasos sangüíneos e de tecido conjuntivo. As linfocinas secretadas por linfócitos estimulam macrófagos e monócitos que, por sua vez, liberam monocinas que estimulam os linfócitos, levando a inflamação à persistência (ROBBINS *et al.*, 1996).

A capacidade de substituir células lesadas ou mortas e de proceder ao reparo dos tecidos após a inflamação é crítica para a sobrevivência do organismo. Uma variedade de agentes lesivos – ao mesmo tempo em que provocam dano no interior da célula – dispara uma série de eventos que servem não apenas para conter a lesão, mas também para preparar as células que não foram letalmente danificadas para a replicação necessária à substituição das células mortas (ROBBINS *et al.*, 1996).

O reparo dos tecidos envolve dois processos distintos: (1) regeneração, que se refere à substituição das células lesadas por células do mesmo tipo, sem deixar algumas vezes, qualquer vestígio da lesão anterior; e (2) substituição por tecido conjuntivo, um processo denominado fibroplasia ou fibrose, que deixa uma cicatriz permanente. Na maioria dos casos, ambos os processos contribuem para o reparo. Além disso, tanto a regeneração quanto a fibroplasia são determinadas por mecanismos essencialmente similares, envolvendo a migração, proliferação e diferenciação celulares, bem como interações entre célula e matriz (ROBBINS *et al.*, 1996).

Ocorre fibrose ou fibroplasia no arcabouço de tecido de granulação dos novos vasos sangüíneos e da matriz extracelular (MEC) frouxa que inicialmente se formam no local de reparo.

Dois processos estão envolvidos na fibrose: (1) migração e proliferação de fibroblastos no local da lesão; e (2) deposição da MEC por essas células (ROBBINS *et al.*, 1996).

O tecido de granulação contém vasos sanguíneos recém-formados. O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) também denominado fator de permeabilidade vascular, promove a angiogênese, mas também é responsável por um acentuado aumento da permeabilidade vascular. Esta última atividade resulta em deposição aumentada de proteínas plasmáticas, como fibrinogênio e fibronectina plasmática, na MEC, proporcionando um estroma provisório para o crescimento dos fibroblastos (e das células endoteliais). A migração dos fibroblastos para o local de lesão e a sua subsequente proliferação são deflagrados por numerosos fatores de crescimento, incluindo fatores transformadores de crescimento β (TGF- β), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento dos fibroblastos (FGF) e as denominadas citocinas fibrinogênicas, interleucina 1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral α (TNF- α). As fontes desses fatores de crescimento incluem as plaquetas e uma variedade de células inflamatórias, bem como o endotélio ativado. Os macrófagos, por exemplo, são importantes constituintes celulares do tecido de granulação, responsáveis pela remoção de restos extracelulares, fibrina e outros materiais estranhos no local de reparo. Os macrófagos também produzem TGF- β , PDGF e fator básico de crescimento dos fibroblastos (bFGF) e portanto promovem a migração e a proliferação dos fibroblastos. O TGF- β que é produzido pela maioria das células no tecido de granulação, causa migração e proliferação dos fibroblastos, aumento na síntese de colágeno e fibronectina e diminuição da degradação da MEC por metaloproteinases. Também é quimiotático para monócitos e provoca angiogênese *in vivo*, possivelmente ao induzir o influxo de macrófagos (ROBBINS *et al.*, 1996).

À medida que progride o reparo, o número de células endoteliais e fibroblastos proliferantes diminuem. Os fibroblastos progressivamente tornam-se mais ativos e depositam quantidades aumentadas de MEC. Os colágenos fibrilares formam uma importante parte do tecido conjuntivo nos sítios de reparo e são importantes no desenvolvimento da resistência na cicatrização de feridas. A síntese de colágeno pelos fibroblastos começa numa fase relativamente precoce (dentro de 3 a 5 dias) e prossegue por várias semanas. Muitos dos mesmos fatores de crescimento que regulam a proliferação de fibroblastos também estimulam a síntese da MEC. Assim, por exemplo, a síntese de colágeno é intensificada por diversos fatores, incluindo fatores de crescimento, PDGF, FGF, TGF- β e citocinas IL-1 e IL-4 que são secretados por macrófagos, linfócitos e fibroblastos nas feridas em cicatrização (ROBBINS *et al.*, 1996).

Os macrófagos atuam na inflamação (TANG *et al.*, 2000; WOODS *et al.*, 2000) (seja promovendo-a ou inibindo-a), no reparo e na renovação de tecidos, na fagocitose e subsequente digestão de microorganismos, e na interação das imunidades inata e adquirida (HANDEL-FERNANDEZ e LOPÉZ, 2000; WOODS *et al.*, 2000). Assim como os outros fagócitos mononucleares, os macrófagos possuem grande capacidade de produção e secreção de moléculas, o que explica as suas inúmeras atuações celulares (ALLAVENA *et al.*, 2000), como mostra a Tabela 1.

Os macrófagos têm sua origem na medula óssea a partir da célula progenitora denominada unidade formadora de colônia – granulócitos e monócitos (Colony Forming Unit – Granulocyte Monocyte, CFU-GM) (GARTNER e HIATT, 1993). A CFU-GM dá origem inicialmente aos monoblastos que proliferam e se diferenciam em pró-monócitos e posteriormente geram os monócitos (AUGER e ROSS, 1992). Os monócitos se mantêm na medula óssea por cerca de 24 horas antes de entrar na

circulação periférica (FURTH e VAN AND SLUITER, 1986; MEURET e HOFFMANN, 1973) onde permanecem, em média, por 25 horas (AUGER e ROSS, 1992).

Uma vez estabelecidos nos tecidos, os monócitos amadurecem e se tornam macrófagos. Os macrófagos podem exibir morfologias diferentes após serem ativados por estímulos externos, tais como microrganismos – ou seus fragmentos – e corpos estranhos. Alguns desenvolvem um citoplasma abundante e são chamados de células epitelióides devido a sua semelhança com células epiteliais da pele. Macrófagos ativados podem se fundir para formar células gigantes multinucleadas. Os macrófagos estão presentes em todos os órgãos e no tecido conjuntivo e recebem nomes especiais para designar localizações específicas, no sistema nervoso central eles são chamados de micróglia; na superfície do endotélio dos sinusóides hepáticos são chamados de células de Kupffer; nas vias aéreas são chamados de macrófagos alveolares e as células fagocitárias multinucleadas dos ossos são chamadas de osteoclastos (ABBAS e LICHTMAN, 2005).

Mais uma característica dos macrófagos é a sua capacidade de apresentar-se em diferentes estados funcionais (residente, ativado e estimulado), o que é determinado pelos sinais estimulatórios e inibitórios do microambiente em que se encontram, como ocorre na cavidade peritoneal, onde os macrófagos residentes são considerados células quiescentes (LU *et al.*, 1999).

Os macrófagos participam das interações bidirecionais entre a imunidade inata e adquirida: na imunidade inata têm a capacidade de fagocitar partículas estranhas (microrganismos e macromoléculas) e produzir citocinas (ABBAS e LICHTMAN, 2005); na imunidade adquirida, atuam como células apresentadoras de antígeno para os linfócitos T e podem ser ativados pelos mesmos, tornando-se células efetoras. Neste caso, o linfócito T é responsável pela liberação de citocinas que

estimulam a sua capacidade microbicida (LU *et al.*, 1999) e o linfócito B, responsável pela produção de anticorpos opsonizantes (AUGER e ROSS, 1992). Por este motivo, alterações na funcionalidade dos macrófagos podem modular a progressão da resposta imunológica.

