

O EFEITO DA RADIAÇÃO ULTRA SÔNICA EM CULTURA DE CÉLULAS DE FIBROBLASTOS

Oliveira, Rodrigo F¹, Oliveira, Deise A. A. P², Soares, Cristina P³.

¹Doutorando Engenharia Biomédica, IP&D – Univap; Coordenador e Docente Curso de Fisioterapia – Faculdade de Pindamonhangaba – Fapi. SP.

²Doutoranda Engenharia Biomédica, IP&D – Univap; Docente Curso de Fisioterapia – Faculdade de Pindamonhangaba – Fapi. SP.

³Laboratório de Biologia Celular e Tecidual – Universidade do Vale do Paraíba – Univap – IP&D
Av: Shishima Hifumi 2911CEP. 12.211-300 - São José dos Campos S.P.
rfoliveira@directnet.com.br

Resumo - O fibroblasto é a célula mais comum no tecido conjuntivo sendo o principal responsável pela formação das fibras e de material amorfo, contribuindo basicamente com a síntese de colágeno. A aplicação de ultra-som pulsado tem sido amplamente utilizado na área de fisioterapia, principalmente no que se refere às afecções do sistema músculo-esquelético. O presente estudo vem demonstrar a ação desta terapia, em diferentes intensidades efetivas, na radiação de cultura de células de fibroblasto objetivando definir uma faixa de estimulação de acordo com seus efeitos benéficos e deletérios diante dos tecidos biológicos.

Palavras-chave: ultra-som, fibroblasto, cultura de célula, radiação, tecido conjuntivo.

Área do Conhecimento: Engenharia Biomédica.

Introdução

O tecido conjuntivo caracteriza-se, morfológicamente, por apresentar diversos tipos de células, separadas por abundante material intercelular sintetizado por fibroblastos. Dentre este material intercelular podemos destacar as fibras colágenas, elásticas e reticulares que se distribuem nas variedades de tecido conjuntivo, sendo essas fibras responsáveis pelas propriedades dos tecidos. O colágeno é sintetizado por diversos tipos celulares, como fibroblasto, osteoblasto, odontoblasto, condrócito e célula muscular lisa [1].

Devido a tais características, o colágeno tem sido objeto de estudo de inúmeros pesquisadores, que procuram desenvolver equipamentos e também metodologias que auxiliem os processos naturais existentes no corpo humano, de forma a obter um melhor e mais eficaz resultado no tratamento de sistemas biológicos.

O ultra-som terapêutico, por sua vez tem se mostrado como um recurso de grande importância no que diz respeito às afecções músculo-esquelético [2]. O equipamento de ultra-som consiste em um gerador que produz corrente elétrica alternada de alta frequência, que em seguida é convertida por um transdutor em vibrações mecânicas ou acústicas. O transdutor possui um cristal que faz a conversão de corrente alternada de alta frequência em vibrações mecânicas, devido ao efeito piezoelétrico [3].

Os cristais de quartzo são os mais utilizados juntamente com os materiais cerâmicos sintéticos como titanato de bário e titanato zirconato de

chumbo – PZT [4]. Com relação aos efeitos físicos produzidos pelo ultra-som, conseguimos obter respostas significativas nos tecidos biológicos, podendo ser classificados como térmicos e mecânicos [5, 6]. Com isto o ultra-som contínuo caracteriza-se pela produção de calor enquanto que o pulsado pode apresentar-se de forma reduzida devido à fragmentação na propagação da onda [7]. O objetivo do presente estudo foi verificar o efeito da radiação ultra-sônica modo pulsado, em diferentes intensidades, aplicada em cultura de células de fibroblastos CHO – K1, avaliando a morfologia celular.

Materiais e Métodos

Linhagem celular – Células CHO-K1 (fibroblasto de ovário de Hamster) foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) e cultivadas em meio Ham-F12 (Gibco-Invitrogen), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino-SFB (Gibco-Invitrogen).

Ultra-som - Foi utilizado aparelho de Ultra Som marca KLD – Biosistemas Equipamentos Eletrônicos Ltda, modelo Avatar III, com 01 cabeçote, de um 1MHz, com ERA de 1 cm², devidamente calibrado pelo fabricante.

Irradiação – A monocamada de células CHO-K1, foram colhidas por tripsinização e a suspensão celular foi centrifugada por 5 minutos em 8000 rpm e o sedimento ressuspenso em meio Ham-F12 suplementado com 10% de SFB. As células foram plaqueadas em poços individuais em placas (TPP)

de 12 poços e mantidas *overnight* a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂.

