ReGeo ISSN: 2177-3246

ESTUDO *IN VITRO* DA INFLUÊNCIA DA VIBRAÇÃO ULTRASSÔNICA EM OSTEOBLASTOS HUMANOS

IN VITRO STUDY OF THE INFLUENCE OF ULTRASONIC VIBRATION ON HUMAN OSTEOBLASTS

ESTUDIO IN VITRO DE LA INFLUENCIA DE LA VIBRACIÓN ULTRASÓNICA EN LOS OSTEOBLASTOS HUMANOS

https://doi.org/10.56238/revgeov17n9-001

Data de submissão: 01/08/2026 **Data de publicação:** 01/09/2026

Jose Ricardo Mariano
Doutorado em Implantes Dentários
Instituição: Instituto J R Mariano
E-mail: mariano.josericardo@gmail.com
Orcid: 000000157433462
Lattes: https://lattes.cnpq.br/6392944312589252

Rafaela Ribeiro Siqueira
Doutora
Instituição: Instituto J R Mariano
E-mail: Raphaela_rs15@hotmail.com
Orcid: 0009000598545619

Paulo Victor do Norte Borges
Mestrando
Instituição: Instituto J R Mariano
E-mail: Nortepaulo9@gmail.com
Orcid: 0009-0008-1822-931X

Eric Silva Durans
Graduando em Odontologia
Instituição: Universidade da Amazônia (UNAMA)
E-mail: ericcdurans@gmai.com
Orcid: 0009-0003-1637-527X

RESUMO

A proposta deste trabalhofoi avaliar avaliar in vitro a influência da força de vibração ultrassônica em cultura de células osteoblásticas humanas. Foi empregado o dispositivo de ultrassom Accele Dent® (Ortho Accel Technologics. Inc. TX, EUA) que utliza a aplicação de forças pulsantes acelerarem a movimentação dentária e a remodelação óssea a uma frequência ligeiramente inferior de 1 a 2 Hz. Para a avaliação da proliferação celular, foi utilizado o método de exclusão vital por azul de Trypan em 24 horas, 48 horas, 72 horas, 7 dias, 10 dias e 14 dias, de ambas culturas celulares plaqueadas sobre as membranas reabsorvíveis. Foram utilizados 20 min de aplicação diária e avaliados seus efeitos após 7, 14 e 21 dias. Como grupo controle um conjunto de células osteoblásticas não serão submetidas a qualquer tratamento. As culturas celulares foram testadas quanto à viabilidade celular utilizando o ensaio MTT, Elisa para a quantificação da PGE2 secretada pelas células osteoblásticas sob estímulo ultrassônico e Western-blotting para avaliação quantitativa da expressão do colágeno tipo I. Os dados coletados quanto à proliferação e viabilidade de células odontoblásticas e às interleucinas IL1 e IL 17

foram submetidos a análises de variância a dois critérios. Para os dados de proliferação de células osteoblásticas, a análise de variância a dois critérios indicou interação significativa entre o fato de ter sido ou não utilizado o ultrassom e o tempo de cultura ($p < 0,001$). O teste de Tukey, aplicado para a realização das comparações múltiplas, indicou que nos tempos 24 e 48 horas não se observou diferença na proliferação celular quando se utilizou ou não o ultrassom, enquanto após 72 horas, proliferação significativamente maior foi constatada com o emprego do ultrassom. Tendo sido ou não utilizado o ultrassom, a proliferação celular no tempo 24 horas foi significativamente menor que nos tempos 48 e 72 horas, cujos valores não diferiram significativamente entre si.

Palavras-chave: Ultrassom Terapêutico. Osteoblastos. Proliferação Celular.

ABSTRACT
The aim of this study was to evaluate in vitro the influence of ultrasonic vibration force on human osteoblastic cell cultures. The Accele Dent® ultrasound device (Ortho Accel Technologics, Inc., TX, USA) was used, which utilizes the application of pulsating forces to accelerate tooth movement and bone remodeling at a slightly lower frequency of 1 to 2 Hz. To assess cell proliferation, the Trypan blue vital exclusion method was used at 24 hours, 48 hours, 72 hours, 7 days, 10 days, and 14 days, on both cell cultures plated on resorbable membranes. 20 minutes of daily application were used, and the effects were evaluated after 7, 14, and 21 days. As a control group, a set of osteoblastic cells will not be subjected to any treatment. Cell cultures were tested for cell viability using the MTT assay, ELISA for quantification of PGE2 secreted by osteoblastic cells under ultrasonic stimulation, and Western blotting for quantitative evaluation of type I collagen expression. Data collected on odontoblastic cell proliferation and viability, and on interleukins IL1 and IL17, were subjected to two-way analysis of variance. For osteoblastic cell proliferation data, the two-way analysis of variance indicated a significant interaction between whether or not ultrasound was used and the culture time ($p < 0.001$). Tukey's test, applied for multiple comparisons, indicated that at 24 and 48 hours no difference in cell proliferation was observed when ultrasound was used or not, while after 72 hours, significantly greater proliferation was observed with the use of ultrasound. Regardless of whether ultrasound was used, cell proliferation at 24 hours was significantly lower than at 48 and 72 hours, although the values did not differ significantly from each other.

Keywords: Therapeutic Ultrasound. Osteoblasts. Cell Proliferation.

