

Efeito da terapia ultrassônica de baixa intensidade em cultura celular de fibroblastos

Effect of low-intensity pulsed ultrasound therapy on fibroblasts cell culture

Efecto del ultrasonido de baja intensidad en cultivo celular de fibroblastos

Priscila Daniele de Oliveira¹, Deise A. A. Pires Oliveira², Cintia Cristina Martinago³, Regina Célia Poli Frederico⁴, Cristina Pacheco Soares⁵, Rodrigo Franco de Oliveira⁶

RESUMO | Dentro da prática fisioterápica verifica-se a ampla utilização do ultrassom terapêutico para tratamento das diversas afecções musculoesqueléticas. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da irradiação Ultrassônica de Baixa Intensidade, com diferentes regimes de pulsos e intensidade, em cultura celular de fibroblastos L929 (ATCC CCL-1 NCTC), de modo a verificar a viabilidade celular e definir parâmetros de dosimetria. Para isso, utilizou-se a aplicação de ultrassom pulsado, com frequência de 1MHz, em cultura de células fibroblásticas, divididas em cinco grupos (controle e com intensidade instantâneas de 0,3W/cm²-10%; 0,3W/cm² -20 %; 0,5W/cm² -10% e US 0,5W/cm² -20 % - 100Hz). A irradiação ocorreu com intervalos de 24, 48 e 72 horas, por dois minutos, e após 24 horas de cada irradiação foi realizado teste de MTT Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol)-2,5-difeniltetrazólio]. Os resultados revelaram que ao compararem-se os valores de células viáveis pelo método MTT nos cinco grupos, não foi possível encontrar diferença estatisticamente significativa em nenhum deles, nos três momentos avaliados (24, 48 e 72 horas); enquanto que, ao se realizar a análise de medida repetida nos diferentes grupos, encontrou-se diferença estatisticamente significativa apenas no grupo irradiado com ultrassom a 0,5W/cm² com regime de pulso

de 10% (p=0,003). Com base nesses resultados, conclui-se que a irradiação Ultrassônica de Baixa Intensidade em cultura celular de fibroblastos L929, somente no grupo com intensidade de 0,5W/cm²-10% obteve o crescimento numérico, com significância estatística em todos os períodos de avaliação.

Descritores | Dosimetria; Tecido Conjuntivo; Técnicas de Cultivo de Célula; Terapia por Ultrassom.

ABSTRACT | Within the physiotherapy practice there is a wide use of therapeutic ultrasound for the treatment of various musculoskeletal disorders. The aim of this study was to evaluate the effect of Low Intensity Ultrasonic irradiation with different forms of pulse and intensity in cell culture of L929 fibroblasts (ATCC CCL-1 NCTC), in order to check cell viability and define parameters of dosimetry. For this purpose, it was used the application of pulsed ultrasound with a frequency of 1MHz in cultured fibroblast cells divided into five groups (control and instantaneous intensity of 0.3W/cm² - 10%, 0.3W/cm² - 20%, 0.5W/cm² - 10% and US 0.5W/cm² - 20% - 100Hz). Irradiation occurred at intervals of 24, 48 and 72 hours for two minutes and 24 hours after each irradiation test MTT [3 (4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] was performed. Results

Estudo desenvolvido no Laboratório de Dinâmica de Compartimentos Celulares do Centro de Pesquisa em Ciências da Saúde da Universidade do Norte do Paraná (UNOPAR) - Londrina (PR), Brasil.

¹Fisioterapeuta, doutoranda em Ciências da Reabilitação pela Universidade Estadual de Londrina (UEL)/Universidade do Norte do Paraná (UNOPAR) - Londrina (PR), Brasil.

²Fisioterapeuta, dra. e profa. titular do Programa de Mestrado e Doutorado Ciências da Reabilitação - UEL/UNOPAR - Londrina (PR), Brasil.

³Fisioterapeuta, mestre em Ciências da Reabilitação pela Universidade Estadual de Londrina (UEL)/Universidade do Norte do Paraná (UNOPAR) - Londrina (PR), Brasil.

