

**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA REABILITAÇÃO**

**RAFAEL RIBEIRO**

**EFEITO DO ULTRA-SOM TERAPÊUTICO PULSADO NA PROLIFERAÇÃO E  
ATIVIDADE GELATINOLÍTICA DE CÉLULAS MUSCULARES**

**São Paulo, SP**  
**2009**

**RAFAEL RIBEIRO**

**EFEITO DO ULTRA-SOM TERAPÊUTICO PULSADO NA PROLIFERAÇÃO E  
ATIVIDADE GELATINOLÍTICA DE CÉLULAS MUSCULARES**

Dissertação apresentada à  
Universidade Nove de Julho,  
para obtenção do título de  
Mestre em Ciências da  
Reabilitação.

Orientadora: Profa. Dra. Kristianne Porta Santos Fernandes

Co-orientadora: Profa. Dra. Raquel Agnelli Mesquita Ferrari

**São Paulo, SP**

**2009**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Ribeiro, Rafael.

Efeito do ultra-som terapêutico pulsado na proliferação e atividade gelatinolítica de células musculares. / Rafael Ribeiro. 2009.

58 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2009.

Orientador (a): Prof. Dra. Kristianne Porta Santos Fernandes

1. Ultra-som. 2. Mioblastos. 3. C2C12. 4. Proliferação. 5. Zimografia.

CDU 615.8

## **TERMO DE APROVAÇÃO**

### **EFEITO DO ULTRA-SOM TERAPÊUTICO PULSADO NA PROLIFERAÇÃO E ATIVIDADE GELATINOLÍTICA DE CÉLULAS MUSCULARES.**

**POR**

**RAFAEL RIBEIRO**

Dissertação apresentada à  
Universidade Nove de Julho,  
para obtenção do título de  
Mestre em Ciências da  
Reabilitação.

---

Presidente: Profa. Kristianne P. S. Fernandes, Dra - Orientadora – UNINOVE

---

Membro: Profa. Ana Claudia Muniz Renno, Dra - UNIFESP

---

Membro: Prof. Carlos Alberto da Silva, Dr - UNINOVE

São Paulo, 16 de dezembro de 2009

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais **Edir e Elisabete Cristina**, por todo amor e carinho que sempre tiveram comigo, além do apoio e compreensão em todas as situações ao longo desta jornada. Muito obrigado por me permitirem concretizar mais esse sonho.

## AGRADECIMENTOS

À **Deus** que sempre me apóia, dá forças e abre os caminhos para que eu possa caminhar e trilhar a minha vida em todos os momentos.

À minha esposa **Bruna Torralvo**, aos meus irmãos Bruno e Raul Ribeiro, pela compreensão e paciência nos momentos de ausência para que eu pudesse conquistar meus objetivos.

À minha orientadora e amiga **Profa. Dra. Kristianne Porta Santos Fernandes**, a quem devo minha iniciação acadêmica e trajetória até aqui, quem me ensinou à pesquisar em prol da comunidade, sempre foi e será um exemplo pra mim de competência e capacidade.

À minha co-orientadora e amiga **Profa. Dra. Raquel Agnelli Mesquita-Ferrari**, profissional e pessoa incrível, agradeço por toda paciência, dedicação, habilidade e amor com que me ensinou ao longo desse tempo.

Por ter vivenciado todo o curso, agradeço a todos os demais professores que contribuíram cada uma à sua forma, desde aos conhecimentos científicos propriamente ditos, até os ensinamentos de vida que me passaram. Não cito nomes por que não caberiam aqui. Obrigado pela dedicação, respeito e toda confiança que sempre dedicaram a mim.

Aos técnicos do laboratório de pesquisa, em especial ao **Bruno Duzzi**, por toda sua fundamental colaboração.

Ao **Prof. Dr. José Ernesto Belizario**, da Universidade de São Paulo, pela doação das células C2C12 que propiciaram todo esse estudo.

## RESUMO

O ultra-som tem sido usado clinicamente por mais de 60 anos, sendo uma das modalidades eletro-terapêuticas mais largamente e freqüentemente empregadas. Mesmo assim, sua efetividade no tratamento da dor, das lesões músculo-esqueléticas e das lesões em tecido mole permanece questionável e seu potencial terapêutico ainda não está totalmente estabelecido. Buscando contribuir para o conhecimento neste campo, esse trabalho teve como objetivos principais fazer um levantamento bibliográfico por meio de uma revisão sistemática da literatura e avaliar por meio de estudo *in vitro* o efeito do ultra-som terapêutico pulsado sobre a proliferação e atividade gelatinolítica de células musculares esqueléticas (C2C12). No estudo *in vitro*, o ultra-som foi testado nas freqüências de 1 e 3 MHz, intensidades de 0,2 e 0,5 W/cm<sup>2</sup>, no modo pulsado a 20% com períodos de aplicação de 2 e 5 minutos. A proliferação celular foi mensurada indiretamente 72 horas após a irradiação, por meio da avaliação da atividade mitocondrial das células (método MTT) e a atividade gelatinolítica presente no sobrenadante das culturas celulares foi avaliada por zimografia (complementada pela análise das densitometrias das bandas que proporcionaram hidrólise da gelatina). O grupo controle foi representado por culturas celulares não submetidas ao ultra-som e os dados obtidos foram tratados estatisticamente com nível de significância de 0,5% ( $p \leq 0,05$  - ANOVA-Dunnet). Na revisão sistemática observou-se grande controvérsia entre resultados e parâmetros, sendo impossível estabelecer conclusões definitivas sobre o potencial terapêutico do US em tecido muscular. Os experimentos mostraram que não houve diferença significativa na proliferação celular entre os mioblastos tratados com ultra-som e as culturas controles após 72 horas de incubação, e também na análise de densitometria dos géis. Portanto, há necessidade de novas investigações para a compreensão das reações bioquímicas, celulares e orgânicas desencadeadas pelo US bem como para o estabelecimento de padrões de freqüência, intensidade, tempo e modo de aplicação deste recurso terapêutico.

**Palavras-chave:** Ultra-som; Mioblastos; C2C12; Proliferação; Zimografia.

## ABSTRACT

Ultrasound has been one of the most widely and frequently used electrotherapeutic modalities for over 60 years. However, its effectiveness in treating pain, musculoskeletal disorders and soft tissue lesions remains questionable and its therapeutic potential is not fully established. In order to contribute to knowledge in this field, the objectives of the present study were to carry out a systematic review on this subject and perform an *in vitro* study for the assessment of the effect of therapeutic pulsed ultrasound on the proliferation and gelatinolytic activity of skeletal muscle cells (C2C12). Ultrasound was tested at frequencies of 1 and 3 MHz, powers of 0.2 and 0.5 W/cm<sup>2</sup> and pulsed mode at 20% with application periods of 2 and 5 min. Cell proliferation was measured indirectly 72 hours after irradiation by assessing mitochondrial activity using the MTT method. Gelatinolytic activity in the supernatant of the cell cultures was assessed by zymography, complimented with densitometry analysis of bands that furnished gelatin hydrolysis. The control group was made up of cell cultures not submitted to ultrasound. The data were treated statistically with a significance level of 0.5% ( $p \leq 0.05$  - ANOVA-Dunnet). The systematic review revealed considerable controversy among the results and parameters employed, which renders definitive conclusions regarding the potential of ultrasound on muscle tissue impossible. The experiments revealed no significant differences in cell proliferation between ultrasound-treated myoblasts and control cultures after 72 hours of incubation. The same was true in the densitometry analysis of the gels. Thus, there is a need for further investigations in order to gain a better understanding of the biochemical, cellular and organic reactions triggered by ultrasound as well as for the establishment standards of frequency, intensity, exposure time and application mode of this therapeutic resource.

**Key-words:** Ultrasound; Myoblasts; C2C12; Proliferation; Zymography.



## SUMÁRIO

<b>1. CONTEXTUALIZAÇÃO</b>	<b>13</b>
<b>2. ESTUDO 1: “Efeitos do ultra-som terapêutico em músculo esquelético: revisão sistemática”</b>	<b>19</b>
Resumo	20
Introdução	21
Material e métodos	21
Resultados	23
Discussão	28
Conclusão	29
Referências Bibliográficas	30
<b>3. ESTUDO 2: “Efeito do ultra-som de baixa intensidade sobre a proliferação e remodelamento de mioblastos C2C12: estudo in vitro”</b>	<b>33</b>
Resumo	34
Introdução	35
Material e métodos	36
Resultados	39
Discussão	42
Referências Bibliográficas	47
<b>4. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>51</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>52</b>
<b>APÊNDICE: Representação fotográfica do aparato para a aplicação do US terapêutico na cultura celular</b>	<b>57</b>
<b>ANEXO: Protocolo de submissão de artigo para publicação à Brazilian Journal of Medical and Biological Research</b>	<b>58</b>

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

### **Estudo**

Tabela 1 – Grupos experimentais .....	37
---------------------------------------	----

### **Apêndice**

Quadro 1. Análise comparativa dos estudos realizados em animais .....	24
Quadro 2. Análise comparativa dos estudos realizados em humanos .....	26
Quadro 3. Análise comparativa dos estudos realizados em cultura celular ....	27

## LISTA DE FIGURAS

### Estudo 1

Figura 1. Divisão dos artigos em 3 grandes grupos para facilitar a análise comparativa dos resultados .....	23
---	----

### Estudo 2

Figura 1. Representação esquemática do aparato para aplicação do ultra-som na cultura celular. Adaptado de Mukai <i>et al.</i> (2005) .....	37
---	----

Figura 2. Viabilidade celular mensurada em absorbância pelo método MTT das culturas de células C2C12 irradiadas com ultra-som pulsado de baixa intensidade de 1 MHz durante 2 ou 5 minutos nas intensidades de 0.2 e 0.5 W/cm <sup>2</sup> .....	40
--	----

Figura 3. Viabilidade celular mensurada em absorbância pelo método MTT das culturas de células C2C12 irradiadas com ultra-som pulsado de baixa intensidade de 3 MHz durante 2 ou 5 minutos nas intensidades de 0.2 e 0.5 W/cm <sup>2</sup> .....	40
--	----

Figura 4. Detecção da atividade gelatinolítica nos sobrenadantes das culturas por meio de zimografia em 1% de gelatina-SDS-PAGE. Cada linha representa um grupo experimental - A: Controle 2min; B: 0,2W/cm <sup>2</sup> - 2min - 1MHz; C: 0,5W/cm <sup>2</sup> - 2min - 1MHz; D: 0,2W/cm <sup>2</sup> - 5min - 1MHz; E- 0,5W/cm <sup>2</sup> - 5min - 1MHz ; F: 0,2W/cm <sup>2</sup> - 2min - 3MHz; G: 0,5W/cm <sup>2</sup> - 2min - 3MHz; H: 0,2W/cm <sup>2</sup> - 5min - 3MHz; I: 0,5W/cm <sup>2</sup> - 5min - 3MHz .....	41
--	----

Figura 5. Concentração de gelatinase (proteínase) expressa em média e desvio padrão, determinada pela soma da densidade óptica integrada (expressa em unidades arbitrárias) obtida pelas três bandas (pró-enzima, intermediária e forma ativa). Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e experimentais, tanto em 1 MHz como em 3 MHz. (\*p < 0.05; ANOVA - Dunnet) ..... 42

## LISTA DE ABREVIATURAS

CaCl – Cloreto de cálcio

cm - Centímetro

DMEM – Meio Eagle Modificado por Dulbecco

EDTA – Ethylenediamine tetraacetic acid (ácido etilenodiamino tetra-acético)

ERK - Extracellular signal-regulated kinase

Hz - Hertz

HCl – Ácido clorídrico

M – Molar

MEC – Matriz extracelular

MHz – Megahertz

ml – Mililitros

mM – Milimolar

MMP – Metaloproteinase de matriz extracelular

MTT - (3-[4,5-Dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue

NaCl – Cloreto de sódio

NaN<sub>3</sub> – Trinitrogeneto de sódio (azida de sódio)

nm – Nanômetros

NO – Óxido nítrico

NOS – Óxido nítrico sintase

PBS - Phosphate-buffered saline (solução salina tamponada com fosfato)

MAPK - Mitogen-activated protein kinase

SDS-PAGE - Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

SFB – Soro fetal bovino

µg – Microgramas

µm – Micrômetros

US – Ultra-som

VCl<sub>3</sub> – Cloreto de vanádio

W/cm<sup>2</sup> – Watts por centímetro quadrado

## 1. CONTEXTUALIZAÇÃO

Atualmente existe considerável interesse na regeneração do músculo esquelético em função de situações como a reparação rápida de lesões em atletas, transplantes, distrofias e atrofias musculares<sup>1</sup>.

A estrutura do músculo esquelético consiste de fibras musculares e células satélites embebidas em uma matriz extracelular (MEC), sendo que as células satélites estão intimamente associadas a ambas e exibem grande capacidade de adaptação frente a estímulos, como exercício, alteração hormonal, estimulação elétrica, alteração funcional, entre outros<sup>1,2</sup>.

Nas situações de injúria muscular, o processo de formação do novo tecido requer que células mononucleadas quiescentes precursoras se tornem ativas, proliferem, se diferenciem em mioblastos e se fundam para formar os miotubos. Subseqüentemente, os miotubos irão sofrer diferenciação e maturação para formar fibras musculares funcionais e reparar as miofibrilas danificadas<sup>1,3,4</sup>.

Já a ação coordenada de degradação e síntese de proteínas intracelulares e dos componentes da matriz extracelular (MEC), garante o remodelamento tecidual fisiológico ou patológico do músculo esquelético. A MEC representa uma complexa rede de macromoléculas compostas de várias proteínas e polissacarídeos que são secretados localmente e montados em associação com a superfície celular que os produz. As interações célula-célula e célula-matriz extracelular suprem as informações essenciais para homeostase, controle da morfogênese, funções tecido-específicas, migração celular, reparação de tecidos, tumorigênese e morte celular<sup>5</sup>.

As metalopeptidases (ou metaloproteinases) de matriz (MMPs) compreendem uma família de endoproteases que degradam um ou vários componentes da MEC, como colágeno, elastina, laminina e proteoglicanos. As MMPs, portanto, estão envolvidas no remodelamento da matriz extracelular em uma grande variedade de fenômenos fisiológicos e patológicos<sup>6</sup>.