RESUMEN
El objetivo de este estudio fue evaluar in vitro la influencia de la fuerza de vibración ultrasónica en cultivos de células osteoblásticas humanas. Se utilizó el dispositivo de ultrasonido Accele Dent® (Ortho Accel Technologics, Inc., TX, EE. UU.), que emplea la aplicación de fuerzas pulsantes para acelerar el movimiento dental y la remodelación ósea a una frecuencia ligeramente inferior de 1 a 2 Hz. Para evaluar la proliferación celular, se utilizó el método de exclusión vital con azul de tripano a las 24 horas, 48 horas, 72 horas, 7 días, 10 días y 14 días, en ambos cultivos celulares sembrados en membranas reabsorbibles. Se aplicaron 20 minutos diarios y los efectos se evaluaron después de 7, 14 y 21 días. Como grupo de control, un conjunto de células osteoblásticas no fue sometido a ningún tratamiento. Se evaluó la viabilidad celular de los cultivos mediante el ensayo MTT, la cuantificación de PGE2 secretada por células osteoblásticas bajo estimulación ultrasónica mediante ELISA y la cuantificación de la expresión de colágeno tipo I mediante Western blot. Los datos sobre la proliferación y viabilidad de las células odontoblásticas, así como sobre las interleucinas IL1 e IL17, se sometieron a un análisis de varianza bidireccional. En el caso de la proliferación de células osteoblásticas, el análisis de varianza bidireccional indicó una interacción significativa entre el uso o no de ultrasonido y el tiempo de cultivo ($p < 0,001$). La prueba de Tukey, aplicada para comparaciones

múltiples, indicó que a las 24 y 48 horas no se observaron diferencias en la proliferación celular con o sin ultrasonido, mientras que a las 72 horas se observó una proliferación significativamente mayor con el uso de ultrasonido. Independientemente del uso de ultrasonido, la proliferación celular a las 24 horas fue significativamente menor que a las 48 y 72 horas, aunque los valores no difirieron significativamente entre sí.

Palabras clave: Ultrasonido Terapéutico. Osteoblastos. Proliferación Celular.

1 INTRODUÇÃO

Em 1880, Pierre e Jaques Currie, fundadores da física moderna, demostraram que se gerava um potencial elétrico quando se comprimia cristais surgindo a piezoeletricidade. Pouco depois em 1881, eles demonstraram a existência do efeito inverso: que os cristais podiam ser deformados quando submetidos a um campo elétrico(PASACHOFF, 1996).

Epker e Frost em1965 sugeriam em sua pesquisa que, induzindo-se pressão, pode-se causar algum efeito na superfície óssea, controlando assim os padrões de comportamento celular no osso. Hoje já se sabe que esse fenômeno mencionado pelos pesquisadores é, de fato, o mesmo efeito piezoelétrico descoberto pelos irmãos Curie.

Jeremy Mao em 2011 apresentou um equipamento com o conceito do uso da força de vibração ultrassônica para acelerar a movimentação de dentes durante o tratamento ortodôntico. O aparelho usa a aplicação de forças pulsantes, para tornar a movimentação dos dentes mais rápida através de remodelação óssea acelerada. Esta ciência também tem sido aplicada em outras partes do corpo, por exemplo, para acelerar a reparação da fratura e da densidade óssea nos ossos longos.

O aparelho idealizado por Mao, é um dispositivo removível semelhante a uma moldeira odontológica com um pequeno do motor que é mantido por bateria recarregável através de uma estação de encaixe. A premissa é simples, em vez de utilizar apenas constante pressão, o dispositivo aplica vibrações muito leves na dentição diariamente por 20 minutos de pulsação suave através de um encaixe de silicone que fica acoplado aos dentes como uma placa de proteção dentes unida uma pequena haste. Os usuários podem realizar a maioria da rotina e tarefas diárias durante o período de ativação.

Os trabalhos publicados relacionados ao dispositivo Accele Dent® são de relatos de casos clínicos, porém existe um material científico vasto e com bons resultados a respeito do uso de vibração ultrassônica nas áreas de fisioterapia e ortopedia.

Reher et al. (1997) realizaram um estudo controlado para avaliar os efeitos de um outro tipo de aparelho de ultrassom (SATA®, EUA) em diferentes intensidades durante 5 dias em calvárias de ratos e cultura de tecidos afim de serem analisados os seguintes parâmetros: síntese de colágeno e de proteínas não colagenosas (NCP), bem como, as alterações de temperatura associadas a aplicação deste aparelho. Verificou-se que quando o ultrassom foi utilizado na potência de 0,1 W/cm^2, pulsado, na frequência de 1:4,3 MHz durante 5 min, significativamente estimulou a formação óssea, representado pelo aumento da síntese de colágeno e das NCP. No entanto, ultrassom pulsado com doses mais elevadas (1,0-2,0 W/cm^2, 1:4,3 MHz, 5 min) inibiu significativamente a síntese destas proteínas. A medida de temperatura foi alterada no máximo com aumento de 1,8°C para a potência de

2,0 W/cm^2 e nenhum efeito detectado em 0,1W/cm^2, sugerindo que os efeitos deste estudo foram principalmente não térmicos. Tais resultados podem direcionar o conhecimento sobre o efeito do ultrassom de baixa intensidade nas terapêuticas ortopédicas.

Mukai et al. (2005) utilizaram outro aparelho de ultrassom de baixa intensidade (LIPUS®) para acelerar a cicatrização de fraturas. Foi utilizado um sistema de cultura de condrócitos para analisar a ação do aparelho. A análise de Northern revelou que o aparelho mantinha níveis mais elevados de expressão de colágeno tipo II, bem como a atividade da fosfatase alcalina. Além disso, os níveis de expressão do TGF-β manteve-se elevado durante toda a fase de aplicação do ultrassom.

Os efeitos do aparelho de ultrassom pulsado de baixa intensidade tem também sido relatados para aumentar a proliferação e atividade de síntese proteica de outros vários tipos celulares (Ren et al., 2010). Neste estudo foram medidos o comprimento neurites após tratamento com o mesmo equipamento utilizado por Mukai *et al* para definir o eficácia da estimulação do mesmo sobre os neurônios e, em seguida, examinou-se a atividade do GSK-3β para estudar o mecanismo intracelular de proliferação celular. O LIPUS foi aplicado em culturas de neurônios provenientes de corticais primárias de rato durante 5 minutos, todos os dias com intensidades médias de 10 mW/cm^2, largura de pulso de 200 microssegundos, taxa de repetição de 1,5 kHz, e uma frequência de funcionamento de 1 MHz. Os neurônios foram avaliados após 3, 7, 10 dias de tratamentos e, a cada momento feito a análise semi-quantitativa rtPCR. Os resultados mostraram mudança na morfologia da extensão de neuritos quando utilizado o ultrassom pulsado, houve também uma redução notável de proteínas incluindo p-Akt, p-GSK-3β, e p-CRMP-2, observadas nos 7 e 10 dias e de GSK-3β, principalmente no sétimo dia. Os autores concluíram que o dispositivo de ultrasom utilizado pode diminuir as neurites sendo, portanto, possível a sua utilização para controle das mesmas.