⁴Bióloga, dra. e profa. titular do Programa de Mestrado e Doutorado Ciências da Reabilitação - UEL/UNOPAR - Londrina (PR), Brasil.

⁵Bióloga, dra. e profa. integral da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP) no Departamento de Biologia Celular e Tecidual, São Jose dos Campos (SP), Brasil.

⁶Fisioterapeuta, dr. e prof. titular do Programa de Mestrado e Doutorado Ciências da Reabilitação - UEL/UNOPAR - Londrina (PR), Brasil.

showed that when comparing the values of viable cells by MTT method in the five groups, we could not find statistically significant difference in any of them, in these three conditions (24, 48 and 72 hours); while. Whereas, when performing the analysis of repeated measures in the different groups, it was found a statistically significant difference only in the group irradiated with ultrasound at 0.5W/cm² with pulse regime of 10% (p = 0.003). Based on these results, it is concluded that the Low Intensity Ultrasonic irradiation in L929 fibroblast cell culture, only in the group with an intensity of 0.5W/cm² -10% obtained numerical growth, with statistical significance in all periods evaluation.

Keywords | Dosimetry; Connective Tissue; Cell Culture Techniques; Ultrasonic Therapy

RESUMEN | En la práctica fisioterápica se utiliza bastante el ultrasonido como terapia para el tratamiento de diversos trastornos musculoesqueléticos. Este artículo tiene por objetivo evaluar el efecto de la irradiación ultrasónica de baja intensidad, con diferentes regímenes de pulsos y de intensidades, en cultivo celular de fibroblastos L929 (ATCC CCL-1 NCTC), para verificar la viabilidad celular y establecer los parámetros de dosimetría. Se

utilizó el ultrasonido pulsado, con frecuencia de 1MHz, en un cultivo de células fibroblásticas, divididas en cinco grupos (con control y con la intensidad instantánea del 0,3W/cm²-10%; 0,3W/cm² -20%; 0,5W/cm² -10% y US 0,5W/cm² -20 % - 100Hz). La irradiación se llevó a cabo en intervalos de 24, 48 y 72 horas, durante dos minutos y después de las 24 horas de cada irradiación se realizó la prueba de MTT {Bromuro de [3-(4,5-dimetiltiazol)-2,5-difeniltetrazólio]}. Los resultados mostraron que en la comparación entre los valores de células viables por el método MTT en los cinco grupos evaluados no ha sido posible encontrar ninguna diferencia estadísticamente significativa en los tres momentos evaluados (24, 48 y 72 horas). En cambio, al llevar a cabo el análisis de medida repetida en los diferentes grupos, se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa solamente en el grupo irradiado con ultrasonido a 0,5W/cm² con el régimen de pulso del 10% (p=0,003). Basándose en estos resultados se concluyó que la irradiación ultrasónica de baja intensidad en cultivo celular de fibroblastos L929 obtuvo el aumento sólo en el grupo con intensidad de 0,5W/cm²-10%, con significancia en todos los periodos de evaluación.

Palabras clave | Dosimetría; Tejido Conectivo; Técnicas de Cultivo de Células; Terapia por Ultrasonido.

INTRODUÇÃO

Dentro da prática fisioterápica, quando observados os recursos utilizados na clínica reabilitativa verifica-se a ampla utilização do ultrassom terapêutico (UST) para tratamento das diversas afecções musculoesqueléticas agudas ou crônicas^{1,2}. Isto decorre principalmente pelo fato de ser um método seguro que evita aos pacientes os riscos de procedimentos invasivos³.

Este método está presente no exercício clínico há mais de seis décadas⁴, em contrapartida, Wardejn e McMeeken⁵ frisam a escassez quanto a evidências científicas sobre seus efeitos terapêuticos e a normatização da aplicação, de maneira que os artigos disponíveis confirmam a contradição acima citada quanto à padronização e ao próprio reparo tecidual, em virtude dos mesmos denotarem escassez na comprovação dos reais efeitos biológicos ou mecanismos de ação, e da falta de determinação concreta nos critérios indicados para esse tipo de tratamento^{4,6,7}.