As MMPs possuem um importante papel na homeostasia da MEC nos músculos esqueléticos<sup>7,8</sup>. A MMP-2 (também conhecida como gelatinase-A) e a MMP-9 (também conhecida como gelatinase B) parecem ter um papel mais importante na adaptação do músculo esquelético a alterações de demanda

contráctil ou em resposta a injúria (inflamação, desinervação crônica). As MMP-2 e MMP-9 também estão envolvidas em várias miopatias e alterações inflamatórias induzidas em músculos esqueléticos<sup>9,10</sup>.

A expressão de MMP-2 se mostrou aumentada nos músculos esqueléticos após aplicação de estimulação elétrica crônica<sup>11</sup>, após corrida e após exercícios de alta intensidade<sup>12</sup>. A expressão de MMP-9 aumentou após aumento crônico do fluxo sanguíneo<sup>13</sup>, após corrida<sup>12</sup> e em fases iniciais da resposta inflamatória do músculo frente à miotoxinas<sup>14</sup>.

Com isso, vários trabalhos vêm sendo desenvolvidos com o intuito de investigar recursos terapêuticos que acelerem o processo de reparo e um dos recursos bioestimulantes mais utilizados com esse objetivo no tecido muscular esquelético é a eletro-terapia com ultra-som. Entretanto, ainda são escassas e, por vezes contraditórias, as evidências científicas para que se possa determinar com segurança os parâmetros dosimétricos e metodológicos necessários à aquisição de seus objetivos<sup>15-21</sup>.

Essa eletro-terapia denominada ultra-som (US) terapêutico consiste em vibrações mecânicas inaudíveis de alta frequência (acima de 500.000Hz) criadas quando um gerador produz energia elétrica que é convertida em energia acústica por meio da deformação mecânica de um cristal piezoelétrico polarizado localizado dentro de um transdutor. As ondas assim geradas são transmitidas por propagação de maneira longitudinal no ar, nos gases e nos líquidos. Nos meios de alta coesão molecular, como os sólidos, a propagação segue também transversalmente e superficialmente, já no vácuo não há propagação<sup>18,22,23</sup>.

A quantidade total de energia de um feixe de US é descrita como sua potência e é expressa em watts. A quantidade de energia que irá alcançar um local específico depende das características do US (frequência, intensidade, amplitude, foco, uniformidade do feixe) e do meio pelo qual ele irá se propagar<sup>16,22</sup>.

A dosagem do US pode variar de acordo com a amplitude de sua onda e com sua intensidade (normalmente definida pela razão entre a potência de saída e a área da superfície do transdutor) e é expressa em Watts/cm<sup>2</sup>. Na maioria dos estudos clínicos com US terapêutico, as intensidades variam de

0,5 a 3 W/cm<sup>2</sup> e pode-se observar que ainda não existem parâmetros bem estabelecidos que norteiem a escolha desses valores<sup>18,23,24</sup>.

O US terapêutico possui um gradiente de frequência de 0,75 a 3 MHz, sendo que a maioria dos aparelhos estabelece frequências de 1 e 3 MHz. As ondas de baixa frequência têm maior poder de penetração, mas são menos focadas. Uma onda de frequência de 1 MHz é absorvida primariamente pelos tecidos que estão a uma profundidade de 3 a 5 cm, sendo recomendada para lesões mais profundas e para pacientes portadores de maior quantidade de gordura subcutânea. Já a frequência de 3 MHz é recomendada para lesões mais superficiais em profundidades de 1 a 2 cm<sup>16,18</sup>.

A emissão das ondas ultra-sônicas pode ser feita de maneira contínua ou pulsada. A emissão pulsada não gera efeitos térmicos como a emissão contínua e também previne os efeitos danosos da reflexão, pois quando as ondas refletidas encontram outras ondas geradas acaba por formar uma onda ultrasônica permanente com efeito adverso sobre o tecido. A modalidade de emissão de energia ultra-sônica mais relatada na prática clínica em fisioterapia é a pulsada no regime de 1:4 (20%), ou seja, a emissão das ondas de ultra-som é efetuada em 20% do período total de aplicação<sup>25-27</sup>.

Os efeitos das ondas ultra-sônicas além de serem regidos pelos parâmetros de sua aplicação, também estão diretamente relacionados à impedância acústica dos tecidos que as receberão. A impedância acústica de cada tecido é ditada pela sua densidade e pela velocidade na qual o ultra-som se propaga por eles. Em tecidos ricos em água como o tecido adiposo, há baixa absorção e, portanto alta penetração das ondas ultra-sônicas, já em tecidos ricos em proteínas como o músculo esquelético a absorção do ultra-som é maior<sup>16</sup>.

De modo geral, os efeitos terapêuticos do US têm sido relatados principalmente em aplicações de baixa intensidade e no modo pulsado<sup>16,28,29</sup>.

A aplicação do US pode induzir efeitos térmicos (aquecimento) e não térmicos. O grau de aquecimento gerado pelo US depende dos parâmetros de frequência e intensidade e do tipo de tecido que recebeu a irradiação, sendo que os efeitos provocados pelo aquecimento incluem o aumento do fluxo sanguíneo e da flexibilidade tecidual, a modulação da dor, a redução da rigidez



articular e do espasmo muscular e a indução de resposta inflamatória moderada<sup>16,28,30</sup>.

Os efeitos não térmicos do US são tidos como mais efetivos na reparação e na regeneração de lesões de tecidos moles que os efeitos térmicos, e incluem a cavitação e o micro fluxo acústico<sup>16</sup>. A cavitação pode ser definida como a formação de bolhas de gás microscópicas geradas por alterações de pressão nos fluídos teciduais decorrentes da energia ultra-sônica que acaba por aumentar o fluxo do fluído circundante. A cavitação estável e regular é considerada benéfica para o tecido lesionado, já a cavitação irregular é considerada danosa<sup>16,28,30</sup>.

O micro fluxo acústico, movimento unidirecional de fluídos ao longo e ao redor das membranas celulares, é capaz de deslocar íons e pequenas moléculas e ocorre como resultado das variações de pressão mecânica causada pelo US podendo alterar a estrutura, a função e a permeabilidade da membrana celular<sup>16,28</sup>.

A lista de efeitos não-térmicos do US inclui a aceleração da fibrinólise e da angiogênese, o estímulo para produção de fatores mitogênicos para fibroblastos, condroblastos e células endoteliais, o aumento do recrutamento de fibroblastos, o aumento da síntese de matriz e de fibras colágenas mais densas e o aumento da resistência à tensão dos tecidos<sup>16,29</sup>.

Os estudos *in vitro* utilizando cultura de células têm sido bastante empregados na análise dos efeitos de recursos terapêuticos, drogas e biomateriais devido à facilidade de padronização da amostra, cujo controle de pH, temperatura, pressão osmótica, tensão de CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> pode ser obtido de maneira precisa, além de conseguirem-se amostras totalmente homogêneas<sup>31</sup>.

No caso do estudo dos efeitos do US, o uso de cultura celular tem a vantagem de eliminar os efeitos térmicos e além disso, de possibilitar o estudo molecular da hipótese da ressonância de frequência. Esta teoria descreve que os efeitos mecânicos do US podem resultar em ativação ou inativação de enzimas ou na dissociação de complexos protéicos, levando à alterações na transdução de sinais intracelulares que regulam as propriedades de membranas, a síntese de proteínas e a modulação de atividades enzimáticas<sup>28</sup>.

Do ponto de vista da biologia celular, se um estímulo alcança um limiar crítico a célula irá responder independentemente do fato dela estar em cultura

ou *in vivo*. Logicamente, as células em cultura geralmente respondem a estímulos de muito menor intensidade, pois não existem barreiras nem dissipações, assim os resultados obtidos *in vitro* não devem ser diretamente extrapolados para o uso clínico sem prévio estudo em modelo vivo e sem o ajuste dos parâmetros dosimétricos<sup>15,28</sup>.

A identificação e o conhecimento científico dos efeitos moleculares e celulares do US *in vitro* certamente levarão à compreensão e ao desenvolvimento de protocolos clínicos que estabeleçam parâmetros físicos e dosimétricos efetivos de modo a preencher a lacuna existente na literatura clínica sobre este recurso<sup>15,18,28,32</sup>.

Johns (2002)<sup>28</sup> ao relatar os efeitos do US *in vitro*, utilizando aplicações contínuas e pulsadas e intensidades de 0,1 a 1,7 W/cm<sup>2</sup>, aponta que de uma forma geral ocorre um retardamento no crescimento celular, aumento da síntese protéica e alterações de membranas celulares, sugerindo que inicialmente a irradiação lesionaria as células, resultando num retardamento do crescimento e que depois haveria uma recuperação celular caracterizada pelo aumento na produção protéica.

Estudos subseqüentes nas décadas de 80 e 90 evidenciaram resultados contraditórios. O US utilizado em freqüências de 1 e de 3 MHz e intensidades variadas mostrou-se capaz de aumentar a proliferação e a produção de citocinas e de fatores de crescimento por fibroblastos, osteoblastos e células ligadas à resposta imune, por outro lado também causou lise celular em fibroblastos e culturas de linhagens celulares de neuroblastomas<sup>28,33-40</sup>. Os estudos mais recentes que avaliaram o potencial terapêutico do ultra-som pulsado foram realizados em osteoblastos relatando que ele pode aumentar a regeneração e promover formação óssea por essas células<sup>41-43</sup>, em condrócitos onde o US estimulou o metabolismo da MEC, pode exercer efeito protetor em casos de osteoartrites, além de promover proliferação e diferenciação em cultura celular<sup>44-47</sup>, em fibroblastos onde promoveu proliferação celular e induziu resposta benéfica para a cicatrização<sup>48-49</sup>, em células epiteliais onde não se observou efeito direto sobre a regeneração<sup>50</sup> e em células endoteliais onde relata-se que o US induziu características da angiogênese<sup>51</sup>.

Em células precursoras miogênicas ou ainda na linhagem de células musculares C2C12, o efeito do US pulsado foi descrito em um único artigo que

demonstrou que a aplicação de frequência 1.5 MHz (intensidade de 70 mW/cm<sup>2</sup> por 20 minutos) foi capaz de converter a via de diferenciação de mioblastos C2C12, cultivados em meio de cultura propício para diferenciação, para osteoblastos e/ou condroblastos via ativação da fosforilação de ERK1/2 e p38 MAPK<sup>52</sup>.

Os mioblastos C2C12 derivam de músculo esquelético de camundongos, exibem a maioria das características dos mioblastos normais e diferenciam-se em cultura, propiciando um bom modelo para estudar a regeneração muscular. Além disso, o uso de linhagens celulares em modelos para análise de proliferação celular elimina a possibilidade da influência do US sobre a produção de fatores de crescimento por células não miogênicas contidas em culturas primárias, como fibroblastos e macrófagos<sup>3,53-56</sup>.

Este trabalho buscou preencher uma lacuna no conhecimento dos efeitos do ultra-som terapêutico pulsado sobre as células musculares em cultura, de modo a contribuir para um futuro estabelecimento de padrões dosimétricos para o uso clínico deste recurso em tecidos musculares<sup>17,57</sup>.

Como pode ser observado no artigo de revisão incluído no apêndice desta tese, o potencial terapêutico do ultra-som em tecido muscular ainda está longe de ser estabelecido. Há realmente necessidade de pesquisas que utilizem modelos celulares, animais e clínicos e que padronizem os parâmetros dosimétricos adotados. Somente assim poderemos um dia, indicar a terapêutica adequada a cada tipo de lesão muscular.

## 2. ESTUDO 1

**Artigo submetido para publicação na Revista Fisioterapia e Pesquisa**

### **EFEITOS DO ULTRA-SOM TERAPÊUTICO EM MÚSCULO ESQUELÉTICO: REVISÃO SISTEMÁTICA**

RAFAEL RIBEIRO: Especialista em Saúde Coletiva e aluno do Programa de Mestrado em Ciências da Reabilitação da Universidade Nove de Julho – UNINOVE

RAQUEL AGNELLI MESQUITA FERRARI: Profa. Dra. em Ciências Fisiológicas - UFSCAR

JOÃO CARLOS FERRARI CORREA: Prof. Dr. em Morfologia - UNICAMP

SANDRA KALIL BUSSADORI: Profa. Dra. em Ciências Odontológicas - USP

MANOELA DOMINGUES MARTINS – Profa. Dra. em Patologia Bucal - USP

KRISTIANNE PORTA SANTOS FERNANDES: Profa. Dra. em Imunologia – USP

Universidade Nove de Julho – UNINOVE - / São Paulo - SP / Brasil. - Centro de Pós-Graduação Stricto Sensu - Mestrado em Ciências da Reabilitação  
Av. Francisco Matarazzo, 612 – 1º Andar, Água Branca - São Paulo/SP - CEP 05001-100

***Running title:*** Ultra-som terapêutico em músculo esquelético.

**Contato:** Kristianne Porta Santos Fernandes.

Av. Francisco Matarazzo, 612, Água Branca, São Paulo, SP, CEP. 05001-100.  
fone: (11) 3665-9325, fax: (11) 3365-9301, e-mail: kristianneporta@gmail.com

**Resumo**

O ultra-som (US) tem sido usado clinicamente por mais de 60 anos, sendo uma das modalidades eletro-terapêuticas mais empregadas. Porém, sua efetividade no tratamento das lesões músculo-esqueléticas permanece questionável e seu potencial terapêutico ainda não está totalmente estabelecido, havendo necessidade de novas investigações para a compreensão das reações bioquímicas, celulares e orgânicas desencadeadas por ele, bem como para o estabelecimento de protocolos efetivos que determinem os melhores padrões de frequência, intensidade, tempo e modo de aplicação no tratamento das lesões músculo-esqueléticas. Por meio de uma revisão crítica da literatura agregou-se o conhecimento atual sobre esta terapia para nortear novos estudos que possam aumentar o conhecimento sobre as reações orgânicas desencadeadas por este recurso. Como método foi feita uma busca de artigos na Biblioteca Virtual em Saúde (BVS) e na Pubmed, utilizando e combinando diversas palavras referentes ao tema proposto e os descritores definidos pelo DeCS e pelo MeSH Database, respectivamente. Foram encontrados 302 artigos, sendo que apenas 18 artigos estavam diretamente relacionados com a pergunta da pesquisa e relatavam efeitos que não se restringiam ao aquecimento local. Conclui-se que potencial terapêutico do US em tecido muscular ainda está longe de ser estabelecido e há necessidade de pesquisas que utilizem modelos celulares, animais e clínicos randomizados e que padronizem os parâmetros dosimétricos adotados.