Al-Daghreer et al. (2012) investigaram o efeito do do mesmo ultrassom pulsado de baixa intensidade terapêutica utilizado por Ren et al em 2010, em complexos dentina-polpa humanos num modelo *in vitro*. O LIPUS foi aplicado utilizando um transdutor de 3,9 cm^2, que produz um incidente de intensidade de 30 mW/cm^2. Depois de 5 dias, o tecido foi coletado para análise histomorfométrica e investigação da expressão de genes de interesse (Colágeno I, DMP1, DSPP, TGF-β1, RANKL e OPG) através de PCR em tempo real. As análises histomorfométricas mostraram que a contagem de células odontoblásticas foi maior nos grupos de aplicação (5, 10 e 15 min, respectivamente) do que no grupo controle. A espessura da pré-dentina foi maior no grupo de aplicação única (10, 5 e 15 min), respectivamente, do que no grupo de aplicação diária e os grupos de controle, no entanto, eles não foram significativamente diferentes um do outro. PCR em tempo real demonstrou não haver diferença estatisticamente significativa entre os grupos na expressão de colágeno I, DMP1, TGF- β1, DSPP,

RANKL e OPG. Os autores deste trabalho concluíram que a resposta reacional do complexo dentina-polpa foi maior quando utilizado a aplicação única de LIPUS nos tempos de 5, 10 e 15 minutos.

O mecanismo da osteogênese induzida mecanicamente não é totalmente compreendido, de acordo com Gusmão et al. (2012). Em resposta ao estímulo mecânico, há indução da síntese de PGE-2 culminando no influxo de cálcio para o espaço intra-celular. Esta citocina pró-inflamatória é responsável por 50-90% do mecanismo indutor da osteogênese, sendo portanto, a prostaglandina mais importante no mecanismo mecanotransdutor, estando tanto relacionada ao processo da neo-formação quanto reabsorção óssea. Esta associação tem sido relacionada principalmente ao papel do cálcio, uma vez que a sua concentração intracelular, quando aumentada pelo estímulo mecânico, determina a síntese de PGE-2 (Cherian et al., 2005; Genetos et al., 2005; Li et al., 2005; Xu et al., 2007).

O ligamento periodontal é uma estrutura que dá sustentação a cada elemento dental, conectando-os ao osso alveolar. Ele é constituído por uma rede de fibras colágenas dispostas de forma paralela e que se inserem no cemento radicular e na lamina dura (Proffit, Fields Junior e Sarver, 2007). Essa estrutura de ligamentos permite a normal movimentação de cada elemento dental.

Além dos feixes de colágeno foi possível encontrar no ligamento periodontal vasos sanguíneos, terminações nervosas, responsáveis pela sensação dolorosa, células mesenquimais indiferenciadas, fibroblastos e osteoblastos (PROFFIT; FIELDS JUNIOR; SARVER, 2007). Amadei et. al. (2006) explica os fatores que influenciam a fisiologia da remodelação óssea e movimentações de dentes ortodonticamente. Enquanto houve a transformação dos osteoclastos multinucleados, a partir das células precursoras de osteoclastos, ocorre a secreção de enzimas proteolíticas na camada osteóide não-mineralizada pelos osteoblastos de revestimento. Os principais fatores responsáveis pela gênese de osteoclastos são osteoprotegerina (OPG), receptor ativador de fator de necrose tumoral (NF-kB [RANK]), e a citocina ligante RANK (RANKL), tendo como principal papel a inibição da apoptose destas células. Através das integrinas, proteínas presentes na membrana celular, há o reconhecimento das proteínas da matriz óssea extracelular formando adesões focais, onde serão criadas as lacunas de reabsorção. Há então a estimulação dos osteoclastos por calcitrol, paratormônio(PTH), fator de necrose tumoral (TNF), prostaglandina E2, além das interleucinas 1, 11 e 6. A sua inibição ocorre por interleucina 4 e 13 e o que acarreta essa fase pode ser um elevado nível de cálcio local ou substâncias liberadas pela própria matriz.

AMADEI et al afirmam que os osteoblatos são células que sintetizam a parte orgânica da matriz óssea. Estes se proliferam mediados por fatores de crescimento como: TGF-beta, IGF-I e II, o fator de crescimento fibroblástico (FGF) e o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF). Esses fatores podem não só auxiliar na formação óssea, mas também impedir a apoptose osteoblástica. A

partir destes estímulos as céluas secretam fosfatase alcalina, ácido hialurônico, sulfato de condroitina, osteopontina, osteonectina, sialoprote'na óssea, pró-colagenase, ativador de plasminogênio e proteína morfogenética do osso(BMP), entre outras.

Segundo Moyers (1991) as células odontoblásticas e osteoclásticas são responsáveis pela remodelação da matriz óssea e colágena, remodelando assim o alvéolo ósseo e o cemento radicular, diante das forças naturais. Estas forças são o resultado das forças transmitidas através da oclusão dos dentes, deglutição, fala, mastigação e respiração, estas originadas pelos músculos. Há também forças provenientes do interior dos dentes, como a erupção. Já as forças anormais são constituídas por interposição lingual, sucção digital, disfunção oclusal traumática, bruxismo e forças induzidas com fins terapêuticos.

Heller e Nanda(1979) avaliaram os efeitos da alteração metabólica das fibras periodontais no movimento ortodôntico em ratos. Os resultados sugeriam que a resposta biológica típica à aplicação de força ortodôntica pode ocorrer na presença de um periodonto alterado química e fisicamente. Os dados coletados quantitativamente inferiram que a tensão das fibras nos alvéolos pode não se absolutamente necessária para estimular uma formação óssea. A distorção dos alvéolos relacionada à força aplicada pode ser um fator importante, iniciando a resposta óssea. Entretanto, as fibras do ligamento periodontal poder ter um papel passivo, através da transferência da força ortodôntica para os alvéolos.