Assim se dá a importância de constante investigação de seus resultados clínicos, bem como do estudo da relação entre doses e respostas biológicas para um consenso dosimétrico do agente físico em questão^{1,8}. Afinal, como aponta Ishikawa et al.⁹, a correta aplicação do UST é

imprescindível não somente para fundamentar os níveis de exposição que induzem a repercussão biológica significativa, mas também para a proteção dos pacientes.

Dessa perspectiva, constata-se em diversos trabalhos uma gama de efeitos fisiológicos térmicos e não térmicos que o UST induz nos tecidos biológicos por meio da vibração¹⁰.

Dessas acepções, pode-se ressaltar a ativação fibroblástica, o aumento na extensibilidade do colágeno e cicatrização, a diminuição de células inflamatórias (leucócitos e macrófagos) por aceleração do metabolismo celular, síntese proteica, osteogênese, ativação do ciclo de cálcio, angiogênese (com consequente acréscimo na circulação sanguínea e perfusão), a produção do fator de crescimento, redução dos espasmos musculares, rigidez articular e, finalmente, a analgesia¹¹⁻¹⁸.

Nesse contexto, com base nos estudos de Zhou et al.¹⁹, destaca-se que os efeitos do UST quando aplicado *in vitro* denotam íntima ligação com o tipo celular, propiciando síntese de DNA em perióstio, osteoblastos e fibroblastos.

Por fim, com base nas considerações apresentadas por Johns²⁰, ressalta-se a relevância dos estudos em cultura celular quando correlacionados à ação do

ultrassom, uma vez que possibilitam a complementação das investigações *in vivo*, proporcionam controle rígido sobre as inúmeras variáveis e, ainda, potencializam os conhecimentos no tocante ao emprego dessa ferramenta terapêutica.

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da irradiação Ultrassônica de Baixa Intensidade, com diferentes regimes de pulso e intensidade, em cultura celular de fibroblastos L929, de modo a verificar a viabilidade celular e definir parâmetros de dosimetria.

METODOLOGIA

Este estudo caracteriza-se como experimental, e para a sua realização foram utilizadas células de fibroblastos, derivadas de tecido conjuntivo de camundongos, da linhagem L929 (ATCC CCL-1 NCTC) fornecidas pelo Instituto Adolfo Lutz (SP), Brasil. O estudo recebeu aprovação do Comitê de Ética da Universidade Norte do Paraná (UNOPAR), sob o protocolo nº 462.478/2013.

Cultura Celular

As células L929 de fibroblastos foram rotineiramente cultivadas em placas de 25cm² (TPP, Switzerland, Europe) com MEM (Minimum Essential Medium, Gibco® - Invitrogen Corporation, Grad Island, USA) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (Cultilab, Brazil) e 1% de Antibiótico – Antimicótico (Gibco®, by Life Technologies), mantidas em estufas de CO₂, em atmosfera de 5%, a 37°C (Thermo Forma Scientific, Waltham, MA). As células utilizadas neste experimento seguiram as recomendações de utilização para o teste de toxicidade *in vitro* que constam na ISO 10993-5.

Ultrassom

A irradiação ultrassônica foi realizada com um equipamento da marca KLD® – (Biosistemas Equipamentos Eletrônicos Ltda.), modelo Avatar III, com transdutor de 1MHz, BNR (taxa de não uniformidade do feixe) ≤6 e com área de radiação efetiva (ERA) de 1cm², devidamente calibrado pelo fabricante.

Irradiação

Após a cultura apresentar confluência, foi realizada a tripsinização nas placas TPP de 12 poços, com 24mm de

diâmetro e 18mm de profundidade, em uma densidade de 1x10⁶ células/mL. Em seguida, as células ficaram por 24 horas em repouso (*over night*) para a sedimentação. Posteriormente, iniciou-se a intervenção nos intervalos de 24, 48 e 72 horas, respeitando a seguinte separação grupos (Tabela 1).