**Descritores:** Ultra-Som. Músculo esquelético. Revisão.

## **Introdução**

Atualmente existe considerável interesse na regeneração do músculo esquelético em função de situações como lesões em atletas, transplantes, distrofias e atrofas musculares<sup>1</sup>.

Um dos recursos bioestimulantes mais utilizados com o intuito de acelerar o processo de reparo do tecido muscular esquelético é o ultra-som terapêutico. Entretanto ainda são escassas e por vezes contraditórias, as evidências científicas para que se possa determinar com segurança os parâmetros dosimétricos e metodológicos necessários à aquisição deste objetivo<sup>2-5</sup>.

A emissão das ondas ultra-sônicas pode ser feita de maneira contínua ou pulsada, diferenciando-se principalmente por promoverem respectivamente efeitos térmicos ou não-térmicos<sup>2,6,7</sup>. A emissão pulsada é a mais relatada na prática clínica em fisioterapia, com um regime de 1:4 (20%), ou seja, a emissão das ondas de ultra-som é efetuada em 20% do período total de aplicação<sup>8,9</sup>.

Em geral, os aparelhos de US possuem um gradiente de frequência de 0,75 a 3 MHz, sendo que a maioria dos aparelhos estabelece frequências de 1 e 3 MHz<sup>2,5</sup>.

Clinicamente a absorção das ondas ultra-sônicas é influenciada pela constituição do tecido, variando de acordo com a quantidade de proteínas e água na sua composição, além da intensidade e frequência utilizada na aplicação<sup>5,10</sup>.

Visto a grande discordância da literatura quanto à efetividade ou não do ultra-som em células e tecidos musculares este trabalho tem com objetivo agregar, por meio de uma revisão sistemática da literatura, o conhecimento atual sobre esta terapia para nortear novos estudos que possam aumentar o conhecimento sobre as reações orgânicas desencadeadas por este recurso.

## **Material e métodos**

Inicialmente definiu-se a pergunta da pesquisa: “Quais são os efeitos do ultra-som terapêutico no músculo estriado esquelético”. A busca dos artigos utilizados na presente revisão sistemática foi realizada na Biblioteca Virtual em Saúde (BVS) e na Pubmed (Public medline) Central que incluem, entre outras, as bases Medline 1966-1996, Medline 1997-2009 (Literatura Internacional em

Ciências da Saúde), SCIELO (Scientific eletronic library on line) e LILACS (Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde).

Para as buscas, foram utilizadas e combinadas diversas palavras referentes ao tema proposto e os descritores definidos pelo MeSH Database (medical subject headings) e pelo DeCS (descritores em ciências da saúde). Foram considerados somente os artigos publicados a partir de 1995.

As palavras e descritores foram buscados no título, resumo, corpo do trabalho, e palavras-chave, sendo utilizadas todas as combinações possíveis para os seguintes termos:

- Ultrasound; Ultrasound, interventional; Ultrasounds; Ultrassound; Ultrahigh frequency waves;
- Ultrasonics; myoblasts; Ultrasonics/administration and dosage; Ultrasonics/adverse effects; Ultrasonics/classification; Ultrasonics/instrumentation; Ultrasonics/methods; Ultrasonics/standards; Ultrasonics/supply and distribution; Ultrasonics/therapy; Ultrasonics/utilization ;
- Low-intensity pulsed ultrasound; Low-intensity pulsed ultrasonics;
- Myoblast; Myoblasts; Myoblasts, Skeletal; Myoblasts, Skeletal/metabolism; Myoblasts, Skeletal/pathology; Myoblasts, Skeletal/physiology; Myoblasts, Skeletal/radiation effects; Myoblasts, Skeletal/ultrastructure;
- Muscle; muscle cells; Muscle, Skeletal/anatomy and histology; Muscle, Skeletal/cytology; Muscle, Skeletal/growth and development; Muscle, Skeletal/injuries; Muscle, Skeletal/metabolism; Muscle, Skeletal/pathology; Muscle, Skeletal/physiology; Muscle, Skeletal/physiopathology; Muscle, Skeletal/radiation effects;
- Muscle; Muscles; Muscle cells; Muscle development; Muscle contraction; Skeletal muscle; Muscle, skeletal;
- C2C12
- LIPUS
- Ultra-som; Terapia por ultra-som; Ondas de ultra freqüência; Ultra-som de intervenção;
- Músculos; Células de músculos; Músculo esquelético; Sistema músculosquelético;

- Mioblastos; Mioblastos de músculo esquelético; Mioblastos esqueléticos; Células musculares; Distrofia muscular;

Na busca realizada na base Pubmed foram adotados os seguintes filtros de exclusão: Muscle Neoplasms; Muscle, Smooth; Myocytes, Cardiac; Breathing Exercises; Diagnosis; Education; History; Bone; Fractures; Tendon; Images.

## Resultados

Como a localização dos artigos foi realizada por estratégias de busca bem abrangentes, foram encontrados 302 artigos, permanecendo na revisão apenas 18 artigos que estavam diretamente relacionados com a pergunta da pesquisa e que relatavam efeitos que não se restringiam ao aquecimento local (efeito térmico). Estes artigos foram divididos em 3 grandes grupos para facilitar a análise comparativa dos resultados (Figura 1).

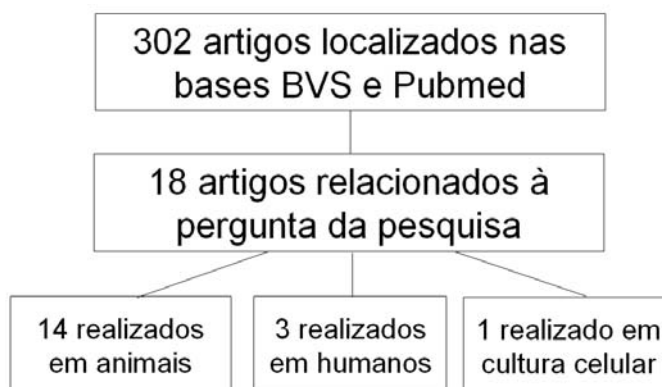


Figura 1 – Divisão dos artigos encontrados na revisão sistemática.

Os quadros 1, 2 e 3 sumarizam os dados encontrados nos estudos realizados em animais<sup>11-24</sup>; em humanos<sup>25-27</sup> e em cultura celular<sup>28</sup>.



Quadro 1. Análise comparativa dos estudos realizados em animais.

Frequência	Intensidade	Emissão	Meio condutor	Tempo de aplicação	Músculo	Animal	Efeito	Referência
1 MHz	1.0 W/cm <sup>2</sup>	Contínuo	Gel a base de água	15 min/dia 6x/semana Por 4 semanas	Sóleoo	22 ratos Wistar mantidos com imobilização em flexão plantar	Prevenção da contratura muscular	Okita <i>et al.</i> (2009) <sup>11</sup>
1 e 3 MHz	0.5 W/cm <sup>2</sup>	Pulsado (1:5)	Gel	5 min/dia por 6 dias	Gastrocnemio	40 ratas Wistar que receberam contusão muscular	Aceleração do processo de reparo, aumento da rigidez e da carga suportada à tração muscular, não havendo diferença entre as frequências testadas	Matheus <i>et al.</i> (2008) <sup>12</sup>
1 MHz	0.57 W/cm <sup>2</sup>	Pulsado (50%)	Gel	5 min/dia 2, 5 e 12 aplicações respectivamente para os grupos 4, 7 e 14 dias	Gastrocnemio	30 ratos Wistar que receberam laceração muscular	Aumento na deposição de fibras colágenas e melhoria na organização estrutural das fibras musculares	Piedade <i>et al.</i> (2008) <sup>13</sup>
1 MHz	0.3 W/cm <sup>2</sup>	Pulsado (não consta o regime)	Gel de carbocol	1x/dia (não consta tempo) por 2 e 7 dias	Tibial anterior	35 ratos que receberam injeção intramuscular de hidrocloreto de bupivacaína	Ação anti-inflamatória após 7 dias	Pinto <i>et al.</i> (2008) <sup>14</sup>
1 MHz	0.4 W/cm <sup>2</sup>	Contínuo	Não relata	3 min 3 aplicações (1, 8 e 24 h após a lesão)	Bíceps femoral	16 ratos Wistar que receberam incisão e divulsão em 50% do conteúdo muscular	Redução de eritrócitos (após 1h), aumento de neutrófilos (após 8h) e eosinófilos (após 24h), sugerindo aumento da hemorragia e amplificação da resposta inflamatória	Plentz <i>et al.</i> (2008) <sup>15</sup>
Não relata	0.5, 1.0 e 2.0 W/cm <sup>2</sup>	Pulsado (não consta o regime)	Não relata	1x/dia por 1, 3 e 5 dias	Gastrocnemio	25 ratos Wistar machos que receberam incisão e laceração muscular	Diminuição do conteúdo de catalase, superóxido dismutase e de substâncias tiobarbitúricas ácido reativas	Freitas <i>et al.</i> (2007) <sup>16</sup>
3 MHz	0.3 W/cm <sup>2</sup>	Contínuo	Não relata	5 min/dia por 4 dias	Gastrocnemio	36 ratos machos Wistar que receberam contusão muscular	Diminuição da expressão de RNAm do MGF (mechano-growth factor)	McBrier <i>et al.</i> (2007) <sup>17</sup>
1 MHz	3.0 W/cm <sup>2</sup>	Pulsado (não consta o regime) e Contínuo	Gel de carbocol	12 min/dia por 10 dias	Vasto lateral	10 coelhos machos Nova Zelândia sem lesão	Não produz efeitos morfométricos no tecido muscular	Lopes <i>et al.</i> (2005) <sup>18</sup>
3 MHz	0.1 W/cm <sup>2</sup>	Contínuo	Não relata	5 min/dia por 4 dias	Gastrocnemio	20 ratos machos Wistar que receberam contusão	Não houve alteração de massa muscular, número de núcleos por fibra,	Markert <i>et al.</i> (2005) <sup>19</sup>

						muscular	área de secção transversa e das proteínas contráteis	
3.3 MHz	1,0 W/cm <sup>2</sup>	Pulsado (20%)	Não relata	5 min/dia por 7 dias. Sacrifício após 1,3, 5, 7, 14, 21, 28 e 40 dias	Gastrocnemio	80 ratos Wistar que receberam contusão muscular bilateral	Não houve influência na massa muscular, concentração de proteínas totais, número de núcleos por fibra, e área de secção transversa	Wilkin <i>et al.</i> (2004) <sup>20</sup>
1 MHz	0.5 W/cm <sup>2</sup>	Contínuo	Subaquático	5 min/dia por 3, 5 e 7 dias	Extensor digital longo	33 ratos Sprague-Dawley que receberam lesão induzida por contração utilizando eletroestimulação (150 Hz, 21 ciclos/min)	Após 7 dias houve aumento na produção de força	Karnes & Burton (2002) <sup>21</sup>
1 MHz	0.5 W/cm <sup>2</sup>	Pulsado (20%)	Não relata	5 min/dia por 10 dias	Reto femural	26 coelhos da raça Nova Zelândia que receberam contusão muscular	Aumento na deformação máxima, carga de deformação no limite da proporcionalidade e energia na fase de deformação elástica	Menezes <i>et al.</i> (1999) <sup>22</sup>
3 MHz	1,5 W/cm <sup>2</sup>	Pulsado (20%)	Gel	6 min/aplicação Grupo 1 = 1x/dia iniciando 3 dias após lesão com sacrifício após 4, 7 e 10 dias Grupo 2 = 2 dias consecutivos de tratamento e 1 dia de repouso iniciando 6 horas após lesão com sacrifício após 1, 3, 6 e 9 dias.	Gastrocnemio	56 ratos fêmeas Sprague-Dawley que receberam contusão muscular	Não houve efeitos benéficos significantes na morfologia da regeneração muscular	Rantanen <i>et al.</i> (1999) <sup>23</sup>
1 MHz	0.5 W/cm <sup>2</sup>	Pulsado (1:5)	Não relata	5 min/dia por 3, 5, 10 e 15 dias	Tibial anterior	30 ratos machos Wistar que receberam incisão e divulsão em 100% da largura muscular	Após 3, 7 e 14 dias houve favorecimento da regeneração muscular e diminuição de tecido fibrótico	Gouvêa <i>et al.</i> (1998) <sup>24</sup>

Quadro 2. Análise comparativa dos estudos realizados em humanos.

Frequência	Intensidade	Emissão	Meio condutor	Tempo de aplicação	Músculo	Sujeitos da pesquisa	Efeito	Referência
1 MHz	1,5 W/cm <sup>2</sup>	Não consta	Gel de cloreto de sódio	7 min/dia, 1 sessão	Tríceps sural (junção miotendinosa do tendão de Aquiles)	55 mulheres e 24 homens com idade média de 21 anos hígidos	Aumento de temperatura, da flexibilidade muscular e da amplitude de movimento	Costa <i>et al.</i> (2006) <sup>25</sup>
1 MHz	1.5 a 2 W/cm <sup>2</sup>	Pulsado (20%)	Gel	8-12 min 5x/semana 4 semanas 20 sessões	Reto abdominal	1 mulher de 62 anos apresentando hematoma abdominal	Acelerou a reabsorção do hematoma e aliviou a dor	Berna-Serna <i>et al.</i> (2005) <sup>26</sup>
1 MHz	0.8 W/cm <sup>2</sup>	Pulsado (25%)	Gel	7min e 21s/dia - 2 sessões 14min e 42s/dia - 2 sessões	Bíceps braquial	24 homens e 24 mulheres de 19 a 25 anos apresentando fadiga muscular induzida por exercício	Ausência de benefício significativo na dor subjetiva ou amplitude de movimento	Craig <i>et al.</i> (1999) <sup>27</sup>

Quadro 3. Análise comparativa dos estudos realizados em cultura celular.