Os macrófagos, em geral, respondem a dois estímulos seqüenciais, o primeiro é o estímulo iniciador e o segundo com o disparador. A ativação dos linfócitos T ou *Natural Killer* (NK) resulta na liberação de interferon γ (INF- γ) que inicia a ação efetora do macrófago, pela produção de fator de necrose tumoral (TNF- α) e do óxido nítrico (NO $^-$). Além disso, o INF- γ aumenta a sensibilidade do macrófago às substâncias que agem como “gatilhos” disparadores, entre as quais se destacam o lipopolissacarídeo (LPS), que estimula a atividade bactericida e o éster de forbol-miristato (PMA), que estimula a produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (PICK e MIZEL, 1981).

Tabela 1 – Seleção de produtos secretados por fagócitos mononucleares.

GRUPO FUNCIONAL	MOLÉCULAS
Moléculas tóxicas de vida curta	Intermediários reativos do oxigênio (Ex: H ₂ O ₂) Intermediários reativos do nitrogênio (ex: NO $^-$)
Produtos da Cicloxigenase / Lipoxigenase	Prostaglandinas (PG E ₂) Leucotrienos (LT B ₄)
Enzimas e Fatores de coagulação	Fatores tissulares: Fator IX, X, V e protrombina Ativadores / Inibidores de plasminogênio, tipo uroquinase
Componentes do Sistema Complemento	Via Clássica (C1, C2, C3, C4, C5)

	Via alternativa (Fator B, D e properdina)
Fatores de Crescimento	Fatores de crescimento derivados de plaquetas – (PDGF) Fatores de crescimento para fibroblasto (FGF)
Fatores hematopoiéticos	Fator estimulador da formação de colônias-macrófagos
Citocinas pró-inflamatórias primárias	Interleucina -1 (IL-1), TNF (Fator de necrose tumoral), IL-6, IL-12, IL18
Citocinas pró-inflamatórias secundárias	Quimiocinas (1-4)
Citocinas anti-inflamatórias	IL-10; fatores transformadores de crescimento β (TGF- β)
Receptores de citocinas	Receptor tipo II para IL-1, receptor para TNF.

(Adaptado de ALLAVENA *et al.*, 2000)

1.2 Ultra-som

O ultra-som (US) é uma onda mecânica, uma vez que é som, mas não é audível aos ouvidos humanos devido à sua elevada frequência, que transcende a capacidade do aparelho auditivo humano (ter HAAR, 1978). A propagação do ultra-som ocorre pela transmissão da onda de molécula para molécula do meio em que o ultra-som está sendo aplicado (ter HAAR, 1978). A onda ultra-sônica depende dos parâmetros como, intensidade e frequência. A intensidade determina quanta vibração e pressão será imposta às moléculas irradiadas. A frequência do ultra-som apresenta uma relação inversa com a penetração da onda (ter HAAR, 1978).

Se aplicado em tecidos, o US é capaz de produzir efeitos biológicos, os quais são decorrentes do efeito mecânico produzido pela onda ultra-sônica (ter HAAR, 1978). Estes efeitos são a micromassagem e o aquecimento, ou mecanismos não térmicos e mecanismos térmicos, respectivamente.

A micromassagem é o mecanismo não térmico que ocorre pela passagem da onda ultra-sônica pelos tecidos, produzindo um efeito de vibração das moléculas teciduais e, por conseqüência, nos tecidos como um todo (NYBORG e ZISKIN, 1985; HOOGLAND, 1986). Para que somente este efeito seja produzido nos tecidos, é necessária a utilização do ultra-som no modo pulsado, para que haja tempo para ocorrer à dissipação da energia gerada pela passagem das ondas ultra-sônicas (NYBORG e ZISKIN, 1985; HOOGLAND, 1986; LOW e REED, 2001). Quanto maior o tempo de passagem de ondas ultra-sônicas por unidade de tempo durante uma aplicação ultra-sônica, maior será a produção do efeito térmico (HOOGLAND, 1986).

O aquecimento é o mecanismo térmico que é produzido pela passagem da onda ultra-sônica pelos tecidos, sobretudo quando da utilização do modo contínuo do ultra-som. O aquecimento dos tecidos é decorrente do aumento do estado de agitação molecular (efeito mecânico), o que aumenta o atrito entre as moléculas e células, produzindo calor (HOOGLAND, 1986). Este aquecimento ocorre preferencialmente em tecidos ricos em colágeno, como tendões, cápsulas articulares, ligamentos e fâscias musculares (NYBORG e ZISKIN, 1985).

BAKER, ROBERTSON e DUCK (2001) consideram incorreto classificar separadamente os efeitos do ultra-som terapêutico (UST) em térmico (UST contínuo) e não-térmico (UST pulsado) porque os dois efeitos não estão totalmente separados. Sempre os efeitos não-térmicos serão acompanhados por aquecimento devido à interação entre o UST e o tecido ser simultaneamente térmica e mecânica.

A passagem da onda ultra-sônica pelos tecidos também pode levar à produção de pequenas bolhas (de gás ou vapor), processo denominado cavitação. Estas bolhas de gás movimentam-se no interior das células de acordo com o campo ultra-sônico, variando de tamanho de acordo com a área de compressão, ou expansão, da onda ultra-sônica. (NYBORG e ZISKIN, 1985; HOOGLAND, 1986). Esta cavitação pode ser de dois tipos: estável e transiente (ou inercial).

A cavitação estável é a formação de pequenas bolhas de gás no interior de qualquer meio fluido, com movimentos rítmicos produzidos pelo campo ultra-sônico e que oscilam de acordo com as áreas de pressão, positivas e negativas, sem, no entanto, entrar em colapso. Após a aplicação do ultra-som, estas bolhas se desfazem, pela dissolução do gás. Este tipo de cavitação pode estar relacionado com os efeitos mecânicos do ultra-som, gerando um fluxo acústico no meio percorrido pelas ondas ultra-sônicas (ter HAAR, 1978).

A cavitação transiente é a formação de pequenas bolhas de gás no interior das células, que aumentam seu tamanho até entrarem em colapso violento, por terem excedido o seu volume de equilíbrio. Este fenômeno pode causar lesões de estruturas celulares (ter HAAR, 1978; NYBORG e ZISKIN, 1985).

Por ser capaz de penetrar em tecidos e de produzir efeitos biológicos, o US pode ser usado com fins terapêuticos. O aparelho de UST consiste de um gerador que produz uma corrente alternada de alta frequência. Para fisioterapia utilizam-se frequências entre 0,5 e 5,0 MHz (LEHMANN; DE LAUTER, 1994; ter HAAR, 1978). Para tal, transdutores piezoelétricos são utilizados. Estes transdutores consistem em um disco de um material natural, como o quartzo, ou uma cerâmica sintética feita de uma mistura de sais complexos, tais como o chumbo, zirconato e o titanato (PZT), que podem ser polarizados em processos de carga (WILLIAMS, 1987). Esse elemento piezoelétrico transforma energia acústica em energia elétrica e

seu reverso, energia elétrica em acústica (KAHN, 1991; HEKKENBERG; OOSTERBAAN, 1985). A corrente alternada que supre o elemento piezoelétrico pode ser modulada criando diferentes modalidades de insonação: contínua e pulsada. Em função disto, a intensidade é também dependente do tempo (HEKKENBERG; OOSTERBAAN, 1985).