Espindula(2014) fez uma revisão de literatura utilizando trabalhos nas bases de dados Scielo, LILACS,MEDLINE e Bireme, publicados no período de 1965 a 2014, onde foram ´pesquisados 29 artigos, nacionais e internacionais, 3 livros técnicos de ortodontia e 1 de fisioterapia e 4 dissertações de mestrado, constatando que a literatura reconhece que o tratamento ortodôntico traz algumas limitações como o tempo necessário para a sua conclusão, o desconforto do paciente e a reabsorção radicular. As eletroterapias e o ultrassom mostram na literatura que tem grande influencia no metabolismo ósseo e já são utilizados na área da fisioterapia com excelência nos resultados . Concluindo que os autores obtiveram bons resultados na movimentação ortodôntica e na recuperacao de dentes que sofreram reabsorção radicular.

2 PROPOSIÇÃO

Este estudo se propôs avaliar avaliar *in vitro* a influência da força de vibração ultrassônica em cultura de células osteoblásticas humanas.

ISSN: 2177-3246

3 MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada na Faculdade de Odontologia e Centro de Pesquisas São Leopoldo Mandic, campus Campinas, no laboratório de Biologia Celular e Molecular, sob a coordenação da Profa. Dra. Elizabeth Ferreira Martinez e com o auxílio técnico da bióloga, Pollyanna Tombini Montaldi (Anexo A).

3.1 ULTRASSOM

Foi empregado o dispositivo de ultrassom Accele Dent® (Ortho Accel Technologics. Inc. TX, EUA) que utliza a aplicação de forças pulsantes acelerarem a movimentação dentária e a remodelação óssea. O aparelho é semelhante a um retentor com um pequeno motor no cabo de uma moldeira odontológica simples utilizada em consultório e ocorre a uma frequência ligeiramente inferior de 1 a 2 Hz.

Figura 1



Fonte: Autores.

Foram utilizados 20 min de aplicação diária, conforme trabalho Mukai et al. (2005) e avaliados seus efeitos após 7, 14 e 21 dias. Como grupo controle um conjunto de células osteoblásticas não serão submetidas a qualquer tratamento.

3.2 CULTURA CELULAR

A linhagem de células de osteoblastos humanos (MC3T3E1) foi obtida do ATCC (American Type Culture Collection, ATCC).

As células pré-osteoblásticas foram cultivadas em meio Essencial Mínimo, modificação alfa (α-MEM) suplementados com 10% de soro fetal Bovino (Cultilab®, Campinas, SP, Brasil) e 1% de solução antibiótica-antimicótica (Sigma, St. Louis, Missouri, EUA).

Todos os procedimentos foram realizados em capela de fluxo laminar para manutenção da esterilidade dos materiais e das substâncias utilizadas para o cultivo celular.

As células foram mantidas em estufa a 37ºC, em atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% de dióxido de carbono. O meio de cultura foi trocado a cada 2-3 dias e a progressão da cultura, sendo avaliada por microscopia de fase em culturas crescidas sobre poliestireno (plástico), que serviu como controle.

As células foram utilizadas nos experimentos seguintes para o estudo da viabilidade e proliferação celulares.

3.3 PROLIFERAÇÃO CELULAR

Para a avaliação da proliferação celular, foi utilizado o método de exclusão vital por azul de Trypan em 24 horas, 48 horas, 72 horas, 7 dias, 10 dias e 14 dias, de ambas culturas celulares plaqueadas sobre as membranas reabsorvíveis.

Para tal, após atingirem a subconfluência, as células foram enzimaticamente removidas das placas e, o precipitado de células resultante da centrifugação foi suspenso em 1 mL de meio. Foram retirados 10 µL da suspensão de células e a ela juntou-se 10 µL de azul de Trypan, sendo que 1 µL desta solução foi colocada em um hemocitômetro (câmara de Neubauer-Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, EUA) e levado ao microscópio invertido de fase (Nikon, Eclipse TS100) para a contagem e observação das células.

O número total de células presentes em cada poço em diferentes tempos de análise foi obtido através da seguinte equação matemática:

$$\text{Nº total de células} = \frac{\text{Nº de células contadas X Vol. inicial X Diluição X } 10^4}{\text{Nº de quadrados usados para contagem}} \quad (1)$$

3.4 AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE (MTT)

As culturas celulares foram testadas quanto à viabilidade celular utilizando o ensaio MTT.

Este ensaio avalia a capacidade de células metabolicamente ativas de reduzirem o MTT, convertendo os sais amarelos de tetrazolium (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazol brometo) a cristais de formazan, de cor púrpura e, portanto, na capacidade que têm as células viáveis de clivar o anel tetrazólico presente no MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazol brometo) pela ação de enzimas desidrogenases presentes na mitocôndria ativa, formando cristais de formazana.

Após a solubilização dos cristais, a quantificação foi realizada em leitor de microplacas ELX800 (Biotek Instruments, Inc.) a 680 nm. No ensaio de citotoxicidade foram utilizadas $2x10^4$ células/poço, em placa de 96 wells, incubadas com as substâncias por 20 horas, a 37 ºC. Imediatamente após, 10 µl da solução de MTT (5 mg/mL – SIGMA) diluídos em meio de cultura DMEM sem soro, foram acrescentados às culturas tratadas, e estas incubadas por um período de 4 horas, a 37 ºC. Após o período total de incubação (24 horas) foram adicionados 100 µl de solução 10% de dodecil sulfato de sódio (SDS) e ácido clorídrico 0,01 N, e o experimento mantido *overnight*, a 37 ºC.

A densidade óptica de cada poço foi obtida a 570 nm, possibilitando determinação do potencial citotóxico de cada substância testada em relação ao controle não tratado.