<b>Frequência</b>	<b>Intensidade</b>	<b>Emissão</b>	<b>Meio condutor</b>	<b>Tempo de aplicação</b>	<b>Tipo celular</b>	<b>Efeito</b>	<b>Referência</b>
1,5 MHz	70 mW/cm <sup>2</sup>	Pulsado	Meio de cultura	20 min	mioblasto C2C12	Estimulou a conversão e diferenciação das C2C12 em osteoblastos e condroblastos	Ikeda <i>et al.</i> (2006) <sup>28</sup>

## Discussão

Em circunstâncias normais, o músculo esquelético adulto de mamíferos é um tecido estável com baixo “turn over”, ou seja, baixo remodelamento sem alterações drásticas em suas características fenotípicas. Porém, é um tecido dinâmico e capaz de responder a estímulos fisiológicos como, por exemplo, treinamento físico ou lesões severas<sup>29</sup>. Após uma lesão o músculo tem a habilidade de iniciar um processo de reparo altamente organizado de forma a prevenir a perda de massa muscular. Este processo é semelhante à miogênese, porém, orquestrado pelas células satélites<sup>29,30</sup>.

A aplicação do US como recurso terapêutico está vinculada ao relato de efeitos benéficos sobre diversos tecidos, destacando-se o aumento da angiogênese, do tecido de granulação, do número de fibroblastos e da síntese de colágeno, e a diminuição de leucócitos e macrófagos, dentre outros nos quais já tem sido demonstrado o aumento da velocidade de cicatrização, a diminuição do número de células inflamatórias e a melhora da qualidade do tecido neoformado<sup>31</sup>.

Porém, também se observa na literatura um consenso em relação à necessidade de estabelecer parâmetros dosimétricos para aplicação deste recurso. Neste sentido, a presente revisão objetivou agregar o conhecimento existente com relação à aplicação do US terapêutico em tecido muscular.

Foi possível verificar que existe uma grande variação nos parâmetros dosimétricos usados nos estudos que avaliaram o efeito do US no músculo esquelético. Nos estudos realizados em animais<sup>11-24</sup> o US terapêutico foi utilizado nas freqüências de 1 e de 3 MHz, já nos estudos em humanos<sup>25-27</sup> o US foi utilizado somente na freqüência de 1 MHz e no estudo realizado em cultura celular<sup>28</sup> foi utilizada a freqüência de 1,5 MHz.

As ondas de baixa freqüência têm maior poder de penetração, mas são menos focadas. Uma onda de freqüência de 1 MHz é absorvida primariamente pelos tecidos que estão a uma profundidade de 3 a 5 cm, sendo recomendada para lesões mais profundas e para pacientes portadores de maior quantidade de gordura subcutânea. Já a freqüência de 3 MHz é recomendada para lesões mais superficiais em profundidades de 1 a 2 cm<sup>2,5</sup>.

Já a dosagem do US pode variar de acordo com a amplitude de sua onda e com sua intensidade (normalmente definida pela razão entre a potência de

saída e a área da superfície do transdutor). Verifica-se que os estudos que avaliaram o efeito do US no músculo esquelético em animais<sup>11-24</sup>, utilizaram intensidades de 0,1 a 3 W/cm<sup>2</sup> e tempos de aplicação de 3 a 12 minutos. Já nos estudos em humanos<sup>25-27</sup>, o US foi utilizado em intensidades variando de 0,8 a 2 W/cm<sup>2</sup> com tempos de aplicação de 7 a 12 minutos, e por fim, no estudo realizado em cultura celular<sup>28</sup>, foi utilizada a intensidade de 70 mW/cm<sup>2</sup> por 20 minutos.

Com relação ao modo de emissão das ondas ultra-sônicas foi possível verificar que os estudos realizados em animais<sup>11-24</sup> avaliaram o modo pulsado e o contínuo. Já nos estudos em humanos<sup>25-27</sup> e em cultura celular<sup>28</sup>, o US foi utilizado sempre no modo pulsado. A emissão pulsada além de prevenir os efeitos danosos da reflexão, também não gera efeitos térmicos como a contínua<sup>8,9</sup>.

Com relação ao número de aplicações, houve grande variação em todos os estudos analisados nesta revisão.

O mesmo pode ser afirmado com relação aos efeitos obtidos pela aplicação deste recurso. Assim, com a literatura existente não é possível estabelecer um consenso na relação parâmetros dosimétricos *versus* efeitos obtidos.

## **Conclusão**

O potencial terapêutico do ultra-som em tecido muscular ainda está longe de ser estabelecido. Há necessidade de pesquisas que utilizem modelos celulares, animais e clínicos randomizados e que padronizem os parâmetros dosimétricos adotados. Somente assim será possível indicar a terapêutica adequada a cada tipo de lesão muscular.

### Referências Bibliográficas do Estudo 1

1. Grounds MD, White JD, Rosenthal N, Bogoyevitch MA. The Role of Stem Cells in Skeletal and Cardiac Muscle Repair. *J Histochem Cytochem* 2002;50:589-610.
2. Blume K, Matsuo E, Lopes MS, Lopes LG. Dosimetria proposta para o tratamento por ultra-som - uma revisão de literatura. *Fisioter Mov.* 2005;18(3):55-64.
3. Warden SJ, McMeeken JM. Ultrasound usage and dosage in sports physiotherapy. *Ultrasound Med Biol.* 2002; 28:1075-80.
4. Baker KG, Robertson VL, Duck FA. A review of therapeutic ultrasound: biophysical effects. *Phys Ther.* 2001;81(7):1351-8.
5. Speed CA. Therapeutic ultrasound in soft tissue lesions. *Rheumatology (Oxford).* 2001;40:1331-6.
6. Warden SJ, Fuchs RK, Kessler CK, Avin KG, Cardinal RE, Stewart RL. Ultrasound produced by a conventional therapeutic ultrasound unit accelerates fracture repair. *Phys Ther.* 2006;86(8):1118-27.
7. Johns LD. Nonthermal effects of therapeutic ultrasound: the frequency resonance hypothesis. *J Athl Train* 2002;37(3):293-9.
8. Carvalho PTC, Silva IS, Reis FA, Belchior ACG, Aydos RD, Facco GG, et al. Histological study of tendon healing in malnourished wistar rats treated with ultrasound therapy. *Acta Cir Bras.* 2006;21(4):13-7.
9. Monte-Raso VV, Barbieri CH, Mazzer N, Fazan VPS. Os efeitos do ultra-som terapêutico nas lesões por esmagamento no nervo ciático de ratos: análise funcional da marcha. *Rev Bras Fisioter.* 2006;10(1):113-9.
10. Robertson VJ, Baker KG. A review of therapeutic ultrasound: effectiveness studies. *Phys Ther.* 2001;81(7):1339-50.
11. Okita M, Nakano J, Kataoka H, Sakamoto J, Origuchi T, Yoshimura T. Effects of therapeutic ultrasound on joint mobility and collagen fibril arrangement in the endomysium of immobilized rat soleus muscle. *Ultrasound Med Biol.* 2009;35(2):237-44.
12. Matheus JPC, Oliveira FB, Gomide LB, Milani JGPO, Volpon JB, Shimano AC. Efeitos do ultra-som terapêutico nas propriedades mecânicas do músculo esquelético após contusão. *Rev Bras Fisioter.* 2008;12(3):241-7.

13. Piedade MCB, Galhardo MS, Battlehner CN, Ferreira MA, Caldini EG, Toledo OMS. Effect of ultrasound therapy on the repair of gastrocnemius muscle injury in rats. *Ultrasonics*. 2008;48:403–11.
14. Pinto MVM, Costa DA, Rocha LLV, Santos HR, Silva ALS, Barbosa LG, et al. Comparative study of the effects of the Ga-As (904 nm, 150mW) laser and the pulsed ultrasound of 1 MHz in inflammation of tibialis muscle of wistar rats. *Braz Arch Biol Technol*. 2008;51(special):225-30.
15. Plentz RDM, Stoffel PB, Kolling GJ, Costa ST, Beck C, Signori LU. Alterações hematológicas provocadas pelo ultra-som de 1 MHz na forma contínua aplicadas no tratamento da fase aguda de lesão muscular iatrogênica em ratos. *Rev Bras Fisioter*. 2008;12(6):495-501.
16. Freitas LS, Freitas TP, Silveira PC, Rocha LG, Pinho RA, Streck EL. Effect of therapeutic pulsed ultrasound on parameters of oxidative stress in skeletal muscle after injury. *Cell Biol Int*. 2007;31:482-8.
17. McBrier NM, Lekan JM, Druhan LJ, Devor ST, Merrick MA. Therapeutic ultrasound decreases mechano-growth factor messenger ribonucleic acid expression after muscle contusion injury. *Arch Phys Med Rehabil*. 2007;88:936-40.
18. Lopes LG, Bertolini SMMG, Martins EER, Gewehr PM, Lopes MS. Análise morfométrica de tecido muscular de coelhos submetido a ultra-som pulsado e contínuo de 1 MHz. *Fisioterapia e Pesquisa*. 2005;12(3):15-21.
19. Markert CD, Merrick MA, Kirby TE, Devor ST. Nonthermal ultrasound and exercise in skeletal muscle regeneration. *Arch Phys Med Rehabil*. 2005;86:1304-10.
20. Wilkin LD, Merrick MA, Kirby TE, Devor ST. Influence of therapeutic ultrasound on skeletal muscle regeneration following blunt contusion. *Int J Sports Med*. 2004;25:73-7.
21. Karnes JL, Burton HW. Continuous therapeutic ultrasound accelerates repair of contraction-induced skeletal muscle damage in rats. *Arch Phys Med Rehabil*. 2002;83(1):1-4.
22. Menezes DF, Volpon JB, Shimano AC. Aplicação de ultra-som terapêutico em lesão muscular experimental aguda. *Rev Bras Fisioter*. 1999;4:27-31.



23. Rantanen J, Thorsson O, Wollmer P, Hurme T, Kalimo H. Effects of therapeutic ultrasound on the regeneration of skeletal myofibers after experimental muscle injury. *Am J Sports Med.* 1999;27(1):54-9.
24. Gouvêa CMCP, Vieira PMN, Amaral AC. Efeito do ultra-som na recuperação de músculo tibial anterior de rato lesado. *Rev Univ Alfenas.* 1998;4:165-73.
25. Costa LOP, Costa LCM, Mendes PL, Cançado RL, Lara KL, Lima MD, et al. Efeitos do aquecimento por ultra-som e atividade física aeróbica na flexibilidade do tríceps sural humano: um estudo comparativo. *Fisioter Mov.* 2006;19(2):19-24.
26. Berná-Serna JD, Sánchez-Garre J, Madrigal M, Zuazu I, Berna-Mestre JD. Ultrasound therapy in rectus sheath hematoma. *Phys Ther.* 2005;85(4):352-7.
27. Craig JÁ, Bradley J, Walsh DM, Baxter GD, Allen JM. Delayed onset muscle soreness: lack of effect of therapeutic ultrasound in humans. *Arch Phys Med Rehabil.* 1999;80(3):318-23.
28. Ikeda K, Takayama T, Suzuki N, Shimada K, Otsuka K, Ito K. Effects of low-intensity pulsed ultrasound on the differentiation of C2C12 cells. *Life Sci.* 2006;79(20):1936-43.
29. Shi X, Garry DJ. Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. *Genes Dev.* 2006;20:1692–708.
30. Chargè SBP, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev.* 2004;84:209–38.
31. Mendonça AC, Ferreira AS, Barbieri CH, Thomazine JA, Mazzer N. Efeitos do ultra-som pulsado de baixa intensidade sobre a cicatrização por segunda intenção de lesões cutâneas totais em ratos, *Acta Ortop Bras.* 2006;14(3):152-7.

### 3. ESTUDO 2

Artigo submetido para publicação na Brazilian Journal of Medical and Biological Research

**EFEITO DO ULTRA-SOM TERAPÊUTICO PULSADO SOBRE A  
PROLIFERAÇÃO E ATIVIDADE GELATINOLÍTICA DE MIOBLASTOS  
C2C12: ESTUDO *IN VITRO***

**Título resumido:** Efeito do ultra-som pulsado de baixa intensidade sobre mioblastos.

R. Ribeiro<sup>1</sup>, R.A.M. Ferrari<sup>3</sup>, M.D. Martins<sup>3</sup>, S.K. Bussadori<sup>3</sup>, C.V. Sampaio<sup>2</sup>, P.P. Artilheiro<sup>2</sup>, K.P.S.Fernandes<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Estudante do Curso de Mestrado, Departamento de Ciências da Reabilitação, Universidade Nove de Julho / São Paulo / SP / Brasil

<sup>2</sup> Estudante do Curso de Fisioterapia, Universidade Nove de Julho / São Paulo / SP / Brasil

<sup>3</sup> Doutor, Professor Integral, Departamento de Ciências da Reabilitação, Universidade Nove de Julho / São Paulo / SP / Brasil

**Autor correspondente:**

Kristianne Porta Santos Fernandes.

Av. Francisco Matarazzo, 612, Água Branca, São Paulo, SP, Brasil.

CEP. 05001-100. Fone: (11) 3665-9325, fax: (11) 3365-9301

e-mail- kristianneporta@gmail.com

**Agradecimentos:** Os autores gostariam de agradecer ao Dr. José Ernesto Belizario da Universidade de São Paulo, Brasil, pela doação das células C2C12.

