

Weslei Luiz de Oliveira

Como as vibrações mecânicas de alta frequência e baixa magnitude, influenciam a mecanotransdução de células ósseas: Um estudo de revisão

Belo Horizonte
Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional da UFMG
2013

Weslei Luiz de Oliveira

Como as vibrações mecânicas de alta frequência e baixa magnitude, influenciam a mecanotransdução de células ósseas: Um estudo de revisão

Monografia apresentada ao programa de Pós-graduação "*Lato Sensu*" em Fisioterapia em Ortopedia da Universidade Federal de Minas Gerais, apresentado como requisito parcial para a obtenção do título de especialista em Fisioterapia Ortopédica.

Orientador: Prof. MSc. Rafael Duarte Silva

Belo Horizonte
Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional da UFMG
2013

O48c Oliveira, Wesley Luiz de

2012 Como as vibrações mecânicas de alta frequência e baixa magnitude, influenciam a mecanotransdução de células ósseas: um estudo de revisão. [manuscrito] / Wesley Luiz de Oliveira – 2012.

22 f., enc.: il.

Orientador: Rafael Duarte Silva

Monografia (especialização) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional.

Bibliografia: f. 20-22

1. Transdução de sinal celular. 2. Ossos - Crescimento. 3. Células. I. Silva, Rafael Duarte. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional. III. Título.

CDU: 615.825

Resumo

Introdução: Como as vibrações mecânicas de alta frequência e baixa magnitude (LMHF) promovem reações anabólicas no tecido ósseo é motivo de crescente interesse da comunidade científica e requerem uma melhor compreensão dos mecanismos de mecanotransdução a nível celular. O objetivo do presente estudo é analisar através de revisão da literatura, como as vibrações mecânicas do tipo LMHF podem influenciar os mecanismos de mecanotransdução de células ósseas, propiciando bases teóricas dos processos microscópicos para fins de reabilitação.

Metodologia: Foi realizada uma busca exaustiva e sistematizada da literatura, cuja estratégia de busca foi pautada nas bases de dados PubMed/MedLine, Cochrane/Bireme, SCielo, Google Scholar e ScienceDirect, sem designação de periodicidade de registro. A busca foi complementada em sites de laboratórios de pesquisa aos quais autores de referência desempenham seus projetos. **Resultados:** Um total de 151 artigos foram encontrados durante a busca, porém somente seis trabalhos que investigaram *in vitro* os mecanismos de resposta das células ósseas através da expressão de genes liberados a partir de prévia estimulação vibratória do tipo LMHF forneceram delineamento metodológico satisfatório para esta revisão.

Discussão: A grande variedade nas propriedades vibratórias, as diversas metodologias aplicadas, o grande número de genes específicos mapeados bem como as semelhanças na expressão padrões entre muitos genes distintos para respostas anabólicas e catabólicas, apresentam uma co-dependência intrínseca de eventos moleculares envolvidos na adaptação osso através de estímulos mecânicos o que confirma a alta complexidade do metabolismo das células ósseas.

Conclusão: Modelos animais são eficientes instrumentos para o entendimento acerca da influência das vibrações mecânicas sobre as células ósseas, fornecendo dados importantes para o desenvolvimento de terapias e modelos de mecanotransdução. As dificuldades em estabelecer parâmetros vibratórios ideais justificam a elaboração de novos estudos que devem considerar as particularidades dos diferentes níveis de sensibilização celular com o desígnio de obter positiva adaptação tecidual.

Palavras-chave: *Transdução de sinal celular; Ossos; Crescimento; Células.*

Sumário

1 INTRODUÇÃO	04
1.1 Justificativa do estudo	07
1.2 Objetivos do estudo	07
2 MATERIAIS E MÉTODOS	07
2.1 Critérios de inclusão.....	07
3 RESULTADOS	08
3.1 Organograma 1	08
3.2 Tabela 1	09
4 DISCUSSÃO	15
5 CONCLUSÃO	19
6 REFERÊNCIAS	20

1 Introdução

Como as vibrações mecânicas de alta frequência e baixa magnitude (combinação de amplitudes e aceleração) descritas na literatura como *low-magnitude, high-frequency vibration (LMHF)*, promovem reações anabólicas no tecido ósseo é motivo de crescente interesse da comunidade científica, em vias de que esses mecanismos ainda não foram completamente elucidados (Kotiya et al., 2011; Lau et al., 2010).

Recentemente estudos confirmaram que uma variedade de estímulos mecânicos, incluindo fluxo de fluido, a pressão hidrostática, estiramento mecânico e carga vibratória, podem influenciar a remodelação óssea através da modulação das atividades osteoblástica e osteoclástica (Hess et al, 2010; Lau et al, 2010) e que a combinação entre altas frequências vibratórias (20 - 90 Hz) e baixas amplitudes (<1 × g) podem induzir respostas anabólicas no tecido ósseo (Rubin *et al.*, 2002; Lau et al., 2010; Garman *et al.*, 2007; Rubin *et al.*, 2007). Identificar os mecanismos moleculares aos quais, regulam as respostas adaptativas do osso frente a alterações na resposta de suporte a carga podem proporcionar a descoberta de intervenções mais eficientes diante da complexidade do processo de remodelação óssea (Judex et al., 2005).