Tabela 1. Descrição dos grupos experimentos e respectivas dosimetrias

Grupo	Intensidade Instantânea (W/cm ²)	Regime de Pulso (%)	Intensidade Média (W/cm ²)	Ciclo de trabalho	Frequência (Hz)
G1	Grupo controle (não recebeu irradiação)				
G2	0,3	10	0,03	1:9	100
G3	0,3	20	0,06	1:4	100
G4	0,5	10	0,05	1:9	100
G5	0,5	20	0,10	1:4	100

Visando um bom acoplamento da interface do ultrassom (distância da camada de células ao transdutor de 18mm) e propagação da onda mecânica, os volumes dos poços foram completados com meio MEM até a borda, e cada poço foi irradiado e mantido sempre na mesma posição em relação à face do transdutor do ultrassom.

Quanto ao tempo de aplicação, realizou-se a irradiação, por 2 minutos em cada poço, em temperatura ambiente, nos intervalos de 24, 48 e 72 horas, sendo descartado o aquecimento da placa. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e, após cada período, as culturas tiveram a viabilidade celular avaliada pelo teste de citotoxicidade MTT.

Teste de citotoxicidade celular por MTT

Os experimentos de citotoxicidade foram avaliados pelo método de MTT Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol)-2,5-difeniltetrazólio]. As culturas de células L929 receberam irradiação ultrassônica nos intervalos de 24, 48 e 72 horas, sendo que após 24 horas de cada irradiação foi realizado teste de MTT de acordo com ensaio a seguir: depois de retirado o meio MEM, cada poço recebeu 80µL de MTT, uma concentração final de 0,5mg/mL, e foi incubado por 1 hora a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂; em seguida, adicionou-se a cada poço 400µL de Dimetil Sulfoxido (DMSO). As placas foram mantidas em agitação por 30 minutos

para a solubilização dos cristais de formazana. A sua concentração foi quantificada espectroscopicamente por meio de um leitor de microplacas (Leitor ELISA – SpectraCount – Packards Instrument, Offeburg – Alemanha), em comprimento de onda de 570nm.

Análise estatística

Os resultados foram expressos em valores médios e desvio padrão, com avaliação da normalidade verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. Para comparação e verificação de diferenças expressivas entre os grupos, utilizou-se a Análise de Variância (ANOVA) e o teste *post hoc* de Tukey HSD e, entre as avaliações, ANOVA de Medidas Repetidas. Na análise estatística, utilizou-se o programa SPSS versão 20.0, onde o intervalo de confiança foi de 95% e valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

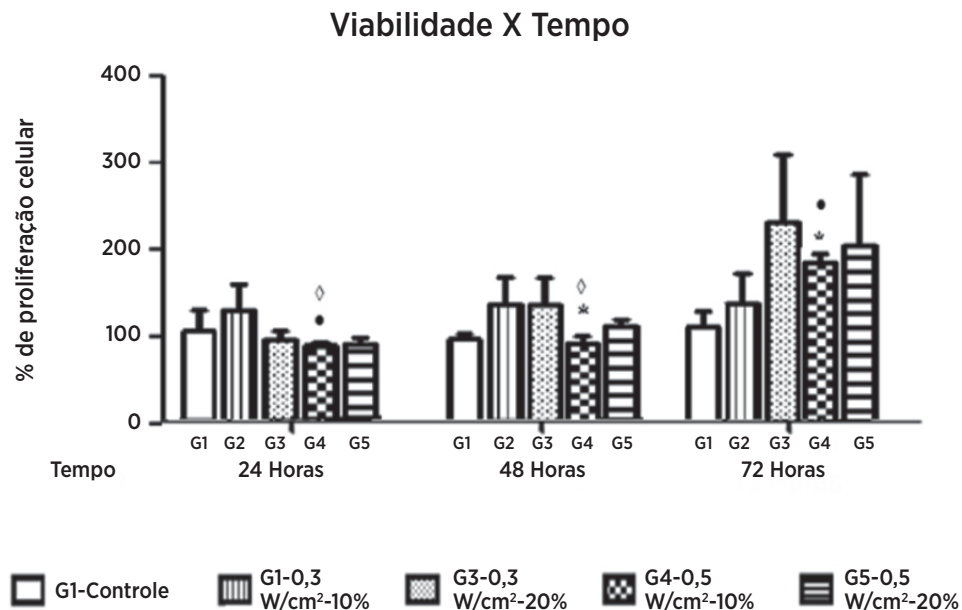
RESULTADOS

Ao comparar os valores de células viáveis pelo método MTT nos grupos (G1=controle, G2=0,3-10%, G3=0,3-20%, G4=0,5-10% e G5=0,5-20%), não foi

encontrada significância estatística entre eles nos três momentos avaliados (24, 48 e 72 horas) (Figura 1).