3.5 ELISA

A quantificação da PGE2 secretada pelas células osteoblásticas sob estímulo ultrassônico foi avaliada por Elisa. Pra tal, o sobrenadante foi aspirado e centrifugado a 5000g por 15 min numa temperatura de 4ºC. Alíquotas de cada amostra foram avaliadas por imunoensaios enzimáticos (ELISA) para determinar os níveis de PGE-2 de acordo com as recomendações do fabricante (eBioscence San Diego, CA, USA). Após isto, 100 µl do anticorpo de detecção foi adicionado a todos wells, exceto no blank, e incubado overnight (18h) numa temperatura de 4ºC. As placas foram lavadas com solução tampão, para posterior adição do anticorpo padrão e amostras. Após o tempo de incubação, as placas foram lavadas novamente e incubadas com 200 µl com o anticorpo conjugado por 30 min em temperatura ambiente e protegidas do escuro. A reação foi encerrada pela adição de 50 µl de solução de ácido sulfúrico, e a cor foi medida em espectrofotômetro (Epoch, Biotek, Winooski, VT, USA) em comprimento de onda de 570nm. A quantidade total de metaloproteinases e seus inibidores foram determinados como picogramas (pg/ml). Os resultados foram calculados utilizando a curva padrão criada em cada ensaio.

Todos os experimentos foram realizados em duplicatas para cada triplicata biológica.

3.6 WESTERN-BLOTTING

Para avaliação quantitativa da expressão do colágeno tipo I nos osteoblastos humanos com a utilização do aparelho ultrassônico, as alíquotas do lisado foram misturadas contendo 20µg de proteína total, com tampão de amostra para concentração final de 1X. Em seguida, as amostras foram fervidas por 5 min e então submetidas à SDS-PAGE, sendo feita eletroforese a 100V por 180 minutos, em gel de acrilamida a 10%. O padrão de peso molecular utilizado foi o Kaleidoscope Prestained Standards (BioRad).

Quadro 1 – Gel 10% acrilamida com SDS (10X16 cm)

	Gel de Separação	**Gel de empilhamento**
	10% (total 40 ml)	5% (total 10ml)
H_2O	15,9	6,80
Acrilamida/bisacrilamida 30:1	13,3	1,70
Tampão de separação	10,0	-
Tampão de empilhamento (4X conc.)	-	1,25
10% SDS	0,4	0,10
10% persulfato de amônio	0,4	0,10
Temed	0,016	0,01

Fonte: Autores.

A transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose foi feita por eletro-transferência semi-seca, com o tampão de transferência (48mM Tris-Base; 39mM Glicina, 20% Metanol; pH 8,3) utilizado como recomendado pelo fabricante. A transferência foi feita com 30V por 180min. Após a transferência, a membrana foi submetida à fase de bloqueio ou lavada e seca para posterior reação.

Para a imunorreação, foi feito bloqueio dos sítios inespecíficos com 5% de leite em pó desnatado em TBST, por 1-2h em temperatura ambiente, sob agitação. Em seguida, a solução de bloqueio foi removida lavando-se a membrana com TBST. O anticorpo colágeno tipo I foi diluído em solução de bloqueio e aplicado de acordo com o tempo recomendado pelo fabricante e mantido à temperatura ambiente sob agitação. Seguirão três lavagens para remoção do anticorpo não absorvido com TBST sob agitação e à temperatura ambiente. O anticorpo secundário foi então aplicado por 1 hora, diluído em solução de bloqueio e depois lavado em TBST 2X por cinco minutos cada.

A detecção foi feita por quimiluminescência (kit ECL).

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados coletados quanto à proliferação e viabilidade de células odontoblásticas e às interleucinas IL1 e IL 17 foram submetidos a análises de variância a dois critérios e a testes de Tukey. Para os cálculos estatísticos foi utilizado o programa SPSS 20 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA), tendo sido adotado o nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$).

4 RESULTADOS

Para os dados de proliferação de células osteoblásticas, a análise de variância a dois critérios indicou interação significativa entre o fato de ter sido ou não utilizado o ultrassom e o tempo de cultura ($p < 0,001$). O teste de Tukey, aplicado para a realização das comparações múltiplas, indicou que nos tempos 24 e 48 horas não se observou diferença na proliferação celular quando se utilizou ou não o ultrassom, enquanto após 72 horas, proliferação significativamente maior foi constatada com o emprego do ultrassom. Tendo sido ou não utilizado o ultrassom, a proliferação celular no tempo 24

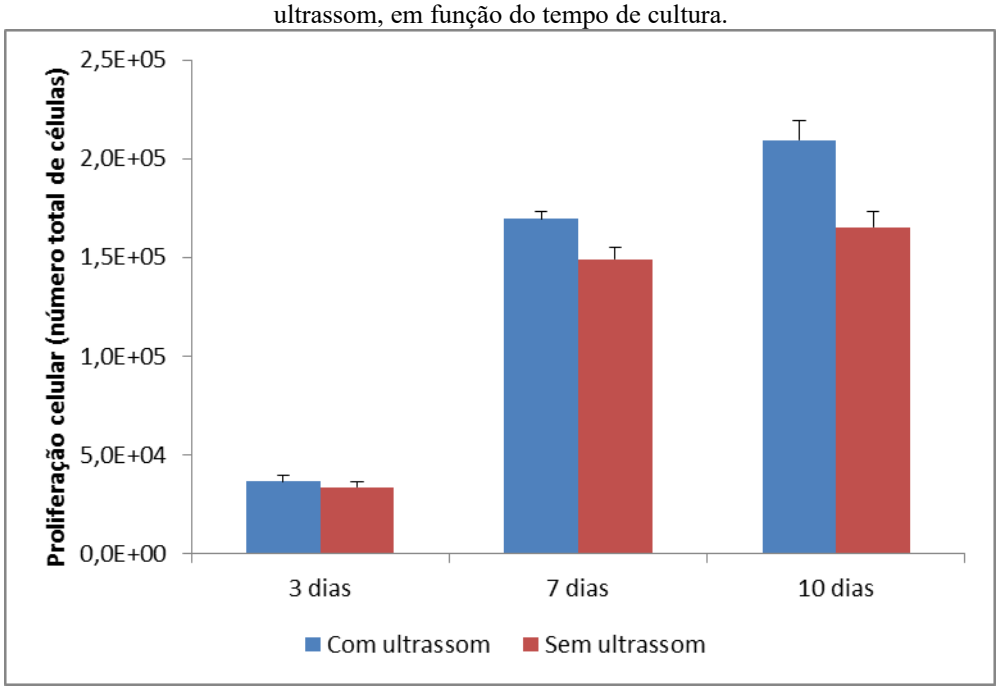
horas foi significativamente menor que nos tempos 48 e 72 horas, cujos valores não diferiram significativamente entre si (tabela 1 e gráfico 1).