## Resumo

O remodelamento muscular envolve a reação inflamatória, necrose das células danificadas, fagocitose de restos necróticos, proliferação de células satélites de reserva e de fibroblastos, e a recuperação gradual das propriedades funcionais do músculo. O remodelamento da matriz extracelular (MEC) do músculo é principalmente influenciado pelas metaloproteinases de matriz (MMPs), enzimas que têm a habilidade de regular a composição da MEC. No músculo esquelético, a MMP-2 e a MMP-9 parecem estar envolvidas na resposta à injúria, assim como à miopatias e alterações inflamatórias. Uma das terapias mais utilizadas para reparação muscular envolve um agente eletrofísico, o ultra-som (US). No entanto, não existem evidências suficientes da sua efetividade sobre a regeneração muscular e não há ainda consenso sobre os parâmetros apropriados para alcançar esse objetivo. O presente estudo avaliou o efeito do US sobre a proliferação de células satélites bem como sobre a atividade gelatinolítica destas mesmas células. Para tanto, culturas celulares da linhagem C2C12 foram irradiadas com US no modo pulsado a 20%, nas frequências de 1 e 3 MHz, intensidades de 0,2 e 0,5W/cm<sup>2</sup> durante 2 ou 5 minutos. A proliferação celular foi mensurada indiretamente 72 horas após a irradiação por meio da avaliação da atividade mitocondrial das células pelo método MTT e a atividade gelatinolítica foi avaliada por zimografia e análise de densitometria. Não houve diferença significativa na proliferação celular, entre os mioblastos tratados com ultra-som e as culturas controles após 72 horas de incubação e também na análise de densitometria dos géis. Assim, o ultra-som não alterou a proliferação, viabilidade e atividade gelatinolítica dos mioblastos C2C12 usando os parâmetros acima.

**Palavras-chave:** Ultra-som; Cultura celular; Mioblastos; Proliferação; MMP.

## Introdução

O remodelamento muscular pode ser dividido em três fases distintas. Na primeira fase, a inflamação, a necrose das miofibrilas danificadas e a fagocitose dos restos necróticos são as principais características. O objetivo de qualquer tratamento nesta fase será limitar a extensão do hematoma e modular a reação inflamatória<sup>1,2</sup>. Na fase de reparo ou regeneração, a principal característica é a proliferação de células satélites reserva e de fibroblastos originados do endomísio, seguida de uma ativa síntese protéica. As células musculares quiescentes precursoras mononucleadas (mioblastos, células satélites) se tornam ativas, proliferam, diferenciam e se fundem para formar células musculares jovens multinucleadas, conhecidas como miotubos. Os miotubos então se diferenciam e amadurecem para dar origem a uma fibra muscular totalmente funcional<sup>3</sup>. Esses processos são controlados por vários componentes da matriz extracelular (MEC) desintegrada, pelas membranas plasmáticas e por vários fatores de crescimento. A fase da cicatrização, maturação ou remodelamento muscular é caracterizada por uma recuperação gradual das propriedades funcionais do músculo, incluindo a recuperação da resistência à tração do seu componente conjuntivo. O remodelamento da MEC fornece suporte estrutural e proteção, e é importante na manutenção da integridade funcional das fibras<sup>4,5</sup>.

O remodelamento da MEC em condições fisiológicas e patológicas é realizado principalmente pelas metaloproteinases de matriz (MMPs), que são uma família de enzimas zinco-dependentes que têm a capacidade de regular a composição da matriz<sup>4,5</sup>. As MMPs são classificadas em seis grandes subfamílias com base em suas estruturas primárias, organização de domínio, especificidade de substrato e localização celular. No músculo esquelético, MMP-2 (também conhecida como gelatinase A) e MMP-9 (também conhecida como gelatinase B) estão envolvidas nas respostas às lesões, bem como em miopatias inflamatórias e alterações inflamatórias induzidas<sup>6</sup>.

Como o processo de reparo muscular é muito lento e, dependendo da gravidade da lesão, muitas vezes ocorre uma recuperação parcial, encontrar a melhor forma de tratamento para todas as fases da reparação muscular é uma questão desafiadora em reabilitação<sup>1,7</sup>. O ultra-som (US) é o agente eletrofísico mais amplamente disponível e o mais freqüentemente utilizado no tratamento

fisioterápico de lesões músculo-esqueléticas<sup>8</sup>. No entanto, com as evidências biofísicas atuais ainda há muitas dúvidas em relação ao mecanismo de ação do ultra-som terapêutico pulsado bem como os parâmetros adequados para atingir a regeneração muscular desejada<sup>2,9-12</sup>. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da irradiação do ultra-som sobre a proliferação de células satélites e remodelamento por meio da avaliação da atividade de proteinases.

## **Material e Métodos**

### **Cultura celular**

A linhagem das células C2C12 é um subclone da linhagem celular de mioblastos C2, células derivadas de células-satélite de ratos adultos<sup>13</sup> e foram doadas pelo Dr. José Ernesto Belizario da Universidade de São Paulo, Brasil. As células C2C12 foram cultivadas em meio Dulbecco modificado por Eagle (DMEM, CULTILAB, Campinas, SP, Brasil), suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS, CULTILAB), e 1% antibiótico solução antimicótica (CULTILAB), a 37°C, em uma atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>. As células foram mantidas em densidades de subconfluência e subcultivadas a cada 2-3 dias. Antes dos experimentos, todas as culturas de células foram examinadas com um microscópio de luz (Eclipse TE 2000U, Nikon, Melville, NY, EUA) e a viabilidade das culturas foi confirmada pelo teste de exclusão Azul de Trypan (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

### **Modelo de aplicação do ultra-som**

Para a aplicação do ultra-som utilizamos um aparelho Sonomaster Microcontrolled Communicator (KW Eletrônica, Amparo, SP/Brasil), nas frequências de 1 e 3 MHz, intensidades de 0,2 e 0,5 W/cm<sup>2</sup>, no modo pulsado a 20% e tempos de 2 e 5 minutos.

As aplicações foram realizadas no interior de um banho-maria com controle termostático (Nova Técnica NT271, Piracicaba, SP, Brasil) para manter a temperatura constante de 37°C. O reservatório apresentava dimensão interna de 16 cm x 30 cm x 49 cm e suas paredes laterais e inferior foram cobertas por borracha para eliminar reflexos múltiplos. O tanque foi preenchido

com água destilada, deionizada, desmineralizada que era substituída antes de cada experimento.

As células de cada grupo experimental foram preparadas em tubos de ensaio (tubo Falcon estéril). Um aparato de madeira foi desenvolvido para fixar a cabeça do transdutor (3,2 cm de diâmetro) e os tubos de cultura, de modo que o US pudesse ser transversalmente irradiado na direção das extremidades inferiores dos tubos a uma distância de 3 cm (Figura 1), de acordo com o esquema proposto por Mukai *et al.* (2005)<sup>14</sup>. Culturas controle foram submetidas ao mesmo procedimento, porém com o aparelho de US desligado. Os grupos experimentais estão descritos na tabela 1.

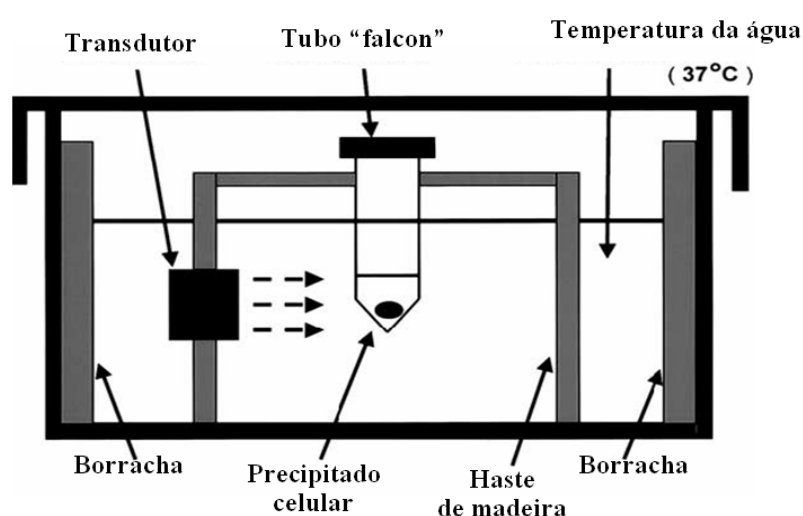


Figura 1. Representação esquemática do aparato para aplicação do ultra-som na cultura celular. Adaptado de Mukai *et al.* (2005)

Tabela 1 – Grupos experimentais

Grupo	Frequência (MHz)	Tempo (Minutos)	Intensidade (W/cm <sup>2</sup> )
1	1	2	0,2
2	1	2	0,5
3	1	5	0,2
4	1	5	0,5
5	3	2	0,2
6	3	2	0,5
7	3	5	0,2
8	3	5	0,5

Após a irradiação, as células controle (não irradiadas) e as tratadas (irradiadas) foram ressuspensas em meio DMEM contendo 10% Soro Fetal Bovino (SFB) e plaqueadas ( $10^3$  células/poço) em placas de 96 poços. Para a análise de viabilidade, as culturas foram incubadas em uma atmosfera úmida de 5%  $\text{CO}_2$  por 72 h. Em seguida, a análise da atividade mitocondrial foi realizada para avaliar a viabilidade celular.

A função mitocondrial dos mioblastos C2C12 foi avaliada por meio do ensaio MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Depois da irradiação e incubação por 72 horas, o MMT foi adicionado às culturas celulares numa concentração de 0,5 mg/mL e as células foram incubadas num ambiente úmido, contendo 5%  $\text{CO}_2$ , a  $37^\circ$  por 3 h. Depois deste período, 100  $\mu\text{L}$  de isopropanol foi adicionado em cada poço para dissolver os cristais formazan. A absorbância foi medida a 620 nm usando um leitor de microplacas (Anthos2020, Anthos Labtec Instruments, Wals, Austria). Os dados de absorbância, correspondente à viabilidade celular, foram obtidos em quadruplicata e estão apresentados como médias  $\pm$  desvio padrão.

### **Atividade gelatinolítica**

A atividade gelatinolítica do sobrenadante de todas as amostras das culturas de células foi detectada por SDS-gel de gelatina por zimografia. Resumidamente, o conteúdo de proteína total foi estimado utilizando o teste de Bradford (BioRad Laboratories, Hercules, CA, EUA), seguindo o método de Bradford. Para o ensaio enzimático, géis de SDS (10%) foram preparadas com 1 mg/mL de gelatina e proteínas de 30 mg foram carregados por faixa, sem redução. Após a eletroforese, os géis foram lavados duas vezes durante 15 minutos cada um com 2,5% Triton X-100 para eliminar SDS. Os géis foram então incubados overnight a  $37^\circ\text{C}$  em tampão de substrato Tris-HCl 50 mM, pH 8,5,  $\text{CaCl}_2$  5 mM, e  $\text{NaN}_3$  0,02%). Os géis foram corados por 30 min, com 0,05% de Coomassie blue R-250 em ácido acético: metanol: água (1:4:5) e descorado na mesma solução. Todos os géis foram preparados e executados ao mesmo tempo. As bandas de todos os géis e de todos os grupos experimentais foram quantificadas por densitometria utilizando o software

Image J (Software: Image Processing and Analysis in Java - Image J 1.41, NIH), sendo que cada banda foi mensurada três vezes para se obter a média e o desvio padrão. Ensaio enzimáticos também foram realizados na presença de EDTA 15 mM. As metaloproteinases são enzimas zinco-dependentes e o EDTA se quela ao zinco vinculado à metaloproteinase, inibindo assim a sua atividade.

### **Análise estatística**

As comparações entre os grupos foram realizadas por análise de variância (ANOVA). O teste de Dunnet foi utilizado para determinar diferenças significativas entre os grupos experimentais e o grupo controle. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. Os dados foram analisados por meio do programa GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, E.U.A.). Todos os experimentos foram realizados em quadruplicata e repetidos por três vezes, embora apenas um experimento único representativo de três está exposto em cada figura.

## **Resultados**

### **Efeito do ultra-som pulsado de baixa intensidade sobre a proliferação celular**

Não houve diferença significativa na proliferação celular, avaliada pelo método MTT, entre as culturas celulares tratadas com ultra-som e as culturas controle, após 72 horas de incubação. A Figura 2 (1 MHz) e a Figura 3 (3 MHz) mostram a comparação da viabilidade de células C2C12 irradiadas nos parâmetros citados acima, com as células não-irradiadas.



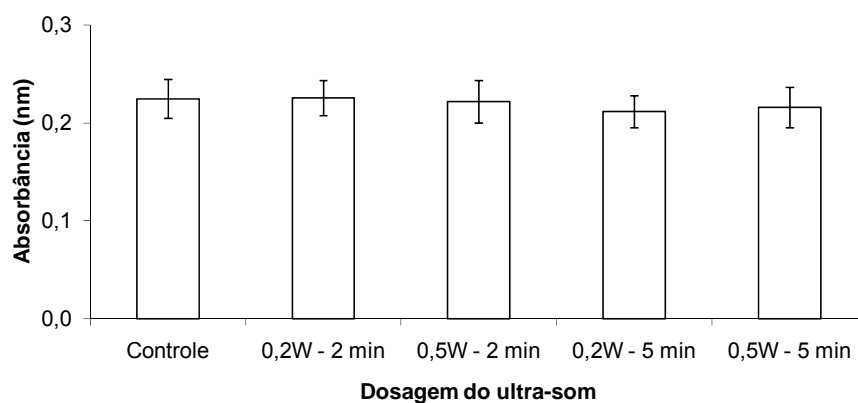


Figura 2. Viabilidade celular mensurada em absorbância pelo método MTT das culturas de células C2C12 irradiadas com ultra-som pulsado de baixa intensidade de 1 MHz durante 2 ou 5 minutos nas intensidades de 0,2 e 0,5 W/cm<sup>2</sup>

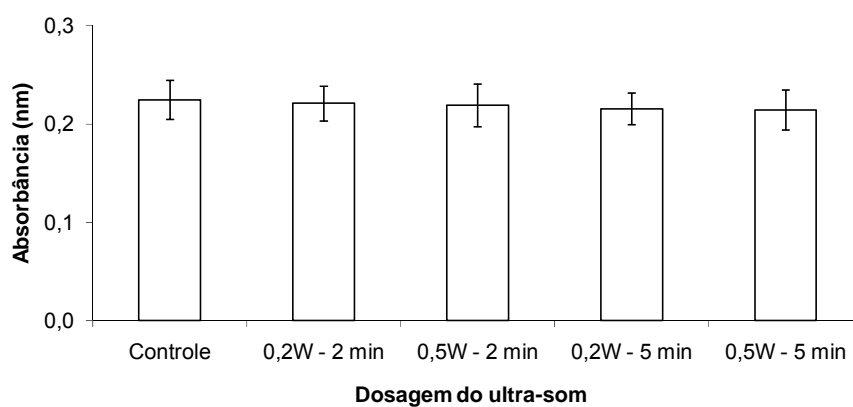


Figura 3. Viabilidade celular mensurada em absorbância pelo método MTT das culturas de células C2C12 irradiadas com ultra-som pulsado de baixa intensidade de 3 MHz durante 2 ou 5 minutos nas intensidades de 0,2 ou 0,5 W/cm<sup>2</sup>.