Ao se realizar a análise de medida repetida nos diferentes grupos, encontrou-se significância estatística apenas no grupo irradiado com ultrassom a $0,5\text{W}/\text{cm}^2$ com regime de pulso de 10% ($p=0,003$). Nesse grupo, ocorreu aumento da viabilidade celular tanto de 24 para 48 horas, como de 48 para 72 horas e de 24 para 72 horas.

Entretanto, apesar do reduzido número de amostras avaliadas, vale destacar determinadas diferenças, em valores absolutos, concernentes à viabilidade celular, especialmente do grupo G3, irradiados com ultrassom pulsado a 20% na intensidade de $0,3\text{W}/\text{cm}^2$, o que pode sugerir que mesmo não tendo sido encontradas diferenças estatisticamente significativas entre todos os grupos experimentais, ocorreu um crescimento considerável no número de células irradiadas. Tal fato possibilita entender que o ultrassom não atuou de maneira deletéria às células, sendo que não houve decréscimos em números em nenhum dos grupos, e que os fibroblastos não permanecem inertes à ação do ultrassom, pois, em todos os grupos houve crescimento no seu valor total (Figura 1).



◊ diferença estatisticamente significativa entre a primeira e segunda avaliação (24/48 horas)

* diferença estatisticamente significativa entre a segunda e a terceira avaliação (48/72 horas)

• diferença estatisticamente significativa entre a primeira e terceira avaliação (24/72 horas)

Figura 1. Comparação da viabilidade celular entre os grupos nos diferentes momentos avaliados. G1 – não irradiado; G2 – recebeu irradiação US $0,3\text{W}/\text{cm}^2$ (10%); G3 – irradiado com US $0,3\text{W}/\text{cm}^2$ (20%); G4 – Grupo irradiado com US $0,5\text{W}/\text{cm}^2$ (10%) e, G5 – US $0,5\text{W}/\text{cm}^2$ (20%)

DISCUSSÃO

Segundo Silva et al.¹⁶, os efeitos terapêuticos do ultrassom não dependem exclusivamente da intensidade, modo de emissão e frequência, mas também encontram-se diretamente sujeitos à duração da intervenção. No presente estudo, o tempo de aplicação terapêutico foi padronizado em dois minutos, com base nas conclusões de Oliveira et al.²¹, que com este mesmo protocolo de aplicação confirmam o aumento na viabilidade celular.

Quanto à utilização do modo de emissão pulsado, corroboram os achados de Cunha et al.²², que em suas considerações denotam que a modalidade em questão mostrou ser mais eficaz que o regime de pulso contínuo. Fato que, dentro do processo de reparação de tendões em ratos, sinalizou otimização na organização e agregação de feixes das fibras de colágeno, visto que o ciclo de trabalho contínuo exibiu desorganização do material, a exemplo de efeito deletério no reparo.

Lirani-Galvão et al.²³ e Hsieh²⁴ reportam que o ultrassom pulsado apresenta comportamento relevante, relacionado aos efeitos terapêuticos, como: aumento da permeabilidade e difusão de membrana e de cálcio intracelular.

Já os benefícios da dose 0,5W/cm² (pulsado a 10 e 20%, 100Hz e intensidade instantânea) encontrados também em nossos resultados, podem estar atrelados à associação dos efeitos atérmicos, os quais seriam responsáveis pela referida estimulação do transporte de substâncias e modificação na permeabilidade da membrana celular²⁵.