O tempo de irradiação é uma variável muito importante para os tratamentos com ultra-som, já que o campo próximo do ultra-som não apresenta grande uniformidade, o que pode gerar picos de intensidade que podem ser prejudiciais para os tecidos irradiados. Quanto menor a relação *on/off* do ultra-som pulsado, menor será o aquecimento produzido por este recurso, devido ao fato de haver tempo suficiente para a dissipação da energia imposta ao tecido pela onda ultra-sônica (HOOGLAND, 1986; LOW e REED, 2001). Assim sendo, deve-se ter o cuidado de mover o transdutor para que não haja a concentração de energia em uma única área (NYBORG e ZISKIN, 1985; ter HAAR, 1978, LOW e REED, 2001).

O ultra-som terapêutico tem sido utilizado no restabelecimento das funções e na promoção da cicatrização de tecidos musculares (GOUVEA; VIERA; AMARAL, 1998), tendinosos (CUNHA; PARIZOTTO; VIDAL, 2001) e ósseos (DUARTE, 1983; DUARTE; XAVIER, 1983). Desde a introdução deste recurso terapêutico, há mais de 5 décadas, as ações biológicas do ultra-som têm sido alvo de estudos. Porém os efeitos mecânicos, térmicos e químicos do ultra-som ainda não foram totalmente estabelecidos. Sua aplicação, entretanto, leva a inúmeros bioefeitos (DYSON, 1987; KITCHEN; PARTRIDGE, 1990). As conseqüências biológicas dos mecanismos térmicos são, o aumento da elasticidade de estruturas que contém colágeno, a diminuição da rigidez articular, a diminuição da dor e do espasmo muscular e o aumento do fluxo sanguíneo. Os mecanismos não térmicos induzem reações orgânicas, que geralmente se manifestam em nível vascular e tecidual, como o

aumento do metabolismo celular, do fluxo sangüíneo e do suprimento de oxigênio, produzindo alteração da permeabilidade da membrana celular e facilitando o fluxo de nutrientes (DYSON, 1987; SUCKLING, 1978).

No estágio agudo do processo inflamatório, os efeitos da cavitação estável e da corrente acústica parecem aumentar a difusão do cálcio através da membrana celular. Isso é de grande importância, já que o cálcio, como “segundo mensageiro” celular, pode ter um efeito acentuado no aumento da produção e liberação de fatores que contribuem para a cicatrização. Isso inclui a liberação de histamina dos mastócitos e, muito importante, fatores liberados dos macrófagos. Desse modo, o ultra-som tem o potencial de acelerar a resolução normal da inflamação desde que o estímulo inflamatório seja removido. Essa aceleração pode também se dever à suave agitação do líquido dos tecidos que pode aumentar a taxa de fagocitose e o movimento das partículas e das células. Deve-se observar que o ultra-som tem uma ação pró-inflamatória e não anti-inflamatória. Às vezes considera-se que o ultra-som terapêutico resulta em aumento no fluxo sangüíneo local (LOW & REED, 2001). Contudo, RUBIN *et al.* (1990) observaram que o efeito agudo do ultra-som é uma vasoconstrição das pequenas arteríolas até um ponto que ocorram reduções locais no fluxo sangüíneo. Acredita-se que o ultra-som estimule o crescimento de novos capilares no tecido isquêmico crônico, o qual poderia acontecer durante o reparo de tecidos moles após lesão (LOW & REED, 2001).

Durante o reparo, os fibroblastos podem ser estimulados pelo UST a produzir mais colágeno. Isso parece ocorrer devido ao já citado aumento na permeabilidade da membrana celular, causado pelo UST, permitindo a entrada de íons cálcio que controlam a atividade celular. Não só é formado mais colágeno, como também este apresenta maior força tênsil após o tratamento (LOW & REED, 2001).

Foi observado o aumento da liberação de fatores de crescimento pelos macrófagos após exposição ao ultra-som terapêutico. Isso pode ser a causa da proliferação de fibroblastos que ocorre nos níveis terapêuticos de ultra-som, já que parece não ocorrer um efeito estimulador direto sobre as células fibroblásticas (YOUNG e DYSON, 1990).

MAXWELL (1992), em uma revisão, observou que o ultra-som pode gerar radicais livres que, quando em excesso, seriam prejudiciais, podendo o momento da terapia ser crítico para tanto. Nesse contexto DYSON (1989) sugere que o tratamento com ultra-som feito nas primeiras duas semanas após a lesão acelera a consolidação óssea. Porém, quando aplicado em uma fratura instável durante a fase de formação de cartilagem, pode resultar na proliferação de condrócitos, causando um retardo na consolidação.

Considera-se que o ultra-som atue também na fase de remodelamento, melhorando a extensibilidade do colágeno maduro, como o que é encontrado no tecido cicatricial. Acredita-se que isso ocorra com a promoção da reorientação das fibras (remodelamento), levando a uma maior elasticidade sem perda de força. Essas alterações benéficas parecem ocorrer de forma mais evidente quando o tratamento é iniciado no estágio inflamatório (LOW & REED, 2001).

Vários estudos em animais mostram que o ultra-som aplicado com intensidades terapêuticas facilita a cicatrização de feridas. Apesar de alguns estudos serem pouco consistentes e não esclarecerem o modo de ação do ultra-som, um estudo bem controlado que usavam suínos relatou que o ultra-som aumentava significativamente a força e a velocidade de fechamento da ferida. Embora a qualidade visual das feridas não tenha sido afetada, ocorreu uma maior degranulação dos mastócitos após o tratamento. Esses resultados ocorreram na primeira semana de tratamento pós-lesão e as mudanças no

colágeno foram quantificadas, sendo cerca de 25% maiores do que as ocorridas nos controles (LOW & REED, 2001).

Do mesmo modo, em um estudo de taxas de contração da ferida em ratos, HART e DYSON (1991) concluíram que aplicações diárias de ultra-som a 3 MHz com 0,1 e 0,5 W/cm² por cinco minutos causaram contração significativamente maior do que a que ocorreu nos controles com tratamento placebo. O tratamento foi aplicado por cinco dias, mas a contração continuou a ser maior mesmo nos 6 dias subseqüentes.

A aplicação de ultra-som acelera a fase inflamatória do processo de cicatrização tecidual. A aplicação de ultra-som contínuo influencia de forma positiva a atividade dos macrófagos e aumenta a adesão de leucócitos e células endoteliais danificadas. Quando o ultra-som é aplicado durante a fase de proliferação, ele estimula a divisão celular (STARKEY, 2001).

O ultra-som contínuo de baixa freqüência (0,75 MHz) intensifica a proliferação de fibroblastos, ao passo que o ultra-som de alta freqüência (3MHz) aumenta a capacidade destes sintetizar e secretar colágeno, o que ocorre principalmente nos tendões (YOUNG e DYSON, 1990).

As feridas superficiais também respondem favoravelmente à aplicação de ultra-som. O uso de ultra-som contínuo na freqüência 1MHz e intensidade de 1,5 W/cm², durante duas semanas após a lesão, aumenta a força de rompimento das feridas incisionais. O mesmo regime de aplicação em intensidade menor (0,5 W/cm²), produziu os mesmos resultados de aumento da força de rompimento depois de uma semana e a facilitação da deposição de colágeno durante a segunda semana (STARKEY, 2001).