Parâmetros do Ultra-Som

Frequência de modulação Hz	Modo de emissão	Índice de modulação %	Tempo de irradiação	Intensidade efetiva W/cm ²
100	pulsado	20	2 minutos	0,6 0,8 1,0 2,0

Para realização da radiação foram separados os seguintes grupos: controle (que não recebeu radiação) e de acordo com as intensidades efetivas acima citadas. Para a radiação ultra-sônica utilizamos placas de 12 poços com 2,4 mm de diâmetro e 1,8 mm de profundidade, contendo a cultura de células. Para um bom acoplamento da interface do ultra-som e propagação da onda mecânica os volumes dos poços foram completados com meio HAM F-12 até a borda; assim sendo, realizou-se a aplicação por 2 minutos em cada poço. Após este período as culturas foram avaliadas ao microscópio invertido, marca Leica DMIL para análise morfológica e registro das imagens.

Resultados

A seguir, observar-se as imagens das culturas de células, após radiação ultra-sônica, de acordo com cada intensidade efetiva utilizada:



Fig. 01 - Cultura de Fibroblasto. Grupo controle observa-se morfologia alongada característica deste tipo celular.

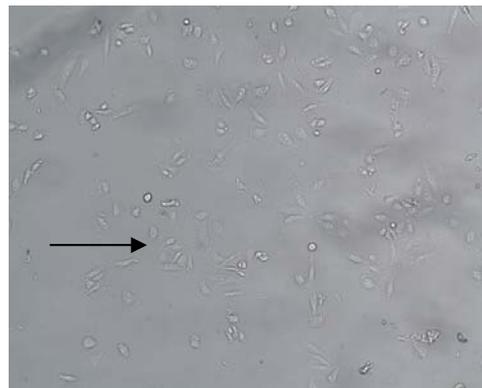


Fig. 02 - Cultura de Fibroblasto. Grupo irradiado com intensidade de 0,6 w/cm². Nota-se a manutenção da forma e integridade (seta) das células após o tratamento.



Fig. 03 - Cultura de Fibroblasto. Grupo irradiado com intensidade de 0,8 w/cm². Observa-se perda de adesão de algumas células e alteração na morfologia das mesmas (seta).

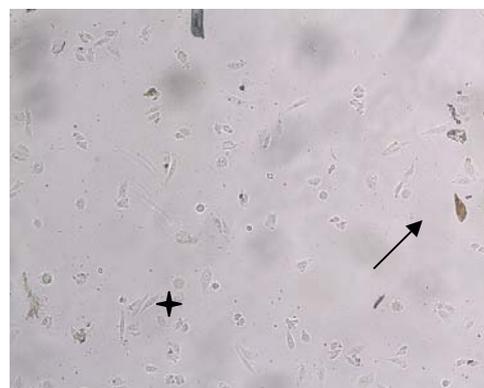


Fig. 04 - Cultura de Fibroblasto. Grupo irradiado com intensidade de 1,0 w/cm². Observa-se a presença de fragmentos celulares (seta) e redução das células aderidas (estrela).

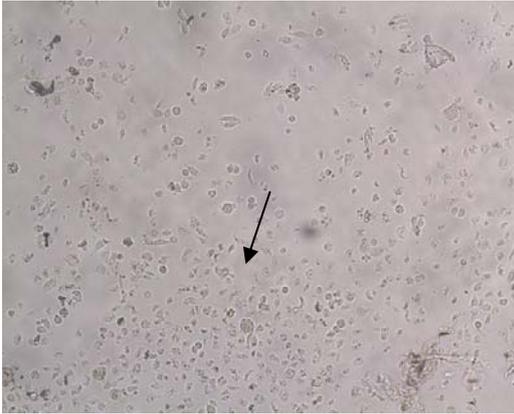


Fig. 05 - Cultura de Fibroblasto. Grupo irradiado com Intensidade de 2,0 w/cm². Observa-se completa perda de adesão com agregação de fragmentos celulares (seta).

Discussão

A análise dos resultados através da observação morfológica após aplicação do ultra-som pulsado de baixa e média intensidade demonstra que se mantendo a frequência e o índice de modulação, variando a intensidade, as células apresentam alterações irreversíveis prejudicando a proliferação celular. A literatura relata que a aplicação do ultra-som de baixa e média intensidade é eficaz na preservação da estrutura celular e conseqüente bioestimulação do tecido alvo [8, 9]. Os resultados obtidos "*in vitro*" demonstram a necessidade do controle das intensidades utilizadas de acordo com o quadro das lesões.