Os achados deste experimento também reforçam os estudos de Demir et al.²⁶, onde o ultrassom terapêutico tem evidenciado sua eficácia na estimulação de cultura de fibroblastos com intensidade entre 0,1 e 0,5W/cm², abreviando a fase inflamatória de reparo. De igual forma, Lowe et al.²⁷ e Oliveira et al.²⁸, também confirmaram sua eficácia na fase de reparo, utilizando doses de ultrassom com intensidades de aproximadamente 0,5W/cm² em modo pulsado (10% e 20% – 100Hz) e frequência de 1MHz.

Por outro lado, ao utilizar a intensidade de 0,3W/cm² (pulsado a 10% e 20%, 100Hz, frequência de 1MHz e intensidade instantânea) visando ressaltar a ação não térmica do UST, a dose empregada, pode não ter sido suficiente para ocasionar as implicações biofísicas significativas, pois as mesmas são dependentes da intensidade²⁹.

Ainda, pode-se acrescentar que Lim et al.³⁰, em cultura de odontoblastos humanos, verificaram um

aumento da viabilidade celular quando associada à terapia ultrassônica de baixa intensidade (1MHz, 0,5W/cm², pulsado a 20% e 50%) em 10 minutos de intervenção. Sendo assim, o tempo de aplicação de ultrassom (dois minutos) nos grupos 0,3W/cm² (pulsado a 10% e 20%, com frequência de 1MHz e intensidade instantânea), pode ter sido insuficiente para promover respostas biomodulatórias.

Desse modo, outros estudos nessas linhas temáticas divergem em alguns aspectos dos nossos resultados, e discorrem a respeito da elevação do metabolismo ósseo em ratos (com dose de 0,3W e frequência 1MHz)^{14,17}, ou do aumento da quantidade de fibroblastos e alinhamento colágeno com uso de ultrassom pulsado (20%) a uma intensidade de 0,5W/cm²¹³.

Mas vale ressaltar autores que não obtiveram resultados estimulatórios, como Artifon et al.²⁵, com o grupo de 0,5W/cm² no sóleo de ratos, e Frasson et al.³¹, que também não verificaram aumento de células fibroblásticas e capilares sanguíneos em tenotomias do calcâneo quando aplicado UST pulsado (20% com intensidades de 0,3W/cm² e 1,5W/cm²).

Nesse contexto, a cultura celular também contribui com seus achados ao apontar que os efeitos do ultrassom estão correlacionados aos parâmetros utilizados e ao tipo celular, sendo capaz de assegurar a proliferação de fibroblastos²¹, osteoblastos³² e condrócitos³³.

Corroborando com tais afirmações, demais pesquisas *in vitro* atestam que após diferentes períodos de incubação (24, 48 e 72 horas), a viabilidade celular analisada pelo método MTT demonstrou que não houve diferença significativa¹⁵. Do mesmo modo, Bohari et al.³⁴, apresentaram os mesmos resultados quando em cultura de fibroblastos.

Desta forma, salientamos que em nosso estudo foi possível constatar que assim como Artilheiro et al.¹⁵, ocorreu a ampliação quantitativa de células, conforme esperado. Ainda que, esse aumento não tenha sido significativo em todos os grupos o UST não causou a inibição na viabilidade celular.

Por fim, mediante os aperfeiçoamentos terapêuticos baseados nos desenvolvimentos tecnológicos decorrentes dos últimos tempos, o ultrassom tornou-se um recurso que tem revelado resultados promissores na terapia cicatricial; isso tem relação com o fato de que na fase inflamatória inicial do reparo há o aumento na liberação de fatores de crescimento pela granulação de plaquetas, mastócitos e macrófagos²¹.

Diante disso, a fase de proliferação inicia-se antecipadamente, diminuindo seu intervalo de tempo e atuando na fase de remodelagem. Com isso, a cicatrização, etapa acelerada pela liberação desses fatores de crescimento, pode ser estimulada pelo ultrassom³⁵.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados deste estudo, pode-se concluir que a irradiação Ultrassônica de Baixa Intensidade $0,3W/cm^2$ (10%–20%) e $0,5W/cm^2$ (20%), aumentou percentualmente a viabilidade celular em cultura de fibroblastos L929, enquanto que somente o grupo com terapêutica de $0,5W/cm^2$ (10%) obteve o crescimento numérico com significância estatística em todos os períodos de avaliação (24, 48 e 72 horas).