Tabela 1 – Médias e desvios padrão da proliferação e viabilidade de células osteoblásticas e de interleucinas IL 1 e IL 17 quando da utilização ou não do ultrassom, em função do tempo de cultura.

Condição		Tempo			Média geral
		24 horas	48 horas	72 horas	
Proliferação celular	Com ultrassom	3,64E+4 **Aa** (3,46E+3)	1,70E+5 **Ab** (3,57E+3)	2,09E+5 **Bb** (1,03E+4)	—
	Sem utrassom	3,37E+4 **Aa** (2,63E+3)	1,49E+5 **Ab** (5,84E+3)	1,65E+5 **Ab** (7,87E+3)	—
Viabilidade celular	Com ultrassom	0,67 (0,06)	1,67 (0,12)	2,46 (0,11)	1,60 **A** (0,76)
	Sem utrassom	0,64 (0,07)	1,81 (0,14)	2,38 (0,23)	1,61 **A** (0,76)
	Média geral	0,65 **a** (0,06)	1,74 **b** (0,14)	2,42 **c** (0,18)	—
IL 1	Com ultrassom	75,66 (9,60)	77,21 (6,26)	80,30 (8,51)	66,99 **B** (28,20)
	Sem utrassom	54,13 (5,82)	44,39 (1,42)	46,39 (8,00)	48,30 **A** (6,82)
	Média geral	64,89 **a** (13,65)	60,80 **a** (18,04)	51,19 **a** (30,95)	—
IL 17	Com ultrassom	49,19 **Aa** (4,07)	77,68 **Bb** (3,82)	79,21 **Bb** (10,14)	—
	Sem utrassom	49,45 **Aa** (7,44)	32,57 **Aa** (7,31)	47,01 **Aa** (6,37)	—

Legenda: Proliferação e viabilidade celulares avaliadas por meio de densidade óptica e do número total de células, respectivamente. IL 1 e IL 17 quantificados em pg/mL. Desvios padrão entre parênteses. Médias seguidas por letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre as condições com e sem utrassom, considerando-se individualmente cada tempo de cultura, para os dados de proliferação e IL 17. Médias seguidas por letras minúsculas distintas indicam diferença significativa entre tempo de cultura, considerando-se individualmente o uso ou não do ultrassom, para os dados de proliferação e IL 17. Médias gerais seguidas por letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre os grupos com e sem ultrassom, em qualquer dos tempos de cultura, considerando-se os dados de viabilidade e de IL 1. Médias gerais seguidas por letras minúsculas distintas indicam diferença significativa entre os tempos de cultura, para os grupos submetidos ou não ao ultrassom, considerando-se os dados de viabilidade e de IL 1.
Fonte: Autores.

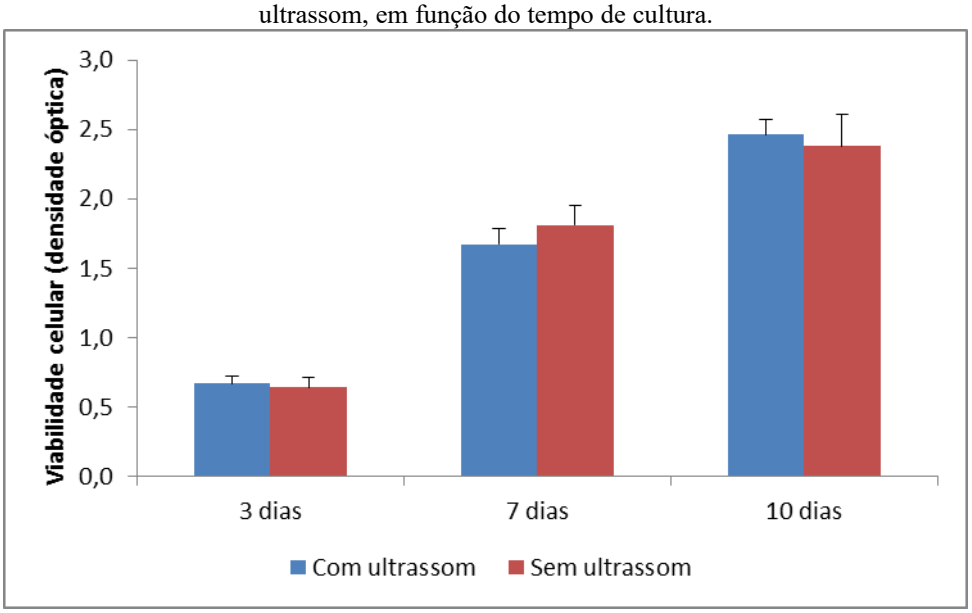
Gráfico 1 – Diagrama de colunas dos valores médios da proliferação de células osteoblásticas após a utilização ou não de ultrassom, em função do tempo de cultura.



Legenda: Linhas verticais sobre as colunas indicam desvios padrão.
Fonte: Autores.

Quanto à viabilidade celular, a análise de variância a dois critérios demonstrou a inexistência de interação significativa entre o fato de ter sido ou não utilizado o ultrassom e o tempo de cultura ($p = 0,106$). Também foi verificado que a viabilidade das células osteoblásticas não foi significativamente afetada pela utilização do ultrassom ($p= 0,844$), constatação feita em todos os tempos de cultura. A viabilidade celular, seja quando se empregou ou não o ultrassom, foi influenciada pelo tempo de cultura ($p < 0,001$). Pelo teste de Tukey verificou-se que um número progressiva e significativamente maior de células osteoblásticas encontrou-se viável do tempo 24 a 72 horas (tabela 1 e gráfico 2).

Gráfico 2 – Diagrama de colunas dos valores médios da viabilidade de células osteoblásticas após a utilização ou não de ultrassom, em função do tempo de cultura.



Legenda: Linhas verticais sobre as colunas indicam desvios padrão.
Fonte: Autores.