No estágio agudo da lesão, o emprego imediato de ultra-som contínuo é contra-indicado em razão da elevada temperatura do tecido e do aumento da necessidade de oxigênio associada. Por essa razão, a aplicação de ultra-som durante os

estágios, agudo e subagudo da inflamação deve ser executada com um ciclo de funcionamento baixo e sob baixa intensidade (STARKEY, 2001).

YOUNG e DYSON (1990) estimularam a linhagem de macrófagos U937 com UST nas frequências de 0,75MHz e 3MHz na intensidade de 0,5W/cm². Os resultados mostraram que a frequência 0,75MHz parece ser mais efetiva na estimulação da liberação de substâncias mitogênicas pré-formadas das células; a frequência 3MHz parece ser melhor em estimular a habilidade das células em sintetizar fatores; mostraram também que não houve mudança significativa na viabilidade das células após estimulação com UST em ambas as frequências.

Em outro experimento REHER *et al.* (1999) estimularam osteoblastos, fibroblastos e monócitos humanos com UST nas frequências de 1MHz e 45KHz. Os resultados mostraram a produção de fatores de angiogênese tais como IL-8, FGF e VEGF, sugerindo que este pode ser um dos mecanismos pelos quais o UST induz a angiogênese e a cicatrização.

2. OBJETIVO

Baseado na importância dos macrófagos nos processos inflamação, reparo e cicatrização e do UST como instrumento para acelerar tais processos este estudo propôs avaliar a viabilidade dos macrófagos *in vitro* após a estimulação com UST de 1MHz.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos isogênicos da linhagem BALB/c com idade entre 8 – 10 semanas, obtidos do CEDEME – Universidade Federal de São Paulo (Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais). Os animais foram anestesiados em câmara de éter etílico e sacrificados por deslocamento cervical.

3.2 Obtenção e cultura dos macrófagos:

Para obtenção dos macrófagos, os animais foram sacrificados e logo após, retirados os fêmures direitos. Após secção das epífises foi realizada lavagem medular, para obtenção de células tronco. Para tanto, foi utilizada seringa de 3 mL contendo solução RPMI 1640 (SIGMA – Saint Louis, EUA) e agulha de 0,45 x 13 (BECTON DICKINSON).

A lavagem de cada fêmur foi depositada em tubos de centrífuga de 15 mL (CORNING), individualmente. Os tubos foram submetidos ao processo de centrifugação durante 5 minutos a 2.500 rpm a 4°C (Figura 1).

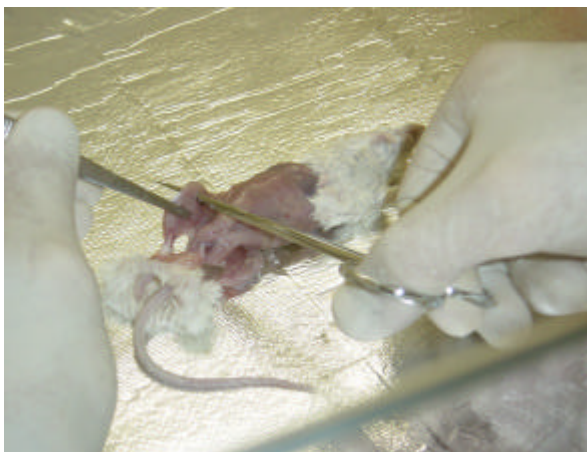
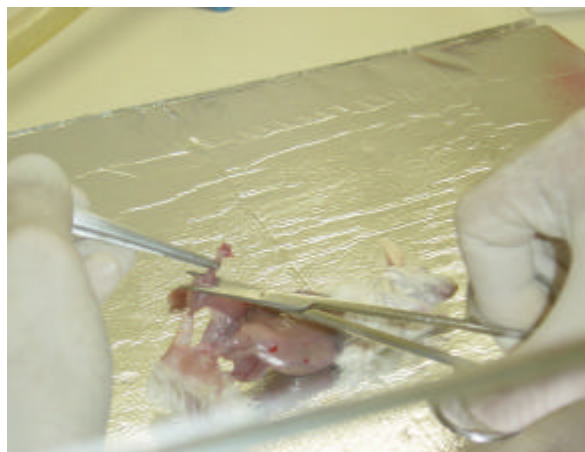
Concluído o processo de centrifugação, foi desprezado o sobrenadante de cada tubo e o botão celular ressuspenso em solução contendo 3 mL de sobrenadante de cultura de células L-929 (linhagem de fibroblastos que produz fatores de diferenciação para macrófago), 2 mL de soro fetal bovino e 5 mL de RPMI 1640 (SIGMA – Saint Louis, EUA). As células foram mantidas em cultura em estufa a temperatura de 37° C e 5% de CO² durante 5 dias, para diferenciação das células precursoras em macrófagos.

Após 5 dias, o sobrenadante contido em cada garrafa foi desprezado. Para cada garrafa foi adicionado 15 mL de RPMI 1640 (SIGMA – Saint Louis, EUA) no primeiro regime de tratamento e 20 mL para o segundo e terceiro regime de

tratamento, sendo cada garrafa mantida em recipiente contendo gelo durante aproximadamente dez minutos com a finalidade de facilitar a desadesão celular. Posteriormente, foi utilizado o *cell scraper* para provocar a desadesão dos macrófagos. Esta suspensão celular foi homogeneizada, utilizando-se pipetador com o objetivo de desagregar grumos de células, normalmente formados após a desadesão. O conteúdo obtido foi dividido em três porções de 5 mL cada e depositados em 3 tubos de centrifuga de 50 mL no primeiro regime de tratamento, e quatro porções de 5 mL depositadas em 4 tubos de centrifuga de 50mL para o segundo e terceiro regime de tratamento, contadas as células de cada tubo e imediatamente conduzidas ao processo de estimulação pelo ultra-som terapêutico.

Todos os procedimentos acima descritos foram realizados em condições estéreis.

Para a realização de cada experimento foram utilizados 6 animais (n=6), cada um fornecendo uma medula para a cultura de macrófagos.

A**B**

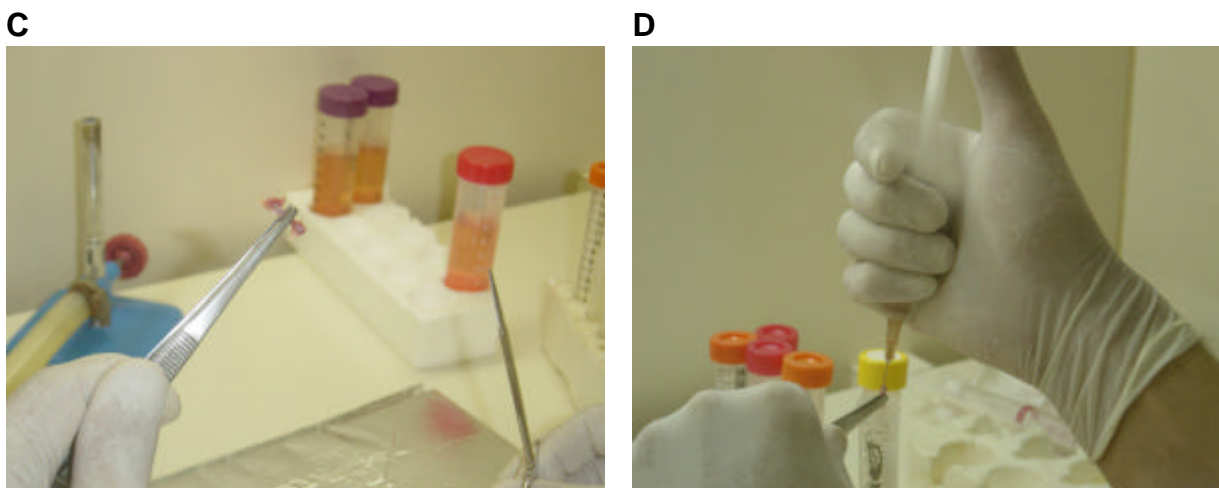


Figura (1) Imagem representativa do procedimento de retirada da musculatura (A), desarticulação e retirada do fêmur direito (B), fêmur direito desarticulado e retirado (C), lavagem medular do fêmur (D).