REFERÊNCIAS

- Robertson VJ, Baker KG. A review of therapeutic ultrasound: effectiveness studies. *Phys Ther*. 2001;81(7):1339-50.
- Lopes LG, Bertolini SMG, Martins EER, Gewehr PM, Lopes MS. Análise morfométrica de tecido muscular de coelhos submetido a ultra-som pulsado e contínuo de 1 MHz I. *Fisioter Pesq*. 2005;12(3):15-21.
- Rutten S, Nolte PA, Guit GL, Bouman DE, Albers GH. Use of low-intensity pulsed ultrasound for posttraumatic nonunions of the tibia. *J Trauma*. 2007;62:902-8.
- Farcic TS, Lima RMB, Machado AFP, Baldan CS, Vilicev CM, Esteves JL, et al. Aplicação do ultrassom terapêutico no reparo tecidual do sistema musculoesquelético. *Arq Bras Cienc Saúde*. 2012;37(3):149-53.
- Warden SJ, Mcmeeken JM. Ultrasound usage and dosage in sports physiotherapy. *Ultrasound Med Biol*. 2002;28(8):1075-80.
- Demir H, Menku P, Kirnap M, Calis M, Ikizceli I. Comparison of the effects of laser, ultrasound, and combined laser ultrasound treatments in experimental tendon healing. *Lasers Surg Med*. 2004;35(1):84-9.
- Lirani-Galvão AP, Jorgetti V, Silva OL. Comparative study of how low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasound affect bone repair in rats. *Photomed Laser Surg*. 2006;24(6):735-40.
- Olsson DC, Martins VMV, Pippi NL, Mazzanti A, Tognoli GK. Ultra-som terapêutico na cicatrização tecidual. *Cienc Rural*. 2008;38(4):1199-207.
- Ishikawa NM, Alvarenga AV, Paes LFC, Pereira WCA, Machado JC. Análise do desempenho de equipamentos de ultra-som para fisioterapia. *Rev Bras Fisioter*. 2002;6(2):63-9.
- Itakura DA, Magas V, Neves EB, Nohama P. Alteração da temperatura nos tecidos biológicos com a aplicação do ultrassom. *Fisioter Mov*. 2012;25(4):857-68.
- Carvalho DCL, Cliquet JRA. A ação do ultra-som terapêutico de baixa intensidade em ossos de ratas osteopênicas. *Acta Ortop Bras*. 2003;11(1):17-24.
- Olsson DC, artins VMV, Martins E, Mazzanti A. Pulsed and continuous ultrasound stimulation in rats healing celiotomy. *Cienc Rural*. 2006;36(3):865-72.
- Yeung CK, Guo X, Ng YF. Pulsed ultrasound treatment accelerates the repair of Achilles tendon rupture in rats. *J Orthop Res*. 2006;24(2):193-20.
- Freeman TA, Patel P, Parvizi J, Antoci Jr V, Shapiro IM. Micro-CT analysis with multiple thresholds allows detection of bone formation and resorption during ultrasound-treated fracture healing. *J Orthop Res*. 2009;27(5):673-9.
- Artilheiro PP, Oliveira EN, Viscardi CP, Martins MD, Busadori SK, Fernandes KPC, et al. Efeitos do ultra-som terapêutico contínuo sobre a proliferação e viabilidade de células musculares C2C12. *Fisioter Pesq*. 2010;17(2):167-72.
- Silva JMN, Carvalho JP, Moura Júnior MJ, Arisawa ELS, Martin AA, Sá HP, et al. Estudo da ação do ultrassom terapêutico em modelo experimental de tendinite em ratos Wistar. *Conscientiae Saúde*. 2010;9(4):625-32.
- Oliveira P, Sperandio E, Fernandes KR, Pastor FAC, Nonaka KO, Renno ACM. Comparison of the effects of low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasound on the process of bone repair in the rat tibia. *Rev Bras Fisioter*. 2011;15(3):200-5.
- Bertolini GRF, Silva TS, Ciena AP, Artifon EL. Comparação do ultrassom pulsado e contínuo no reparo tendíneo de ratos. *Fisioter Pesq*. 2012;19(3):242-7.
- 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.
- Johns LD. Nonthermal effects of therapeutic ultrasound: the frequency resonance hypothesis. *J Athl Train*. 2002;37(3):293-9.
- Oliveira AAP, Oliveira RF, Soares CP. Comparação do efeito da terapia laser de baixa potencia e irradiação ultra-sônica pulsada de baixa intensidade in vitro. *Conscientiae Saúde*. 2008;7(4):457-62.
- Cunha A, Parizotto NA, Vidal BC. The effect of therapeutic ultrasound on repair of the Achilles tendon (Tendo Calcaneus) of the rat. *Ultrasound Med Biol*. 2001;27(12):1691-6.
- Lirani-Galvão APR, Jorgetti V, Silva OL. Comparative study of how low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasound affect bone repair in rats. *Photomed Laser Surg*. 2006;24:735-40.
- Hsieh YL. Effects of ultrasound and diclofenac phonophoresis on inflammatory painrelief: suppression of inducible nitric oxide synthase in arthritic rats. *Phys Ther*. 2006;86(1):39-49.
- Artifon EL, Ferrari D, Cunha DM, Nascimento CM, Ribeiro LFC, Bertolini GRF. Efeitos do ultrassom terapêutico associados ao alongamento estático sobre parâmetros morfométricos longitudinais de sóleo imobilizado de rato. *Rev Bras Med Esporte*. 2012;18(5):341-4.
- Demir H, Yaray S, Kirnap M, Yaray K. Comparison of the effects of laser and ultrasound treatments on experimental wound healing in rats. *J Rehabil Res Dev*. 2004;41(5):721-8.
- Lowe AS, Walker MD, Cowan R, Baxter D. Therapeutic ultrasound and wound closure: lack of healing effect on x-ray irradiated wound in murine skin. *Arch Phys Med Rehabil*. 2001;82(11):1507-11.
- 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.