### Efeito do ultra-som terapêutico pulsado na atividade de gelatinase nos sobrenadantes das culturas celulares

A figura 4 mostra a atividade gelatinolítica presente nos sobrenadantes das culturas de todos os grupos experimentais. Cada faixa representa um conjunto de quatro amostras dos diferentes grupos. Todas as amostras apresentaram atividade gelatinolítica semelhante. As massas moleculares que proporcionaram hidrólise da gelatina foram de aproximadamente 62 kDa, sugerindo a forma ativa da MMP-2. As amostras foram testadas com o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA, não mostrado) e não houve atividade.

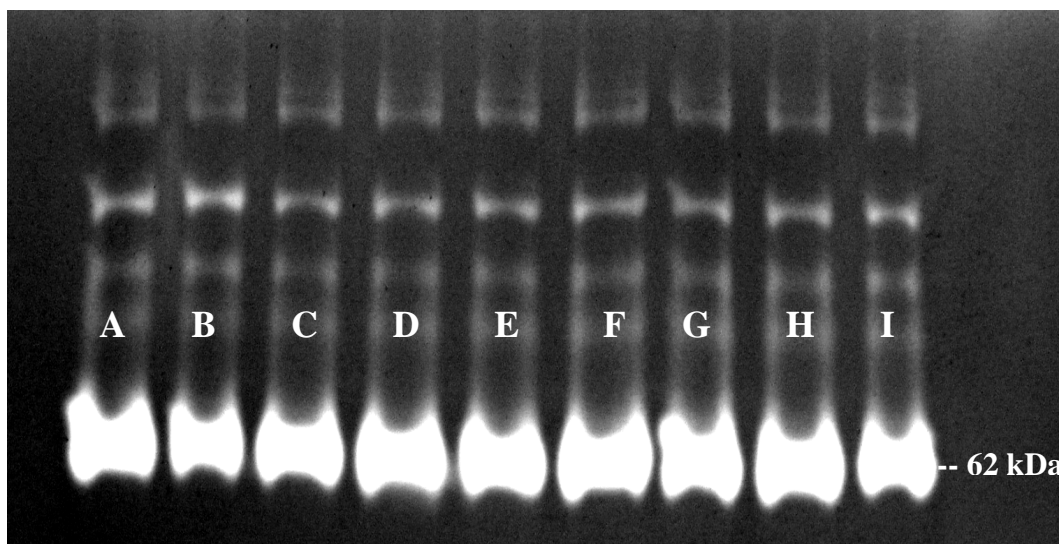


Figura 4. Detecção da atividade gelatinolítica nos meios de cultura por meio de zimografia. Cada linha representa um grupo experimental - A: Controle; B:  $0,2\text{W}/\text{cm}^2$  - 2min - 1MHz; C:  $0,5\text{W}/\text{cm}^2$  - 2min - 1MHz; D:  $0,2\text{W}/\text{cm}^2$  - 5min - 1MHz; E-  $0,5\text{W}/\text{cm}^2$  - 5min - 1MHz ; F:  $0,2\text{W}/\text{cm}^2$  - 2min - 3MHz; G:  $0,5\text{W}/\text{cm}^2$  - 2min - 3MHz; H:  $0,2\text{W}/\text{cm}^2$  - 5min - 3MHz; I:  $0,5\text{W}/\text{cm}^2$  - 5min - 3MHz.

Na análise de densitometria dos géis a concentração de proteinase dos grupos é apresentada como média e desvio padrão e foi determinada somando-se a densidade óptica integrada obtida (expressos em unidades arbitrárias) pelas três bandas (pró-enzima, intermediária e forma ativa).

Nenhuma diferença estatística foi encontrada entre o controle e os grupos experimentais, tanto em 1 MHz, como em 3 MHz (Figura 5).

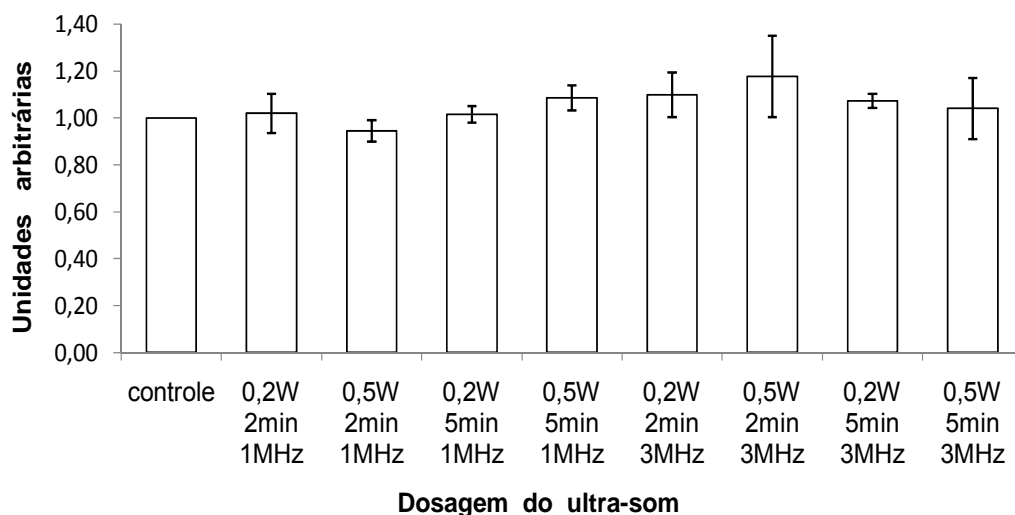


Figura 5. Concentração de proteinase (gelatinase) expressa em média e desvio padrão, determinada pela soma da densidade óptica integrada (expressa em unidades arbitrárias). Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e experimentais, tanto em 1 MHz como em 3 MHz. (\* $p < 0,05$ ; ANOVA - Dunnet).

## Discussão

Até o presente momento não se encontra na literatura um trabalho que avalie o efeito do ultra-som terapêutico pulsado sobre a proliferação e a viabilidade de células musculares, bem como sobre sua atividade gelatinolítica.

Com base nisso, o presente estudo teve este objetivo ao adotar este modelo experimental, onde pode-se observar que nos parâmetros avaliados a irradiação por US não influenciou a viabilidade dos mioblastos C2C12 e não proporcionou taxas de crescimento celular superiores aos observados nas culturas controle. Estes resultados foram obtidos pelo ensaio MTT, que avalia a atividade mitocondrial.

A cultura celular é, por definição, um artefato, no entanto, permite que o investigador tenha um controlo rigoroso sobre diversas variáveis do processo e possa fazer questionamentos de maneira mais sistemática<sup>15</sup>. Portanto, estudos *in vitro* como o presente trabalho são importantes complementos dos estudos *in vivo*.

Foi utilizada a linhagem celular C2C12 porque essas células são um subclone da linhagem de mioblastos C2 isoladas de células-satélites de ratos adultos, apresentam a maioria das características dos mioblastos normais, e são comumente usadas como modelo para estudar a proliferação e a diferenciação de células musculares. Além disso, o uso de linhagens celulares como modelos para a análise da proliferação celular elimina a possibilidade da influência do US sobre a produção de fatores de crescimento de células não miogénicas contidas em culturas primárias, como fibroblastos e macrófagos<sup>13,16</sup>.

Além disso, o protocolo de cultura celular adotado possibilita a “eliminação” dos efeitos térmicos do US e o estudo dos efeitos mecânicos do mesmo, na tentativa de identificar seu mecanismo de ação<sup>15</sup>. Embora a exposição ao ultra-som não tenha aumentado a temperatura global do sistema experimental (não houve alteração na temperatura da água durante a aplicação do US), é difícil determinar se ocorreram aumentos de temperatura na superfície ou nos microambientes celulares. No entanto, aferições diretas de alterações de temperatura nestes microambientes não são atualmente possíveis<sup>15</sup>.

Um segundo aspecto importante quando se projeta experimentos para avaliar terapias, é o quanto é possível adaptar o procedimento para aplicá-lo no modelo adotado. Como o ultra-som terapêutico tem uma faixa de frequência de 0,75 a 3 MHz, e a maioria dos aparelhos e dos estudos usam uma frequência de 1 ou 3 MHz<sup>10</sup>, estas duas frequências foram avaliadas no presente estudo. As intensidades de saída foram 0,5 e 0,2 W/cm<sup>2</sup>, e tempos de aplicação de 2 ou de 5 minutos. A intensidade média, portanto, foi de 0,1 e 0,04 W/cm<sup>2</sup>. Como o cabeçote do ultra-som tinha uma área de irradiação efetiva de 3,2 cm<sup>2</sup>, as potências de saída do aparelho foram de 0,32 W e de 0,128 W.

A maioria dos estudos que avaliou o efeito do US no músculo esquelético em animais, utilizou intensidades de 0,1 a 3 W/cm<sup>2</sup> e períodos de aplicação de

5 a 15 minutos. No entanto, nos estudos em humanos o US foi utilizado em intensidades que variaram de 0,8 a 2 W/cm<sup>2</sup> com tempos de aplicação de 7 a 14 minutos<sup>1,2,8,11,17-22</sup>. De acordo com Warden e McMeeken (2002)<sup>8</sup> os terapeutas predominantemente usam o US de ondas pulsadas em intensidades de 0.51 a 2 W/cm<sup>2</sup> e períodos de aplicação de 2 a 20 min.

A respeito do modo de emissão das ondas ultrasonicas, verifica-se que os estudos que avaliaram o efeito do US em músculos esqueléticos de animais, usaram o modo pulsado e o contínuo. No entanto, em estudos que avaliaram o US em músculo esquelético de humanos, o US foi sempre usado no modo pulsado<sup>1,2,7,11,17-22</sup>. Assim, o ultra-som no modo pulsado a 20% foi adotado no presente estudo. Além disso, a emissão pulsada não gera efeitos térmicos como a emissão contínua e também previne os efeitos danosos da reflexão, pois quando as ondas refletidas encontram outras ondas geradas acaba por formar uma onda ultrasônica permanente com efeito adverso sobre o tecido<sup>23-25</sup>. Foi utilizada ainda água destilada, deionizada, desmineralizada como meio de transmissão para prevenir os efeitos de reflexão<sup>14</sup>.

A comparação dos resultados obtidos nos ensaios sobre os efeitos terapêuticos do US é muito difícil, pois os efeitos dependem do tipo de célula, do tipo de tecido, da patologia, e também da dosagem utilizada. Além disso, o US é agraciado com um grande número de parâmetros que se combinam para construir a dose final<sup>12</sup>.

Ao analisar os ensaios *in vitro*, se observa que alguns autores relatam que o US promove a proliferação de osteoblastos, fibroblastos<sup>26-29</sup>, células endoteliais<sup>30</sup> e condrócitos<sup>14</sup>. No entanto, outros trabalhos não demonstraram de forma significativa os efeitos aditivos do US sobre a proliferação de fibroblastos<sup>31</sup>, de células provenientes de discos intervertebrais de bovinos<sup>32</sup>, de células uro-epiteliais<sup>33</sup> e de condrócitos<sup>34,35</sup>. Alguns estudos relatam até mesmo uma diminuição no número de fibroblastos após o tratamento com US<sup>36-38</sup>.

Apenas um artigo que analisa o efeito do US sobre culturas de mioblastos C2C12 foi encontrado na literatura, mas os parâmetros e objetivos eram muito diferentes dos adotados neste estudo, pois avaliaram a diferenciação de células C2C12 após a aplicação do US na frequência de 1,5 MHz, intensidade de 70 mW/cm<sup>2</sup> durante 20 min, observando que o US estimulou a diferenciação

das células C2C12 em osteoblastos e condroblastos, tornando difícil a comparação dos resultados<sup>39</sup>.

De qualquer modo, mesmo se fosse considerado que o US não tem efeito sobre células satélites *in vitro*, deve-se considerar que, *in vivo*, muitos outros tipos celulares podem responder aos estímulos mecânicos do US e também há muitos fatores solúveis como fatores de crescimento, lipídios mitogênicos, citocinas inflamatórias e hormônios que são conhecidos reguladores da proliferação celular. Além disso, o US embora não tenha gerado estímulo proliferativo, também não impediu o crescimento celular.

De fato, foi demonstrado que o US pulsado aumenta a proliferação de células satélites e de fibroblastos em modelo experimental de lesão contusa em músculo gastrocnêmio de rato<sup>1</sup>. Além disso, foi demonstrado que o tratamento com US melhora a extensibilidade muscular<sup>40</sup>, a produção de força após lesão por contração<sup>20</sup>, e pode aumentar a diferenciação das células musculares em modelo animal<sup>7</sup>. No entanto, outros autores que também utilizaram modelo experimental animal, foram incapazes de demonstrar um aumento estatisticamente significativo na massa muscular ou na regeneração tecidual em lesões musculares tratadas com o US<sup>11,18,19</sup>. Esta controvérsia apóia a idéia de que ainda há uma escassez de evidência científica sobre a eficácia do US na reparação muscular ou que os protocolos de tratamento comumente empregados para o ultra-som não são capazes de prover a eficácia terapêutica<sup>7,15</sup>, muito disso devido também à grande variação dos parâmetros adotados em cada trabalho, além da metodologia utilizada, que dificulta a comparação ou complementação de resultados.

Por outro lado, o reparo do músculo estriado requer não apenas proliferação, mas também interação equilibrada entre células musculares, MEC e metaloproteinases, neovascularização, e a adesão de fibras musculares à matriz extracelular<sup>41</sup>.

As MMP-2 e MMP-9 degradam colágenos do tipo IV e V, bem como colágenos desnaturados intersticiais. Enquanto a MMP-2 também é secretada no músculo esquelético por fibroblastos e células satélites, a MMP-9 é produzida principalmente por leucócitos<sup>5</sup>. Na maioria dos estudos, a MMP-2 está relacionada com a regeneração de novas fibras musculares, possivelmente devido à degradação do colágeno tipo IV na membrana basal<sup>42</sup>.

Também tem sido demonstrado que os mioblastos C2C12 secretam MMP-2 de uma forma constitutiva<sup>43</sup>.