3.3 Ultra-som Terapêutico (UST)

Foi utilizado um aparelho de UST com frequência de 1MHz (SONACEL EXPERT 1MHz – BIOSET®) com transdutor de 3,5cm² de área de radiação efetiva (ERA), devidamente calibrado para realização do experimento. A calibração foi feita em uma balança de radiação na empresa fabricante.

Para atingir maior potência, a cerâmica do equipamento foi trocada e o equipamento recalibrado. A intensidade mostrada no display do equipamento não será a correta neste caso, portanto o usuário deve seguir a seguinte tabela:

Tabela 2: intensidades do aparelho

<i>I mostrada no display</i>	<i>I real (W/cm²)</i>	<i>Potência (W)</i>
0,1	0,5	1,75
0,2	1	3,5
0,3	1,5	5,25
0,4	2	7
0,5	2,5	8,75
0,6	3	10,5

3.4 Tanque de irradiação

Para o procedimento de irradiação dos macrófagos *in vitro* foi utilizado um tanque projetado pelos autores deste trabalho adaptado do modelo de YOUNG & DYSON (1990).

O tanque de irradiação foi construído em vidro com espessura de 3mm, comprimento de 45cm e altura de 25cm; acoplado sobre uma base de madeira, onde foram fixadas duas hastes de alumínio com aproximadamente 55 cm de altura. Nas extremidades destas hastes foi fixada uma régua de 60cm ligando uma haste à outra. Foram encaixadas na régua duas hastes do mesmo material, com a finalidade de fixar o transdutor do UST e o tubo contendo o material a ser estimulado, com a possibilidade de regular a distancia entre o transdutor e o tubo (Figura 2).



Figura (2) Imagem do tanque de irradiação e UST.

3.5 Irradiação Celular:

Os tubos contendo as células previamente contadas foram submetidos ao processo de irradiação pelo UST.

Para saber as propriedades atenuantes do tubo, foram realizados testes pelo sistema automático de mapeamento de campo acústico da empresa BIOSET Indústria de Tecnologia Eletrônica Ltda. (Rio Claro, São Paulo, Brasil). O sistema utiliza um hidrofone de 0,4mm de diâmetro e precisão no posicionamento de 0,0125mm. Os testes foram feitos com o tubo a uma distância de 8 cm da fonte de ultra-som. Foram também

realizados testes na balança de radiação com o tubo e os resultados mostraram uma atenuação de 45% da potência do equipamento.

Os tubos foram então submersos no tanque de irradiação, previamente preenchido com água destilada a 8 cm da fonte de ultra-som, mantendo uma temperatura de aproximadamente 26°C, aferida com termômetro analógico.

Tratamento 1: As células foram expostas ao UST nos modos contínuo e pulsado a 100Hz 1/2 (50% *on* / 50% *off*) a uma frequência de 1MHz e a intensidade de 0.5W/cm², durante 5 minutos.

Tratamento 2: As células foram expostas ao UST no modo contínuo a uma frequência de 1MHz e intensidades de 0.5; 1,0; 1,5; 2,0W/cm², durante 5 minutos. Intensidades estas presentes nos aparelhos de UST convencionais.

Tratamento 3: As células foram expostas ao UST no modo contínuo a uma frequência de 1MHz e intensidades de 0.5; 2,0; 2,5; 3,0W/cm², durante 5 minutos. As intensidades de 2,5 e 3,0W/cm² não são comumente apresentadas nos aparelhos de UST convencionais.

3.6 Viabilidade Celular

A viabilidade foi avaliada com a contagem das células antes e imediatamente após a estimulação pela coloração com Azul de Trypan, na proporção de 50%, em uma câmara de Neubauer.

3.7 Regime de Tratamento 1

As células foram submetidas a 3 procedimentos diferentes: Grupo 1: Controle: tratamento placebo com UST durante 5 minutos;

Grupo 2: Pulsado: tratamento com UST no modo pulsado a 100Hz a 1/2 com a frequência de 1MHz e intensidade de $0,5\text{W}/\text{cm}^2$ durante 5 minutos;

Grupo 3: Contínuo: tratamento com UST no modo contínuo com a frequência de 1MHz e intensidade de $0,5\text{W}/\text{cm}^2$ durante 5 minutos.

3.8 Regime de Tratamento 2

As células foram submetidas a 4 procedimentos diferentes:

Grupo 1: tratamento com UST no modo contínuo com a frequência de 1MHz e intensidade de $0,5\text{W}/\text{cm}^2$ durante 5 minutos.

Grupo 2: tratamento com UST no modo contínuo com a frequência de 1MHz e intensidade de $1,0\text{W}/\text{cm}^2$ durante 5 minutos.

Grupo 3: tratamento com UST no modo contínuo com a frequência de 1MHz e intensidade de $1,5\text{W}/\text{cm}^2$ durante 5 minutos.

Grupo 4: tratamento com UST no modo contínuo com a frequência de 1MHz e intensidade de $2,0\text{W}/\text{cm}^2$ durante 5 minutos.

3.9 Regime de Tratamento 3

As células foram submetidas a 4 procedimentos diferentes:

Grupo 1: tratamento com UST no modo contínuo com a frequência de 1MHz e intensidade de $0,5\text{W}/\text{cm}^2$ durante 5 minutos.

Grupo 2: tratamento com UST no modo contínuo com a frequência de 1MHz e intensidade de $2,0\text{W}/\text{cm}^2$ durante 5 minutos.

Grupo 3: tratamento com UST no modo contínuo com a frequência de 1MHz e intensidade de $2,5\text{W}/\text{cm}^2$ durante 5 minutos.

Grupo 4: tratamento com UST no modo contínuo com a frequência de 1MHz e intensidade de $3,0\text{W}/\text{cm}^2$ durante 5 minutos.

3.10 Análise dos resultados

Para cada animal, o número de células viáveis pós-estimulação foi dividido pelo número de células viáveis pré-estimulação e multiplicado por 100%. Foi feita, então a média aritmética das percentagens, a qual foi expressa em gráficos de barras.

A análise estatística foi realizada por meio da Análise de Variância de Uma Via (ANOVA de 1 via), seguida, quando aplicável, do teste a *posteriori* de Tukey. Considerou-se 95% o grau de significância.

4. RESULTADOS

4.1 Tratamento 1

Após a realização dos 3 experimentos do regime de tratamento 1, foram obtidos os seguintes valores médios: Grupo 1 Placebo, 97,64% de células viáveis; Grupo 2 Pulsado, 94,62% de células viáveis; Grupo 3 Contínuo, 94,91% de células viáveis conforme gráfico a seguir.