29. Franco AD, Pereira LE, Groschitz M, Aimbire F, Martins RABL, Carvalho RA. Análise do efeito do ultra-som no edema inflamatório agudo. *Fisioter Mov.* 2005;18(2):19-24.
30. Lim K, Kim J, Seonwoo H, Park S, Choung P, Chung JH. In Vitro effects of low-intensity pulsed ultrasound stimulation on the osteogenic differentiation of human alveolar bone-derived mesenchymal stem cells for tooth tissue engineering. *BioMed Res Int.* 2013;(269724):1-15. Disponível em: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/269724/>
31. Frasson NFV, Taciro C, Parizotto NA. Análise nanoestrutural da ação do ultra-som terapêutico sobre o processo de regeneração do tendão de ratos. *Fisioter Pesq.* 2009;16(3):198-204.
32. Wu S, Kawahara Y, Manabe T, Ogawa K, Sasaki A, Yuge L. Low-intensity pulsed ultrasound accelerates osteoblast differentiation and promotes bone formation in an osteoporosis rat model. *Pathobiology.* 2009;76(3):99-107.
33. Miyamoto K, An HS, Sah RL, Akeda K, Okuma M, Otten L, et al. Exposure to pulsed low-intensity ultrasound stimulates extracellular of bovine intervertebral disc cells cultured in alginate beads. *Spine.* 2005;30(21):2398-405.
34. Bohari SPM, Grover LM, Hukins DWL. Pulsed-low intensity ultrasound enhances extracellular matrix production by fibroblasts encapsulated in alginate. *J Tissue Eng.* 2012;3(1):1-7.
35. Oliveira RF, Oliveira DAAP, Machado AHA, Silva NS, Magini M, Pacheco-Soares C. Assessment of fibroblast cells submitted to ultrasonic irradiation. *Cell Biol Int.* 2008;32(10):1329-35.