Mantendo-se a frequência e índice de modulação e utilizando-se intensidades de 0,6 a 0,8 W/cm² obtivemos melhores resultados, uma vez que as culturas foram mantidas pós-irradiação por até 72 horas [10]. O aumento da intensidade demonstra uma tendência a redução de células viáveis, acarretando morte celular na primeira hora pós-irradiação, contudo os resultados apresentados exibem alterações na membrana de diversos tipos de células, onde foram observadas alterações severas com conseqüente destruição, até alterações mais sutis, após irradiação com ultra-som [11]. O efeito destrutivo do ultra-som pode ser suprimido pela irradiação sob pressão, o que sugere que a cavitação seja o mecanismo físico responsável [12].

Através dos dados obtidos pretendemos avaliar a estimulação de secreção de colágeno pelos fibroblastos, acrescentando que o grau de resposta dependerá diretamente da intensidade [13].

Conclusão

De acordo com a literatura, a ação do ultra-som em meio biológico, pode provocar tanto efeitos benéficos como deletérios, dependendo da dosimetria utilizada.

Conclui-se então que, na forma pulsada predominam os efeitos não térmicos ou mecânicos, onde as vibrações ultra-sônicas causam compressões e expansões nos tecidos; contudo as aplicações de ultra-som utilizando altas intensidades de energia desencadeiam mudanças de pressão alterando toda estrutura celular (e conseqüente dano tecidual). Assim, pode-se afirmar que, o ultra-som apresenta efeitos terapêuticos, desde que, sejam observadas intensidades específicas para cada tipo de lesão, preservando as características físicas do tecido.

Agradecimentos

Agradecemos a KLD - Biosistemas Equipamentos Eletrônicos Ltda e ao Prof. Nelson Fuirini Jr. pelo apoio técnico.

Referências

- [1] JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Histologia Básica, 10 Edição, Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro R.J. 2004.
- [2] GUIRRO, R.; ELIAS, D.; SERRÃO, F.; BUCALON, A. J.; Dosimetria de Aparelhos de Ultra-Som Terapêutico Utilizando Balança Semi-Analítica. Rev. Bras. Fisiot. V.1. n.2, p. 79-82, 1996.
- [3] LEHMANN, J. F.; LATEUR, B. J.. Diatermia e Terapia Pelo Calor e Frio Superficial. In: KOTTKE, F. J. ; STILLWELL, G. K.; LEHMANN, J. F. .Krusen: Tratado de Medicina Física e Reabilitação. 3 ed. Manole, São Paulo S.P. 1984.
- [4] LOW, J.; REED, A.; Eletroterapia Explicada: Princípios e Prática. 3 ed. Manole, São Paulo S.P.,2001
- [5] DYSON, M.. Mechanisms Involved in Therapeutic Ultrasound. Physiotherapy, V. 73, n.3, p. 116-20, 1987.
- [6] YOUNG, S.; Terapia por Ultra-som. In: KITCHEN, S.; Eletroterapia: Prática Baseada em Evidências. 11 ed. Manole, São Paulo S.P., 2003.
- [7] PATRICK, M.; Applications of Therapeutic Pulsed Ultrasound. Physiotherapy, V.64, n.4, p. 103, 1978.
- [8] NOLASCO, M. A. ; Efeitos da Estimulação Ultra-sônica sobre a cicatrização da pele de ratos diabéticos. São Carlos S.P. Dissertação de Mestrado – Escola de Engenharia de São

Carlos e Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, 1993.

- [9] POSPISILOVÁ, J. ; Effect of ultrasound on collagen syntesis and deposition in experimental granuloma tissue: poibilities of clinical uses of ultrasound in healing disorders. *Acta Chirurgiae Plasticae*, V. 18, p.176-83, 1976.
- [10] HART, J.; The effect of therapeutic ultrasound on dermal repair with emphasis on fibroblast activity. Phd.Thesis, University of London, 1993.
- [11] DYSON, M. ; POND, J.B.; WOODWARD, J.; BROADBENT, J.. The production of blood cell stasis and endothelial cell damage in the blood vessels of chick embryos treated with ultrasound in a stationary wave field. *Ultrasound and Medical Biology*. V. 1, p. 133-48, 1974.
- [12] CHAPMAN, IV.; MACNALLY, NA.; TUCKER, S.; Ultrasound induced changes in the rates of influx and efflux of potassium ions in rat thymocytes in vitro. *British Journal of Radiology*. V. 47, p. 411-15, 1979.
- [13] HARVEY, W.; DYSON, M.; POND, JB, GRAHAME, R.. The stimulation of protein syntesis in human fibroblasts by therapeutic ultrasound. *Rheumatic Rehabilitation*. V. 14, p. 237, 1975.