Para maior entendimento das abordagens estatísticas aplicadas aos dados seguem alguns esclarecimentos:

- análise de variância a dois critérios: nome do teste estatístico aplicado aos dados para responder se a utilização ou não do ultrassom e os tempos de cultura influenciaram a proliferação e viabilidade de células osteoblásticas, bem como a concentração de IL 1 e IL 17. Portanto, foram aplicadas quatro análise de variância a dois critérios. A identificação "dois critérios" indica que o trabalho teve duas variáveis (*uso ou não de ultrassom* e *tempo de cultura*). Como há possibilidade que, por exemplo, a proliferação celular seja maior ao se utilizar o ultrassom, mas que esse efeito dependa do tempo de cultura, testa-se o efeito combinado das duas variáveis estudadas (*uso ou não de ultrassom* e *tempo de cultura*). Esse mesmo raciocínio se aplica aos dados de viabilidade, IL 1 e IL 17. Ao efeito combinado indicado acima denomina-se interação, que foi significativa para os dados de proliferação e de IL 17, já que os valores de p relativos às interações foram menores que 0,05. Havendo interação significativa, prossegue-se com a análise aplicando-se testes de Tukey (explicado mais adiante). Para os dados de viabilidade e IL 1, não houve interação significativa, uma vez que o valor de p foi maior que 0,05. Tendo em vista a inexistência de interação, então, investigam-se os denominados efeitos dos fatores principais;
- efeitos dos fatores principais: como no caso dos dados de viabilidade e IL 1 não houve interação, depreende-se que: 1) se a utilização ou não do ultrassom afetou a viabilidade e a IL

1, esses efeitos ocorreram em todos os tempos de cultura avaliados e que: 2) se o tempo de cultura influenciou na viabilidade e IL 1, este efeito ocorreu tanto quando se utilizou ou não o ultrassom. Essas duas opções referem-se ao efeito dos fatores principais, ou seja, ao efeito da utilização ou não do ultrassom (independentemente do tempo de cultura) e do tempo de cultura (independentemente da utilização ou não do ultrassom) e deve ser obrigatoriamente checada quando não há interação significativa. Nas abordagens dos efeitos principais compara-se: 1) o efeito da utilização ou não do ultrassom desconsiderando-se o tempo de cultura, pois já se viu pela interação não significativa que se o tempo modificou a viabilidade e a IL 1, isto vale para os três tempos de cultura e 2) o efeito do tempo de cultura desconsiderando-se a utilização ou não do ultrassom, pois já se viu pela interação não significativa que se utilização ou não do ultrassom modificou a viabilidade e a IL 1 nos diferentes tempos de cultura, isto valeu nas condições em que se utilizou ou não o ultrassom. Os resultados das comparações, que foram feitas por testes de Tukey, aparecem sob a forma de MÉDIAS GERAIS na tabela 1. Como as interações para os dados de viabilidade e IL 1 não foram significativas, são essas médias gerais que devem ser comparadas entre si, como indicam as letras ao lado das médias gerais;

- teste de Tukey: tendo sido verificado efeito significativo da interação ou do(s) fator(es) principal(is) *Utilização ou não do ultrassom* e/ou *Tempo de cultura* pelas análises de variância a dois critérios, prossegue-se com a interpretação dos dados aplicando-se testes de Tukey, que permitem as comparações múltiplas entre: 1) usar ou não o ultrassom e 2) tempos de cultura. Como descrito anteriormente, os resultados desses testes aparecem sob a forma de letras maiúsculas e minúsculas ao lado das médias, tanto gerais (quando não há interação) quanto das médias de cada grupo (quando há interação).

5 LOCAL DA PESQUISA

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Cultura de Células da Faculdade de Odontologia e Centro de Pesquisas São Leopoldo Mandic, situada à Rua José Rocha Junqueira, 13 Jd. Swift em Campinas – SP / CEP: 13045-755.

6 RECURSOS

O presente trabalho foi totalmente financiado pelo pesquisador.

7 COMPROMISSO DE TORNAR PÚBLICO O RESULTADO

O resultado do presente trabalho será dado ao conhecimento público pelos meios científicos conhecidos.

REFERÊNCIAS

AL-DAGHREER, S.; et al. Long term effect of low intensity pulsed ultrasound on a human tooth slice organ culture. Arch. Oral. Biol., v. 57, n. 6, p. 760-8, 2012.

AMADEI, S.U.; et al. A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea. Bras. Patol. Med. Lab., v. 42, n. 1, p. 5-12, 2006.

ANDRADE JUNIOR, I.; TADDEI, S.R.A.; SOUZA, P.E. A. Inflammation and Tooth Movement: The Role of Cytokines, Chemokines, and Growth Factors. Sem. Orthod., v. 18, n. 4, p. 257-69, 2012.

ANGLE, S.R.; et al. Osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells by various intensities of low-intensity pulsed
ultrasound. Ultrasonics., v. 51, n, 3, p. 281-8, 2011.

APPLEFORD, M.R.; et al. Ultrasound effect on osteoblast precursor cells in trabecular calcium phosphate scaffolds. Biomaterials., v. 28, n. 32, p. 4788-94, 2007.

BANDEIRA, F.; et al. Osteoporose. Rio de Janeiro: Medsi, 2000.

BAŞARAN, G.; et al. Interleukine-1beta and tumor necrosis factor-alpha levels in the human gingival sulcus during orthodontic treatment. Angle. Orthod., v. 76, n. 5, p. 830-6, 2006.

CHERIAN, P.P.; et al. Mechanical strain opens connexin 43 hemichannels in osteocytes: a novel mechanism for the release of prostaglandin. Mol. Biol. Cell., v. 16, n, 7, p. 3100-6, 2005.

CRUZ, D.R.; et al. Effects of low-intensity laser therapy on the orthodontic movement velocity of human teeth: a preliminary study. Lasers. Surg. Med., v. 35, p. 117-20, 2004.

DINARELLO, C.A. Biologic basis for interleukin-1 in disease. Blood., v. 87, n. 6, p. 2095-147, 1996.

ESPINDULA, A. Efeitos da piezoeletricidade na movimentação ortodôntica. 2014. 53 f. Trabalho de conclusão de curso (TCC) - Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2014.