As análises dos resultados da zimografia revelaram atividade gelatinolítica similar em todas as amostras experimentais. A massa molecular das bandas que proporcionaram hidrólise da gelatina eram de aproximadamente 62 kDa, sugerindo a forma ativa de MMP-2. Assim, sugere-se que nesses parâmetros o US não exerce efeito sobre a produção de proteinases, ou mais, que o US não exerce efeito sobre a produção de MMP-2 pelos mioblastos. Nenhum trabalho que descrevesse o efeito do US sobre a produção de MMP por mioblastos foi encontrado, assim, não foi possível comparar os resultados do presente trabalho.

Muitas questões surgem deste trabalho, assim, novos estudos devem ser conduzidos com o objetivo de entender o mecanismo da bioestimulação do US sobre as células do músculo esquelético. Além disso, esses estudos podem também determinar os parâmetros corretos para otimizar a bioestimulação dos mioblastos.

## Referências Bibliográficas do Estudo 2

1. Rantanen J, Thorsson O, Wollmer P, Hurme T, Kalimo H. Effects of therapeutic ultrasound on the regeneration of skeletal myofibers after experimental muscle injury. *Am J Sports Med* 1999; 27(1): 54-59.
2. Freitas LS, Freitas TP, Silveira PC, Rocha LG, Pinho RA, Streck EL. Effect of therapeutic pulsed ultrasound on parameters of oxidative stress in skeletal muscle after injury. *Cell Biol Int* 2007; 31: 482-488.
3. Huard J, Li Y, Fu FH. Muscle injuries and repair: current trends in research. *J Bone Joint Surg Am* 2002; 84: 822-832
4. Kjaer M. Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. *Physiol Rev* 2004; 84: 649-698.
5. Carmeli E, Moas M, Reznick AZ, Coleman R. Matrix metalloproteinases and skeletal muscle: a brief review. *Muscle Nerve* 2004; 29(2): 191-197.
6. Choi YC, Dalakas MC. Expression of matrix metalloproteinases in the muscle of patients with inflammatory myopathies. *Neurology* 2000; 54: 65–71.
7. Piedade MCB, Galhardo MS, Battlehner CN, Ferreira MA, Caldini EG, Toledo OMS. Effect of ultrasound therapy on the repair of gastrocnemius muscle injury in rats. *Ultrasonics* 2008; 48: 403–411.
8. Warden SJ, McMeeken JM. Ultrasound usage and dosage in sports physiotherapy. *Ultrasound Med Biol* 2002; 28: 1075-1080.
9. Baker KG, Robertson VL, Duck FA. A review of therapeutic ultrasound: biophysical effects. *Phys Ther* 2001; 81(7): 1351-1358.
10. Robertson VJ, Baker KG. A review of therapeutic ultrasound: effectiveness studies. *Phys Ther* 2001; 81(7): 1339-1350.
11. Markert CD, Merrick MA, Kirby TE, Devor ST. Nonthermal ultrasound and exercise in skeletal muscle regeneration. *Arch Phys Med Rehabil* 2005; 86: 1304-1310.
12. Warden SJ. A new direction for ultrasound therapy in sports medicine. *Sports Med* 2003; 33 (2): 95-107
13. Ferreira MPP, Ferrari RAM, Gravalos ED, Martins MD, Bussadori SK, Gonzales DAB, et al. Effect of low-energy GaAlAs and InGaAlP laser irradiation on the viability of C2C12 myoblasts in a muscle injury model. *Photomed Laser Surg* 2009. (in press)



14. Mukai S, Ito H, Nakagawa Y, Akiyama H, Miyamoto M, Nakamura T. Transforming growth factor B1 mediates the effects of low-intensity pulsed ultrasound in chondrocytes. *Ultrasound Med Bio*. 2005; 31(12): 1713-1721.
15. Johns LD. Nonthermal Effects of Therapeutic Ultrasound: The Frequency Resonance Hypothesis. *J Athl Train* 2002;37(3):293–299.
16. Chandran R, Knobloch TJ, Anghelina M, Agarwal S. Biomechanical signals upregulate myogenic gene induction in the presence or absence of inflammation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 293, C267–C276.
17. Okita M, Nakano J, Kataoka H, Sakamoto J, Origuchi T, Yoshimura T. Effects of therapeutic ultrasound on joint mobility and collagen fibril arrangement in the endomysium of immobilizes rat soleus muscle. *Ultrasound Med Biol*. 2009; 35(2): 237-244.
18. McBrier NM, Lekan JM, Druhan LJ, Devor ST, Merrick MA. Therapeutic ultrasound decreases mechano-growth factor messenger ribonucleic acid expression after muscle contusion injury. *Arch Phys Med Rehabil* 2007; 88: 936-40.
19. Wilkin LD, Merrick MA, Kirby TE, Devor ST. Influence of therapeutic ultrasound on skeletal muscle regeneration following blunt contusion. *Int J Sports Med* 2004; 25: 73–77.
20. Karnes JL, Burton HW. Continuous therapeutic ultrasound accelerates repair of contraction-induced skeletal muscle damage in rats. *Arch Phys Med Rehabil* 2002; 83: 1-4.
21. Berná-Serna JD, Sánchez-Garre J, Madrigal M, Zuazu I, Berna-Mestre JD. Ultrasound therapy in rectus sheath hematoma. *Phys Ther* 2005; 85(4): 352-357.
22. Craig JÁ, Bradley J, Walsh DM, Baxter GD, Allen JM. Delayed onset muscle soreness: lack of effect of therapeutic ultrasound in humans. *Arch Phys Med Rehabil* 1999; 80(3): 318-323.
23. Carvalho PTC, Silva IS, Reis FA, Belchior ACG, Aydos RD, Facco GG, *et al*. Histological study of tendon healing in malnourished wistar rats treated with ultrasound therapy. *Acta Cir Bras* 2006;21(4):13-7.
24. Monte-Raso VV, Barbieri CH, Mazzer N, Fazan VPS. Os efeitos do ultrassom terapêutico nas lesões por esmagamento no nervo ciático de ratos: análise funcional da marcha. *Rev Bras Fisioter* 2006;10(1):113-9.

25. Frasson NFV, Parizotto NA, Taciro C. Análise nanoestrutural da ação do ultra-som terapêutico sobre o processo de regeneração do tendão de ratos adultos. Congresso de Iniciação Científica, 15, 2007, São Carlos. Anais de Eventos da UFSCar 2007; 3: 533.
26. Chen YJ, Wang CJ, Yang KD, Chang PR, Huang HC, Huang YT, et al. Pertussis toxin-sensitive GKi protein and ERK-dependent pathways mediate ultrasound promotion of osteogenic transcription in human osteoblasts. *FEBS Lett* 2003; 554(1-2): 154-158.
27. Zhou S, Schmelz A, Seufferlein T, Li Y, Zhao J, Bachem MG. Molecular mechanisms of low intensity pulsed ultrasound in human skin fibroblasts. *J Biol Chem* 2004; 279(52): 54463-54469.
28. Lai J, Pittelkow MR. Physiological effects of ultrasound mist in fibroblast. *Int J Dermatol* 2007; 46: 587-593.
29. Doan N, Reher P, Meghji S, Harris M. In vitro effects of therapeutic ultrasound on cell proliferation, protein synthesis, and cytokine production by human fibroblasts, osteoblasts, and monocytes. *J Oral Maxillofac Surg* 1999; 57: 409-419.
30. Mizrahi N, Seliktar D, Kimmel E. Ultrasound-induced angiogenic response in endothelial cells. *Ultrasound Med Biol* 2007; 33(11): 1818-1829.
31. De Oliveira RF, Oliveira DA, Monteiro W, Zangaro RA, Magini M, Soares CP. Comparison between the effect of low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasonic irradiation in vitro. *Photomed Laser Surg* 2008; 26(1): 6-9.
32. Miyamoto K, An HS, Sah RL, Akeda K, Okuma M, Otten L, et al. Exposure to pulsed low intensity ultrasound stimulates extracellular matrix metabolism of bovine intervertebral disc cells cultured in alginate beads. *Spine* 2005; 30(21): 2398-2405.
33. Hill GE, Fenwick S, Matthews BJ, Chivers RA, Southgate J. The effect of low-intensity pulsed ultrasound on repair of epithelial cell monolayers *in vitro*. *Ultrasound Med Biol* 2005; 31(12): 1701-1706.
34. Parvizi J, Wu CC, Lewallen DG, Greenleaf JF, Bolander ME. Low-intensity ultrasound stimulates proteoglycan synthesis in rat chondrocytes by increasing aggrecan gene expression. *J Orthop Res* 1999; 17(4): 488-494.

35. Zhang ZJ, Huckle J, Francomano CA, Spencer RG. The effects of pulsed low intensity ultrasound on chondrocyte viability, proliferation, gene expression and matrix production. *Ultrasound Med Biol* 2003; 29: 1645-1651.
36. De Deyne PG, Kirsch-Volders M. In vitro effects of therapeutic ultrasound on the nucleus of human fibroblasts. *Phys Ther* 1995; 75: 629–634.
37. Fahnestock M, Rimer VG, Yamawaki PR, Edmonds PD. Effects of ultrasound exposure in vitro on neuroblastoma cell membranes. *Ultrasound Med Biol*. 1989; 15: 133-144.
38. Ramirez A, Schwane JA, McFarland C, Starcher B. The effect of ultrasound on collagen synthesis and fibroblast proliferation in vitro. *Med Sci Sport Exerc* 1997; 29: 326-332.
39. Ikeda K, Takayama T, Suzuki N, Shimada K, Otsuka K, Ito K. Effects of low-intensity pulsed ultrasound on the differentiation of C2C12 cells. *Life Sci* 2006; 79(20): 1936-1943.
40. Wessling KC, DeVane DA, Hylton CR. Effects of static stretch versus static stretch and ultrasound combined on triceps surae muscle extensibility in healthy women. *Phys Ther* 1987; 67: 674-679.
41. Kääriäinen M, Kääriäinen J, Järvinen TLN, Nissinen L, Heino J, Järvinen M, Kalimo H. Integrin and dystrophin associated adhesion protein complexes during regeneration of shearing-type muscle injury. *Neuromuscul Disord* 2000; 10:121–132.
42. Fukushima K, Nakamura A, Ueda H, Yuasa K, Yoshida K, Takeda S, et al. Activation and localization of matrix metalloproteinase-2 and -9 in the skeletal muscle of the muscular dystrophy dog (CXMDJ). *BMC Musculoskelet Disord* 2007; 8:54.
43. Lluri BSG, Jaworski DM. Regulation of TIMP-2, MT1-MMP, and MMP-2 expression during C2C12 differentiation. *Muscle Nerve* 2005; 32: 492-499.

### 3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo, buscou-se aliar os dados obtidos por meio da pesquisa bibliográfica sobre a utilização do US em tecido muscular, com um modelo experimental *in vitro* onde fosse possível avaliar o efeito deste recurso terapêutico sobre a célula mais representativa deste tecido, o mioblasto.

Com os dados do levantamento bibliográfico, verifica-se que até o presente momento não há suporte científico para a utilização do ultra-som terapêutico pulsado no tratamento de lesões musculares, devido à carência de estudos em modelos celulares e animais e de estudos clínicos randomizados e controlados.

Já no estudo *in vitro*, constatou-se que o US não alterou a proliferação, a viabilidade e a atividade gelatinolítica dos mioblastos C2C12 quando expostos a irradiação nos parâmetros descritos. Por outro lado, se evidenciou também que o US não é lesivo às células musculares, mantendo nos grupos experimentais viabilidade similar a do grupo controle.

Como este agente terapêutico continua sendo largamente utilizado com o objetivo de acelerar o processo de reabilitação do músculo esquelético, pode-se concluir que há necessidade premente da realização de novos estudos nos diversos modelos a fim de que se possa num futuro próximo estabelecer seu real papel como recurso terapêutico.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Grounds MD, White JD, Rosenthal N, Bogoyevitch MA. The Role of Stem Cells in Skeletal and Cardiac Muscle Repair. *J Histochem Cytochem* 2002;50:589-610.
2. Seale P, Rudnicki MA. A new look at the origin, function and "stem-cell" status of muscle satellite cells. *Dev Biol* 2000;218(2):115-24.
3. Kumar A, Mohan S, Newton J, Rehage M, Tran K, Baylink DJ. Pregnancy-associated Plasma Protein-A Regulates Myoblast Proliferation and Differentiation through an Insulin-like Growth Factor-dependent Mechanism. *J Biol Chem* 2005;280(45):37782-9.
4. Dogra C, Hall SL, Wedhas N, Linkhart TA, Kumar A. Fibroblast growth factor inducible-14 (Fn14) is required for the expression of myogenic regulatory factors and differentiation of myoblasts into myotubes: Evidence for TWEAK-independent functions of Fn14 during myogenesis. *J Biol Chem* 2007;282(20):15000-10.
5. Goetsch SC, Hawke TJ, Gallardo TD, Richardson JA, Garry DJ. Transcriptional profiling and regulation of the extracellular matrix during muscle regeneration. *Physiol Genomics* 2003;14(3):261-71.
6. Stetler-Stevenson WG. Dynamics of matrix turnover during pathologic remodeling of the extracellular matrix. *Am J Pathol* 1996;148(5):1345-50.
7. Massova I, Kotra LP, Fridman R, Mobashery S. Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification. *FASEB J* 1998;12:1075-95.
8. Carmeli E, Moas M, Reznick AZ & Coleman R. Matrix metalloproteinases and skeletal muscle: a brief review. *Muscle Nerve* 2004; 29(2):191-7.
9. Koskinen SAO, Kjaer M, Mohr T, Sorensen FB, Suuronen T, Takala TES. Type IV collagen and its degradation in paralyzed human muscle: effect of functional electrical stimulation. *Muscle Nerve* 2000;23(4):580-9.
10. Verzola RMM, Mesquita RA, Peviani S, Ramos OHP, Moriscot AS, Perez S, *et al.* Early remodeling of rat cardiac muscle induced by swimming training. *Braz J Med Biol Res* 2006;39(5):621-7.
11. Haas TL, Milkiewicz M, Davis SJ, Zhou AL, Egginton S, Brown MD, *et al.* Matrix metalloproteinase activity is required for activity-induced