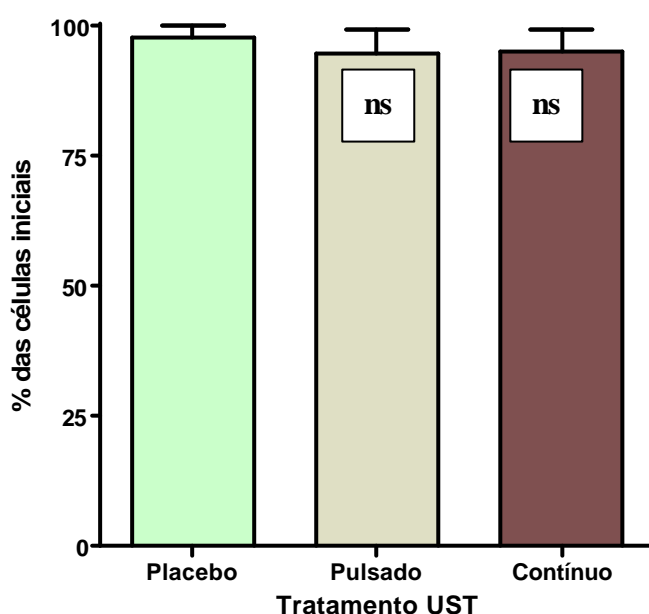


Figura (3): Análise gráfica apresentando a percentagem de macrófagos viáveis em cada grupo após a estimulação com UST dos 3 experimentos realizados. Os desvios padrões são apresentados. Grupo 1: Placebo, Grupo 2: Pulsado, Grupo 3: Contínuo. (P>0,05)

Os valores médios obtidos após a realização dos 3 experimentos demonstram que não houve alteração significativa na viabilidade entre os grupos tratados com UST ($P>0,05$).

4.2 Tratamento 2

Após a realização dos experimentos do regime de tratamento 2, obtiveram-se os seguintes resultados.

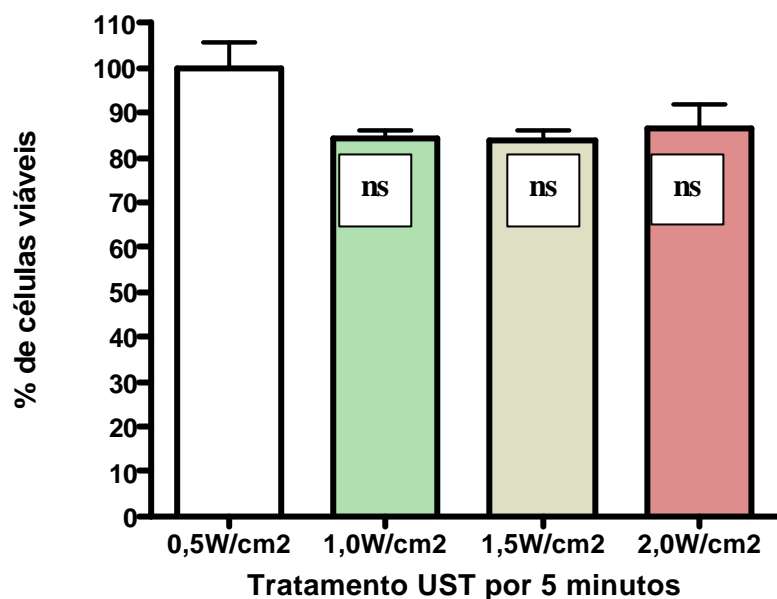


Figura (4): Análise gráfica apresentando a percentagem de macrófagos viáveis em cada grupo após a estimulação com UST. Os desvios padrões são apresentados. Grupo 1: 0,5W/cm², Grupo 2: 1,0W/cm², Grupo 3: 1,5W/cm², Grupo4: 2,0W/cm².

Os resultados obtidos demonstram que não houve alteração significativa na viabilidade entre os grupos tratados com UST ($P > 0,05$), 99,76% a 0,5W/cm², 84,11% a 1,0W/cm², 83,88% a 1,5W/cm² e 86,49% a 2,0W/cm².

4.3 Tratamento 3

Após a realização dos experimentos do regime de tratamento 3, obtiveram-se os seguintes resultados.

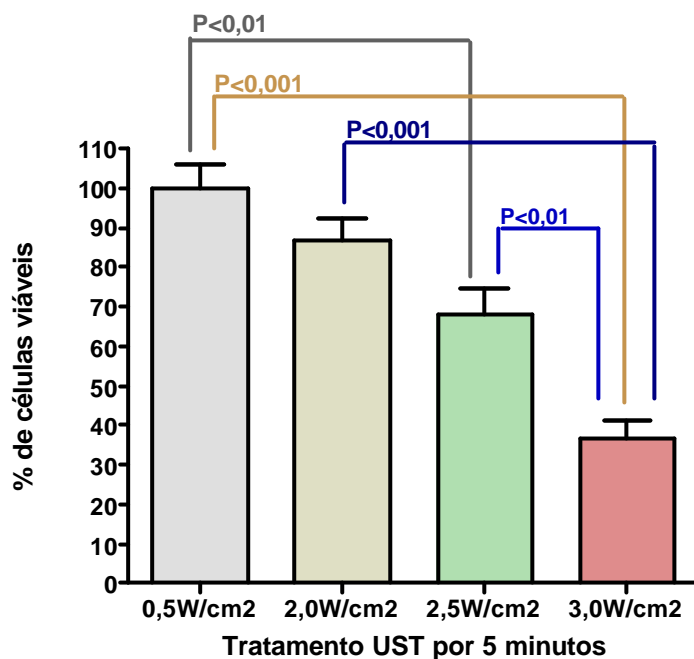


Figura (5): Análise gráfica apresentando a porcentagem de macrófagos viáveis em cada grupo após a estimulação com UST. Os desvios padrões são apresentados. Grupo 1: 0,5W/cm², Grupo 2: 2,0W/cm², Grupo 3: 2,5W/cm², Grupo4: 3,0W/cm².

Os resultados obtidos ao final do experimento demonstram que houve diferenças significativas na viabilidade de macrófagos tratados com UST conforme descrito abaixo:

Grupo 1 (99,76%) comparado com Grupo 3 (68,14%) apresentou diferença significativa na viabilidade de ($P < 0,01$);

Grupo 1 (99,76%) comparado com Grupo 4 (36,86%) apresentou diferença significativa na viabilidade de ($P < 0,001$);

Grupo 2 (86,49%) comparado com Grupo 4 (36,86%) apresentou diferença significativa na viabilidade de ($P < 0,001$);

Grupo 3 (68,14%) comparado com Grupo 4 (36,86%) apresentou diferença significativa na viabilidade de ($P < 0,01$).

5. DISCUSSÃO

Os macrófagos têm importante papel nos processos de inflamação, reparo e cicatrização tecidual (ROBBINS *et al.*, 1996). O UST é utilizado eficazmente com a finalidade de acelerar tais processos, aumentando a síntese, a qualidade e a organização do colágeno depositado (LOW & REED, 2001).

Considerando a importância do uso do UST como forma de acelerar os processos de cicatrização, nosso estudo propôs a avaliação da viabilidade dos macrófagos pós-estimulação com UST de 1MHz, em três regimes de tratamento onde o primeiro nos modos pulsado (1/2) e contínuo, a intensidade de 0,5W/cm² durante 5 minutos, o segundo no modo contínuo nas intensidades de 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0W/cm² durante 5 minutos, e o terceiro regime de tratamento no modo contínuo nas intensidades 0,5; 2,0; 2,5 e 3,0W/cm² durante 5 minutos.