FATHIMANI, M.; et al. Development of a standardized testing system for orthodontic sliding mechanics. Prog. Orthod., v. 16, p. 14, 2015.

GENETOS, D.C.; et al. Fluid shear-induced ATP secretion mediates prostaglandin release in MC3T3-E1 osteoblasts. J. Bone. Miner. Res., v. 20, n. 1, p. 41-9, 2005.

GUSMÃO, C.V.B.; MARIOLANI, J.R.L.; BELANGERO, W.D. Mechanotransduction and Osteogenesis. In: LIN, Y. Osteogenesis. Croácia: InTech, 2012.

HELLER, I.J.; NANDA, R. Effect of metabolic alteration of periodontal fibers on orthodontics tooth movement. Am. J. Orthod., v. 75, n. 3, p. 239-58, 1979.

IKEDA, K.; et al. Effects of low-intensity pulsed ultrasound on the differentiation of C2C12 cells. Life. Sci., v. 79, n. 20, p. 1936-43, 2006.

KAU, C.H.; et al. Photobiomodulation accelerates orthodontic alignment in the early phase of treatment. Prog. Orthod., v. 14, p. 30, 2013.

KAU, C.H. A radiographic analysis of tooth morphology following the use of a novel cyclical force device in orthodontics. Head. Face. Med., v. 7, p. 14, 2011.

KESSEL, R.G. Tecido conjuntivo: osso e formação óssea. In: _____ Histologia médica básica: a biologia das células, tecidos e órgãos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. cap. 7, p. 129-45.

LEE, W.C. Experimental study of the effect of prostaglandin administration on tooth movement--with particular emphasis on the relationship to the method of PGE1 administration. Am. J. Orthod. Dentofacial. Orthop., v. 98, n. 3, p. 231-41, 1990.

LEE, Y. The role of interleukin-17 in bone metabolism and inflammatory skeletal diseases. BMB. Rep., v. 46, n. 10, p. 479-83, 2013.

LI, M.; et al. Osteopenia and impaired fracture healing in aged EP4 receptor knockout mice. Bone., v. 37, n. 1, p. 46-54, 2005.

LINS, R.D.A.U.; et al. Atividade ósteo-reabsortiva na doença periodontal: o papel das citocinas e prostaglandinas. Rev. Cir. Traumatol. Buco-Maxilo-Fac., v. 7, n. 2, p. 29-36, 2007.

MADDI, A.; et al. Long wave ultrasound may enhance bone regeneration by altering OPG/RANKL ratio in human osteoblast-like cells. Bone., v. 39, n. 2, p. 283-8, 2006.

MAN, J.; et al. Low intensity ultrasound stimulates osteoblast migration at different frequencies. J. Bone. Miner. Metab., v. 30, n. 5, p. 602-7, 2012.

MCGORRAY, S.P.; et al. A randomized, placebo-controlled clinical trial on the effects of recombinant human relaxin on tooth movement and short-term stability. Am. J. Orthod. Dentofacial. Orthop., v. 141, p. 196-203, 2012.

MESQUITA, E.; LOBATO, M.R.; MARTINS, A.B. Os efeitos biológicos do uso do ultra-som em odontologia. In: MESQUITA, E.; KUNERT, I.R. O ultrassom na prática odontológica. Porto Alegre: Artmed, 2006. cap. 3, p. 58-65.

MOYERS, R.E. Ortodontia. 4a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.

MUKAI, S.; et al. Transforming growth factor-beta1 mediates the effects of low-intensity pulsed ultrasound in chondrocytes. Ultrasound. Med. Biol., v. 31, n. 12, p. 1713-21, 2005.

PROFFIT, W.R.; FIELDS JUNIOR, H.W.; SARVER, D.M. Ortodontia contimerânea. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

REHER, P.; et al. The stimulation of bone formation in vitro by therapeutic ultrasound. Ultrasound. Med. Biol., v. 23, n. 8, p. 1251-8, 1997.

REN, C.; LI, J.M.; LIN, X. LIPUS enhance elongation of neurites in rat cortical neurons through inhibition of GSK-3beta. Biomed. Environ. Sci., v. 23, n. 3, p. 244-9, 2010.

ROSS, M.H.; PAWLINA, W. Histologia: em correlação com biologia celular e molecular. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

RUELLAS, A.C. Biomecânica aplicada à clínica. Maringá: Dental Press, 2013.

SEVERINO, V.O.; NAPIMOGA, M.H.; DE LIMA PEREIRA, S.A. Expression of IL-6, IL-10, IL-17 and IL-8 in the peri-implant crevicular fluid of patients with peri-implantitis. Arch. Oral. Biol., v. 56, n. 8, p. 823-8, 2011.

SUZUKI, A.; et al. Daily low-intensity pulsed ultrasound stimulate production of bone morphogenetic protein in ROS 17/2.8 cells. J. Oral. Sci., v. 51, n. 1, p. 29-36, 2009.

TAKAYAMA, T.; et al. Low-intensity pulsed ultrasound stimulates osteogenic differentiation in ROS 17/2.8 cells. Life. Sci., v. 80, n. 10, p. 965-71, 2007.

TANABE, N.; et al. IL-1 alpha stimulates the formation of osteoclast-like cells by increasing M-CSF and PGE2 production and decreasing OPG production by osteoblasts. Life. Sci., v. 77, n. 6, p. 615-26, 2005.

WANG, J.H.; THAMPATTY, B.P. An introductory review of cell mechanobiology. Biomech. Model. Mechanobiol., v. 5, n. 1, p. 1-16, 2006.

XIONG, H.; WEI, L.; PENG, B. IL-17 stimulates the production of the inflammatory chemokines IL-6 and IL-8 in human dental pulp fibroblasts. Int. Endod. J., v. 48, n. 6, p. 505-11, 2015.

XU, Z.; et al. Cyclooxygenase-2 gene disruption promotes proliferation of murine calvarial osteoblasts in vitro. Bone., v. 41, n. 1, p. 68-76, 2007.

XUE, H.; et al. Low-intensity pulsed ultrasound accelerates tooth movement via activation of the BMP-2 signaling pathway. PLoS. One., v. 8, n. 7, p. e68926, 2013.