- angiogenesis in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;279(4):H1540-7.
12. Carmeli E, Moas M, Lennon S, Powers SK. High intensity exercise increases expression of matrix metalloproteinases in fast skeletal muscle fibres. *Exp Physiol*. 2005 Jul;90(4):613-9.
  13. Van Gieson EJ, Skalak TC. Chronic vasodilation induces matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) expression during microvascular remodeling in rat skeletal muscle. *Microcirculation* 2001; 8(1):25-31.
  14. Rucavado A, Escalante T, Teixeira CF, Fernandes CM, Diaz C, Gutierrez JM. Increments in cytokines and matrix metalloproteinases in skeletal muscle after injection of tissue-damaging toxins from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Mediators Inflamm* 2002;11(2):121-8.
  15. Baker KG, Robertson VL, Duck FA. A review of therapeutic ultrasound: biophysical effects. *Phys Ther* 2001;81(7):1351-1358.
  16. Speed, C.A., Therapeutic ultrasound in soft tissue lesions. *Rheumatology (Oxford)* 2001;40:1331-6.
  17. Sundaram J, Mellein BR, Mitragotri S. An experimental and theoretical analysis of ultrasound-induced permeabilization of cell membranes. *Biophys J* 2003;84(5):3087-101.
  18. Blume K, Matsuo E, Lopes MS, Lopes LG. Dosimetria proposta para o tratamento por ultra-som - uma revisão de literatura. *Fisioter Mov* 2005; 18(3):55-64.
  19. Ferrari RJ, Picchi LD, Botelho AP, Minamoto V. Processo de regeneração na lesão muscular: uma revisão. *Fisioter Mov* 2005;18(2):63-71.
  20. Franco AD, Pereira LE, Groschitz M, Aimbire F, Martins RABL, Carvalho RA. Análise do efeito do ultra-som no edema inflamatório agudo – estudo experimental. *Fisioter Mov* 2005;18(2):19-24.
  21. Mitragotri S. Healing sound: the use of ultrasound in drug delivery and other therapeutic applications. *Nat Rev Drug Discov* 2005;4:255-60.
  22. Bassoli DA. Avaliação dos efeitos do ultra-som pulsado de baixa intensidade na regeneração de músculos esqueléticos com vistas à aplicabilidade em clínica fisioterapêutica [dissertação]. São Carlos (SP): Univ. São Paulo; 2001.

23. Warden SJ, Fuchs RK, Kessler CK, Avin KG, Cardinal RE, Stewart RL. Ultrasound Produced by a Conventional Therapeutic Ultrasound Unit Accelerates Fracture Repair. *Phys Ther* 2006;86(8):1118-27.
24. Pong M, Umchid S, Guarino AJ, Lewin PA, Litniewski J, Nowicki A, *et al.* In vitro ultrasound-mediated leakage from phospholipid vesicles. *Ultrasonics* 2006;45:133-45.
25. Carvalho PTC, Silva IS, Reis FA, Belchior ACG, Aydos RD, Facco GG, *et al.* Histological study of tendon healing in malnourished wistar rats treated with ultrasound therapy. *Acta Cir Bras* 2006;21(4):13-7.
26. Monte-Raso VV, Barbieri CH, Mazzer N, Fazan VPS. Os efeitos do ultra-som terapêutico nas lesões por esmagamento no nervo ciático de ratos: análise funcional da marcha. *Rev Bras Fisioter* 2006;10(1):113-9.
27. Frasson NFV, Parizotto NA, Taciro C. Análise nanoestrutural da ação do ultra-som terapêutico sobre o processo de regeneração do tendão de ratos adultos. Congresso de Iniciação Científica, 15, 2007, São Carlos. Anais de Eventos da UFSCar 2007; 3: 533.
28. Johns LD. Nonthermal effects of therapeutic ultrasound: the frequency resonance hypothesis. *J Athl Train* 2002;37(3):293-9.
29. Mendonça AC, Ferreira AS, Barbieri CH, Thomazine JA, Mazzer N. Efeitos do ultra-som pulsado de baixa intensidade sobre a cicatrização por segunda intenção de lesões cutâneas totais em ratos. *Acta Ortop Bras* 2006;14(3):152-7.
30. Dalecki D. Mechanical bioeffects of ultrasound. *Annu Rev Biomed Eng* 2004; 6:229-48.
31. Freshney RI. Culture of animal cells. A manual of basic technique. 5a ed. New York (NY): Wiley-Liss; 2005.
32. Campbell P, Prausnitz MR. Future directions for therapeutic ultrasound. *Ultrasound Med Biol* 2007; 33(4):657-658.
33. Vivino AA, Boraker DK, Miller D, Nyborg W. Stable cavitation at low ultrasonic intensities induces cell death and inhibits 3H-TdR incorporation by Con-A-stimulated murine lymphocytes in vitro. *Ultrasound Med Biol*. 1985;11:751-9.
34. Mortimer AJ, Dyson M. The effect of therapeutic ultrasound on calcium uptake in fibroblasts. *Ultrasound Med Biol*. 1988;14:499–506.

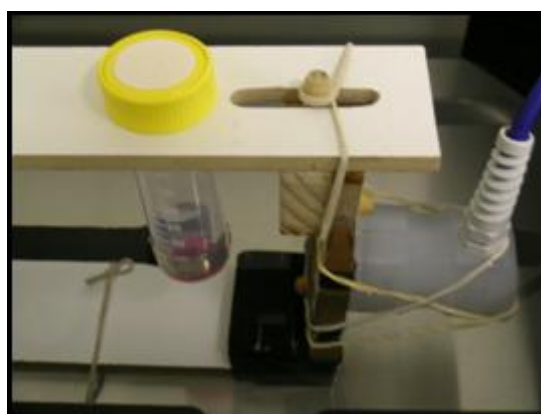
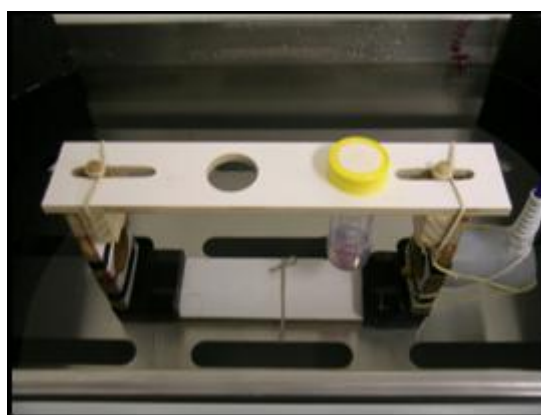
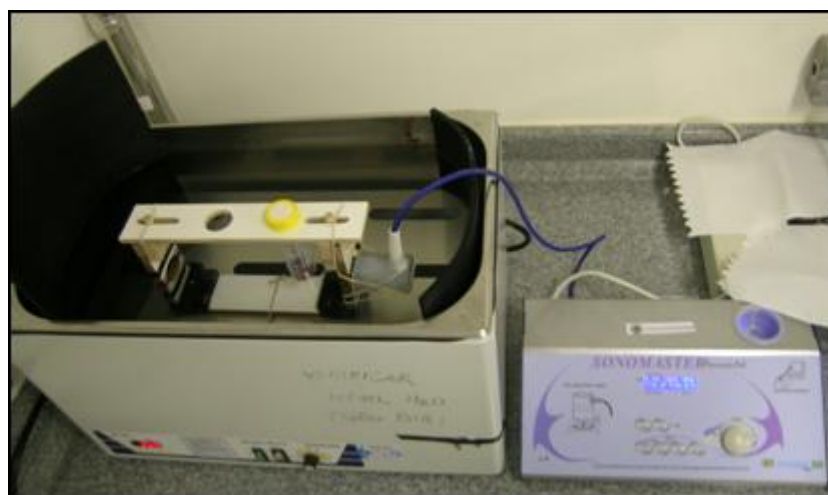
35. Fahnestock M, Rimer VG, Yamawaki PR, Edmonds PD. Effects of ultrasound exposure in vitro on neuroblastoma cell membranes. *Ultrasound Med Biol* 1989;15:133-144.
36. De Deyne PG, Kirsch-Volders M. In vitro effects of therapeutic ultrasound on the nucleus of human fibroblast. *Phys Ther* 1995;75:629-634.
37. Ramirez A, Schwane JA, McFarland C, Starcher B. The effect of ultrasound on collagen synthesis and fibroblast proliferation *in vitro*. *Med Sci Sports Exerc* 1997;29:326-32.
38. Doan N, Reher P, Meghji S, Harris M. In vitro effects of therapeutic ultrasound on cell proliferation, protein synthesis and cytokine production by human fibroblasts, osteoblasts and monocytes. *J Oral Maxillofac Surg* 1999;57:409-19.
39. Johns LD, Colloton PA, Neuenfeldt J. Effects of therapeutic ultrasound on T cell proliferation and IL-2 production. *J Athl Train* 1999;34(suppl):S24.
40. Reher P, Doan N, Bradnock B, Meghji S, Harris M. Effect of ultrasound on the productin of IL-8, basic FGF and VEGF. *Cytokine* 1999;11:416-23.
41. Harle J, Mayia F, Olsen I, Salih V. Effects of ultrasound on transforming growth factor-B genes in bone cells. *Eur Cell Mater* 2005;10:70-7.
42. Maddi A, Hai H, Ong ST, Sharp L, Harris M, Meghji S. Long wave ultrasound may enhance bone regeneration by altering OPG/RANKL ratio in human osteoblast-like cells. *Bone* 2006;39:283-8.
43. Tang CH, Yang RS, Huang TH, Lu DY, Chuang WJ, Huang TF, *et al*. Ultrasound stimulates cyclooxygenase-2 expression and increases bone formation through integrin, focal adhesion kinase, phosphatidylinositol 3-kinase, and akt pathway in osteoblasts. *Mol Pharmacol* 2006;69(6):2047-57.
44. Iwabuchi S, Ito M, Hata J, Chikanishi T, Azuma Y, Haro H. In vitro evaluation of low-intensity pulsed ultrasound in herniated disc resorption. *Biomaterials* 2005;26(34):7104-14.
45. Miyamoto K, An HS, Sah RL, Akeda K, Okuma M, Otten L, *et al*. Exposure to pulsed low intensity ultrasound stimulates extracellular matrix metabolism of bovine intervertebral disc cells cultured in alginate beads. *Spine* 2005;30(21):2398-405.



46. Mukai S, Ito H, Nakagawa Y, Akiyama H, Miyamoto M, Nakamura T. Transforming growth factor B1 mediates the effects of low-intensity pulsed ultrasound in chondrocytes. *Ultrasound Med Biol* 2005;31(12):1713-21.
47. Park K, Hoffmeister B, Han DK, Hasty K. Therapeutic ultrasound effects on interleukin-1B stimulated cartilage construct *in vitro*. *Ultrasound Med Biol* 2007;33(2):286-95.
48. Zhou S, Schmelz A, Seufferlein T, Li Y, Zhao J, Bachem MG. Molecular mechanisms of low intensity pulsed ultrasound in human skin fibroblasts. *J Biol Chem* 2004;279(52):54463-9.
49. Lai J, Pittelkow MR. Physiological effects of ultrasound mist n fibroblast. *Int J Dermatol* 2007;46:587-93.
50. Hill GE, Fenwick S, Matthews BJ, Chivers RA, Southgate J. The effect of low-intensity pulsed ultrasound on repair of epithelial cell monolayers *in vitro*. *Ultrasound Med Biol* 2005;31(12):1701-6.
51. Mizrahi N, Seliktar D, Kimmel E. Ultrasound-induced angiogenic response in endothelial cells. *Ultrasound Med Biol* 2007; 33(11):1818-29.
52. Ikeda K, Takayama T, Suzuki N, Shimada K, Otsuka K, Ito K. Effects of low-intensity pulsed ultrasound on the differentiation of C2C12 cells. *Life Sci*. 2006;79(20):1936-43.
53. Amack JD, Mahadevan MS. The myotonic dystrophy expanded CUG repeat tract is necessary but not sufficient to disrupt C2C12 myoblast differentiation. *Hum Mol Genet* 2001;10(8):1879-87.
54. Yoshiko Y, Hirao K, Maeda N. Differentiation in C2C12 myoblasts depends on the expression of endogenous IGFs and not serum depletion. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002;283(4):C1278-86.
55. Lee MH, Jang MH, Kim EK, Han SW, Cho SY. Nitric Oxide induces apoptosis in mouse C2C12 myoblast cells. *J Pharmacol Sci* 2005;97:369-76.
56. Ferrari RAM. Influência da desintegrina Alternagina-C, isolada do veneno de *Bobothrops Alternatus*, em cultura primária de mioblastos [dissertação]. São Carlos (SP): Univ. Federal de São Carlos; 2007.
57. Järvinen TAH, Järvinen TLN, Kääriäinen M, Kalimo H, Järvinen M. Muscle Injuries: Biology and Treatment. *Am J Sports Med* 2005;33(5):745-64.

## APÊNDICE

Representação fotográfica do aparato para a aplicação do US (Sonomaster Microcontrolled Communicator KW Eletrônica, Amparo, SP/Brasil) terapêutico na cultura celular.



## ANEXO

### Submissão de artigo para publicação à Brazilian Journal of Medical and Biological Research



**Brazilian Journal of Medical and Biological Research**

You are logged in as... **rafauninove**  
[Log Out](#)

[Home](#) > [User](#) > [Author](#) > **Active Submissions**

### Active Submissions

<b>ACTIVE</b>		<b>ARCHIVE</b>		
ID	MM-DD SUBMIT SEC	AUTHORS	TITLE	STATUS
BJMBR 11-18 -179	CB	Ribeiro, Ferrari, Martins, Bussadori,...	<a href="#">EFFECT OF LOW-INTENSITY PULSED ULTRASOUND ON THE...</a>	Awaiting assignment

**Start a New Submission**  
[CLICK HERE](#) to go to step one of the five-step submission process.

Av. Bandeirantes, 3900  
 14049-900 Ribeirão Preto, SP, Brasil  
 Phone and Fax: 55-16-3633-3825  
 Email: [bjournal@fmrp.usp.br](mailto:bjournal@fmrp.usp.br) / [bjournal@terra.com.br](mailto:bjournal@terra.com.br)