A distância entre a fonte de ultra-som e o tubo contendo as células foi de 8 cm, distancia essa usada por YOUNG & DYSON (1990) em seu experimento, e o transdutor com diâmetro de 3,5 cm. Esta distância encontra-se dentro do campo próximo ou zona de Fresnel ($r^2/?$) do ultra-som usado para fins terapêuticos.

Todos os experimentos foram realizados segundo o protocolo já anteriormente descrito, apresentando os seguintes resultados:

Após a realização dos 3 experimentos, do primeiro regime de tratamento, estes foram analisados conjuntamente para obtenção de valores médios. A viabilidade celular observada foi de: 97,64% no grupo placebo; 94,62% no grupo pulsado e 94,91% no grupo contínuo (Figura 3).

O segundo regime de tratamento apresentou resultados em relação à viabilidade de 99,76% a 0,5W/cm², 84,11% a 1,0W/cm², 83,88% a 1,5W/cm² e 86,49% a 2,0W/cm² (Figura 4).

YOUNG & DYSON (1990), avaliando a resposta da linhagem celular U937 a estimulação com UST utilizando aparelhos com as frequências de 0,75MHz e 3MHz na intensidade de $0,5\text{W}/\text{cm}^2$ demonstrou não haver variação no número de células pós estimulação.

Este experimento mesmo com uma frequência diferente (1MHz) apresentou resultados semelhantes, mostrando que mesmo trabalhando com frequências diferentes a viabilidade dos macrófagos *in vitro* não sofreu alterações significativas.

Embora os resultados deste experimento estejam de acordo com o estudo realizado por YOUNG & DYSON (1990) em relação à viabilidade, faz-se importante ressaltar que o tipo celular utilizado no presente projeto foi diferente, ou seja, enquanto utilizamos macrófagos murinos obtidos através de diferenciação de células tronco medulares, YOUNG & DYSON (1990) utilizaram linhagem celular denominada U937.

Importante citar que REHER, *et al.*, (1999), embora não tenha avaliado a viabilidade celular, demonstrou que células como monócitos, fibroblastos e osteoblastos após estimulação com UST nas frequências de 1MHz e 45KHz apresentaram produção de fatores de angiogênese tais como IL-8, FGF e VEGF, sugerindo que este pode ser um dos mecanismos pelo qual o UST induz a angiogênese e a cicatrização.

JOHNS *et al.*, (2003), em seu experimento com UST de 1 e 3MHz nas intensidades de 0,1 e $0,5\text{W}/\text{cm}^2$ com estimulação de 10 minutos em esplenócitos murinos, relata não haver diferença significativa na viabilidade das células estimuladas bem como não foi observada proliferação das mesmas por outro lado, no mesmo trabalho foram observadas diferenças significativas na produção de citocinas como IL-2, IL-4 e INF- γ após estimulação com UST.

Nossos resultados demonstram não haver diminuição significativa na viabilidade dos macrófagos estimulados com UST de 1MHz nas intensidades de 0,5; 1,0; 1,5 e $2\text{W}/\text{cm}^2$ no

modelo proposto. Considera-se importante salientar que o referido modelo difere dos modelos utilizados por outros autores, levando a sugerir que as intensidades contidas na maioria dos aparelhos de UST comerciais de 0,1 a 2,0W/cm² não provocam diminuição significativa da viabilidade nas células estimuladas *in vitro*.

No terceiro regime de tratamento os resultados observados em relação à viabilidade celular foram de 99,76% a 0,5W/cm², 86,49% a 2,0W/cm², 68,14% a 2,5W/cm² e 36,86% a 3,0W/cm² (Figura 5). Tais resultados demonstraram uma queda significativa da viabilidade celular nas intensidades de 2,5 e 3,0W/cm² quando comparados com as intensidades de 0,5 e 2,0W/cm².

Após a obtenção de tais resultados buscou-se outras referências onde as referidas intensidades tivessem sido utilizadas com a finalidade de avaliar a viabilidade celular.

CHUMAKOVA *et al.*, (2006) em seu estudo utilizando UST na frequência de 3,0MHz com intensidade de 3,0W/cm² no modo pulsado a 5%, 20% 50% durante 1 minuto em conjunto com drogas anti-câncer e agentes de contraste, buscou avaliar a viabilidade de células MCF-7 (células de adenocarcinoma de mama) apresentou uma queda significativa da viabilidade celular em todos os ciclos utilizados.

No estudo realizado por FERIL *et al.*, (2002) foi utilizado o UST de 1MHz de frequência nas intensidades de 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0W/cm² durante 1 minuto, em conjunto com agentes de eco-contraste, foi avaliada a viabilidade de células U937 (linhagem celular de leucemia mielomonocítica) e os resultados obtidos demonstraram uma queda na viabilidade principalmente nas intensidades de 2,0 e 4,0W/cm², sugerindo que tais agentes apresentam potencial como adjuvantes do UST no tratamento do câncer.

Diferente de CHUMAKOVA *et al.*, (2006) e FERIL *et al.*, (2002) o presente estudo buscou avaliar a viabilidade de

macrófagos murinos usando exclusivamente a estimulação com UST, sem uso de qualquer outro adjuvante. Os resultados demonstraram uma queda significativa da viabilidade celular. Tais resultados demonstram que a estimulação somente com o UST obteve resultados semelhantes àqueles citados pelos autores acima em relação à viabilidade celular.

Acredita-se que a realização deste estudo demonstra a eficiência do modelo proposto denominado por nós “tanque de irradiação” como forma de avaliar a viabilidade dos macrófagos *in vitro* após a estimulação com UST de 1 MHz, possibilitando que futuramente novas respostas celulares possam ser avaliadas utilizando para isso o mesmo modelo.

6. CONCLUSÃO

A estimulação de macrófagos *in vitro* com UST no modelo proposto mostrou-se viável, sugerindo que estimulações em intensidades de 0,5 a 2,0 W/cm² mantêm a viabilidade das células, visto que não houve alteração significativa na viabilidade celular.

Mostra também que intensidades acima de 2,0 W/cm² podem levar a morte celular, visto que os resultados obtidos apresentaram diferenças significativas na avaliação da viabilidade das células estimuladas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; Imunologia celular e molecular. 5ª edição, Elsevier, Rio de Janeiro, 2005.

ALLAVENA, P.; BIANCHI, G.; LUINI, W.; DONI, A.; TRANSIDICO, P.; SOZZANI, Macrophage secretory products. In: PAULNOCK, D.M. (Ed.) **Macrophages**. OXFORD: **Oxford University Press**, 2000. p. 115-26.

AUGER, M.J.; ROSS, J.A. The biology of the macrophage. In: LEWIS, C.E.; McGEE, J. O'D. (Eds.) **The natural immune system: The macrophage**. Oxford: **IRL Press**, 1992. p. 1-74.

BAKER, K.G.; ROBERTSON, V.J.; DUCK, F.A. A review of therapeutic Ultrasound: Biophysical effects. **Physical Therapy**, v 81, n 7, p 1351-58, 2001.

CHUMAKOVA, O. V.; LIOPO, A. V.; EVERS, B. M.; and ESENALIEV, R. O.; Effect of 5-fluorouracil, optison and ultrasound on MCF-7 cell viability. **Ultrasound in Med. & Biol.**, vol. 32, No. 5, pp. 751-758, 2006.

CUNHA, A. PARIZZOTO, N.A., VIDAL, B.C. The effect of therapeutic ultrasound on repair of the achiles tendon (tendo calcaneus) of the rat. **Ultrasound in Medicine and Biology**, v.27, n.12, p. 1691-1696, 2001.

DUARTE, L.R. The stimulation of bone growth by ultrasound. **Archives of Orthopedic and Traumatic Surgery**, v. 101, p. 153-159. 1983.

DUARTE, L.R. e XAVIER, C.A.M. Estimulação ultrasônica do calo ósseo. Aplicação clínica. **Revisão Brasileira de Ortopedia**, v.18, n.3, p.73-80, mai/jun. 1983.

DYSON, M. Mechanisms involved in therapeutic ultrasound. **Physiotherapy**. V.73, n.3, p. 116-120, 1987.

DYSON, M. The use of ultrasound in sports physiotherapy. In Sports Injuries (**International Perspectives in Physiotherapy 4**) (Grisogono v., ed.) Edinburgh: Churchill Livingstone, 1989.

DYSON M.; SUCKLING, J., Simulation of repair by ultrasound: a survey the mechanism involved. **Physiotherapy**, v.64, n.4, p. 105-108, 1978.

FERIL, L. B. JR, KONDO, T.; ZHAO, Q.; OGAWA, R.; TACHIBANA, K.; KUDO, N.; FUJIMOTO, S.; and NAKAMURA, S. Enhancement of ultrasound-induced apoptosis and cell lysis by echo-contrast agents. **Ultrasound in Med. & Biol.**, Vol. 29, No. 2, pp. 331–337, 2003

FERRANDEZ, M.D.; DE LA FUENTE, M. Effects of age, sex and physical exercise on the phagocytic process of murine peritoneal macrophages. **Acta Physiologica Scandinava**, v.166, p. 47-55, 1999.

FURTH R.; VAN AND SLUITER, W. Distribution of blood monocytes between a marginating and a circulating pool. **Journal of Experimental Medicine**, v. 163, p. 474-479, 1986.

GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. Atlas de Histologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993. 322p.

GOUVEA, C.M.C.P.; VIEIRA, P.M.N.; AMARAL, A.C. Efeito do ultra-som na recuperação de músculo tibial anterior de rato lesado. **Revista da Universidade de Alfenas**, v.4, p. 165-173, 1998.

HANDEL-FERNANDEZ, M.E.; LOPEZ, D.M. Isolation of macrophages from tissue, fluids, and immune response sites. In: PAULNOCK, D.M. (ed.) **Macrophages**. Oxford: **Oxford University Press**, 2000. p. 1-30.

HART, J.; DYSON, M. The effect of therapeutic ultrasound on wound contraction. WCPT 11 th International Congress Proceedings, Book III, London: **World Confederation for Physical Therapy**, p.1391, 1991.

HOOGLAND, R. Terapia Ultrasônica. Enraf Norius, Delft, Holland, 1986

HEKKENBERG, R.T.; OOSTERBAAN, W.A. Evaluation of ultrasound therapy devices TNO-test, radiation safety and dose accuracy often leave something to be desired **Fisiotherapie**, v.96, n.5, p 112-117, 1985.

JOHNS, L. D.; COLLOTON, P.; NEUENFELDT, J.; KRUPPO, K. **Cytokine** 22 (2003) 55-61.

KAHN, J. Ultrasound in Principles and Practice of Electrotherapy, Churchill Livingstone, NY, 2a. ed., 1991, Cap.4, p.51-70.

KITCHEN, S.S.; PARTRIDGE C.J. A review of therapeutic ultrasound. Part 1: Background and physiological effects. **Physiotherapy**, 76(10), p. 593-600, 1990.

LEHMANN, J.F., DE LATEUR, B.J. Diatermia e calor superficial, laser e crioterapia. In: KROTE, F.J.; LEHMANN, J.F. Tratado de medicina física e reabilitação de KRUSEN. 4ª ed. Rio de Janeiro: Manole Ltda, 1994.

LEWIS, C.E.; McGEE, J. O'D. (Eds.) The natural immune system: The macrophage. **Oxford: IRL Press**, 1992. 423p.

LOW, J. & REED, A. Eletroterapia Explicada, Princípios e Prática. Terceira edição, ed. Manole, 2001.

LU, Q., CEDDIA, W.A., PRICE, E.A., YE, S.M.; WOODS, J.A chronic exercise increases macrophage-mediated tumor cytotoxicity in young and old mice. **American Journal of Physiology**, v. 276, p. R482-R489, 1999.

MAXWELL, L. Therapeutic ultrasound: its effect on the cellular and molecular mechanisms of inflammation and repair. **Physiotherapy**, 78, 1992.

MEURET, G.; HOFFMANN, G. Monocyte kinetic studies in normal and diseases states. **British Journal of Haematology**. V.24, p. 275-285, 1973.

NYBORG, W. L., ZISKIN, M.C. Biological Effects of Ultrasound, Churchill Livingstone, New York, 1985.

PARK, J. E.; BARBUL, A. Understanding the role of immune regulation in wound healing. **The American Journal of Surgery**, v.187, p. 11S-16S, 2004.

PICK, E.; MIZEL, M. Rapid micro assay for the measurement of super oxide and hydrogen peroxide production by macrophages

using an automatic enzyme immunoassay reader. **Journal of immunological methods**, v. 46, p. 211-26, 1981.

REHER, P.; DOAN, N.; BRADNOCK, B.; MEGHJI, S.; HARRIS, M. Effect of ultrasound on the production of IL-8, basic FGF and VEGF. **CYTOKINE**, Vol. 11, No. 6 (June), 416 1999: pp 416–423

ROBBINS, S.; CONTRAN, R.; KUMAN, V. Patologia Estrutural e Funcional. 4ª edição, ed., Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, 1996.

ROIT I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. Immunologia. 5º Ed. São Paulo: Manole, 2000 294p.

RUBIN M. J.; ETCHISON M. R.; CONDRA K.A. et al., (1990) Acute effects of ultrasound on skeletal muscle oxygen tension, blood flow and capillary density. **Ultrasound Med. Biol.**, 16. 271-7.

SPECTOR, W. G.; LYKKE, A. W.; WILLOUGHBY, D. A. A quantitative study of leucocyte emigration in chronic inflammatory granulomata. **J. Pathol. Bacteriol.**, v. 93, n.1, p.101-107, 1967.

STARKEY, C.: Recursos Terapêuticos em Fisioterapia. Ed. Manole, São Paulo, 2001.

TANG, Y.; PIETRO, L.; FENG, Y.; WANG, X. Increased TNF- α and PGI₂, but not NO release from macrophages in 18-month-old rats. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 114, p. 79-88, 2000.

ter HAAR, G. Basic physics of therapeutic ultrasound. **Physiotherapy**, v. 73, p. 110-113, 1978.

WILLIAMS, R. Production and transmission of ultrasound. **Physiotherapy**, v. 73, p.113-116, 1987.

WOODS, J.A.; Exercise and neuroendocrine modulation of macrophage functions. **International Journal of sports medicine**. V.21 Suppl 1, p.S24-S30, 2000.

YOUNG S.R. and DYSON M.; Macrophage responsiveness to Therapeutic Ultrasound; **Ultrasound in Med. & Biol.**, vol. 16, No. 8, pp. 809-816, USA, 1990.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)