O desenvolvimento do tecido ósseo frente à estimulação vibratória do tipo LMHF, requer uma melhor compreensão dos mecanismos de mecanotransdução a nível celular, no que diz respeito à identificação e quantificação dos genes envolvidos, sua interação e o fomento da atividade anabólica e catabólica do tecido ósseo (Kotiya et al., 2011; Judex et al., 2005). O processo de mecanotransdução inclui quatro fases: acoplamento mecânico, acoplamento bioquímico, transmissão do sinal a partir de sensores nas células, e resposta da célula efetora, onde os

estímulos físicos são captados e convertidos em sinais bioquímicos levando a uma resposta celular específica (Huang e Ogawa, 2010). Assim para um maior entendimento dos mecanismos aos quais as cargas mecânicas influenciam a bioquímica celular e a fisiologia dos tecidos é importante compreender como os tecidos e órgãos são organizados em múltiplas escalas (Ingber, 2008).

Há basicamente dois tipos de tecido ósseo, o tipo cortical (denso) e trabecular (poroso), sendo estes semelhantes em sua composição, mas diferentes em sua estrutura, função e distribuição. Histologicamente ambos os tecidos ósseos contêm formas diferentes de tecido, sendo estes, o tecido ósseo propriamente dito e o tecido lamelar. O tecido ósseo é caracterizado por irregularidade na orientação das fibras de colágeno, dando-lhe maior flexibilidade, porém oferecendo-lhe uma rigidez reduzida, por outro lado o osso lamelar só é formado após o nascimento e substitui de forma gradual o tecido ósseo formado na embriogênese (Clarke, 2008; Planell, 2009). A matriz óssea é composta por matriz inorgânica e orgânica, que é constituída basicamente de colágeno tipo I (90%), e em menor proporção de colágenos do tipo III, V, X e XII. O restante (cerca de 10%) da matriz orgânica é composta de proteínas não colagenosas e somente uma menor parcela da massa óssea é formada por elementos celulares (Tirkkonen, 2010). As células estaminais hematopoiéticas (HSC) e MSCs (células estromais não hematopoiéticas de origem mesodérmica) dão origem às células ósseas, intermediando a atividade celular através de células osteoprogenitoras tais como os osteoblastos, osteócitos e células de revestimento do osso. (Planell, 2009 e Tirkkonen, 2010).

Os osteoblastos e os osteoclastos foram considerados durante muito tempo, como percussores da remodelação óssea (Gusmão e Belangero, 2009), porém os osteócitos, formados por aprisionamento na matriz óssea são as células

mais abundantes desse complexo sistema correspondendo a cerca de 90-95% de todas as células ósseas despertando assim, interesse crescente por parte de pesquisadores em todo o mundo (Gusmão e Belangero, 2009). O processo de adaptação óssea frente às forças mecânicas é bem evidenciado como resultado de uma série de eventos celulares. (Gusmão e Belangero, 2009; Tirkkonen, 2010). Os osteócitos envolvidos por canalículos e dispersos por toda a matriz óssea regulam através de seus processos citoplasmáticos, junções GAP, fatores solúveis como indução do fluxo de fluido (fluid flow) e da à tensão de cisalhamento (shear stress) e também ações junto às células efetoras através de comunicação mecanicamente regulada (Lau, 2010; Tirkkonen, 2010). Por estarem dispersos em grande número e por sua capacidade de intercomunicação os osteócitos são pensados atualmente como células mecanosensoras essenciais responsáveis pela detecção das cargas mecânicas, enviando sinais para as células alvo do tecido ósseo, instruindo assim os osteoclastos e os osteoblastos quando é necessária sua atuação. (Lau et al., 2010; Clarke, 2008; Planell, 2009; Gusmão e Belangero, 2009; Tirkkonen, 2010). Judex et al. (2005), acompanharam a expressão de 13 genes específicos, como responsáveis pelas tarefas de indução mecânica e resposta (mecanotransdução) sobre a atividade metabólica do osso, sendo 8 desses genes envolvidos na atividade anabólica e 5 na atividade catabólica. Recentemente, outro estudo mostrou que a produção de óxido nítrico (NO) em osteoblastos (MC3T3-E1) foi linearmente dependente da taxa de cisalhamento de fluidos, e que esta dependia tanto a amplitude quanto da frequência do estresse vibratório aplicado (Bocabac et al., 2004).

O presente estudo justifica-se diante do crescente interesse da comunidade científica frente aos desafios e limitações que permutam o entendimento dos processos de formação e remodelação do tecido ósseo.

Portanto o objetivo deste estudo é analisar através de revisão da literatura como as vibrações mecânicas do tipo LMHF podem influenciar os mecanismos de mecanotransdução de células ósseas, propiciando bases teóricas dos processos microscópicos para fins de reabilitação.

2 Materiais e Métodos

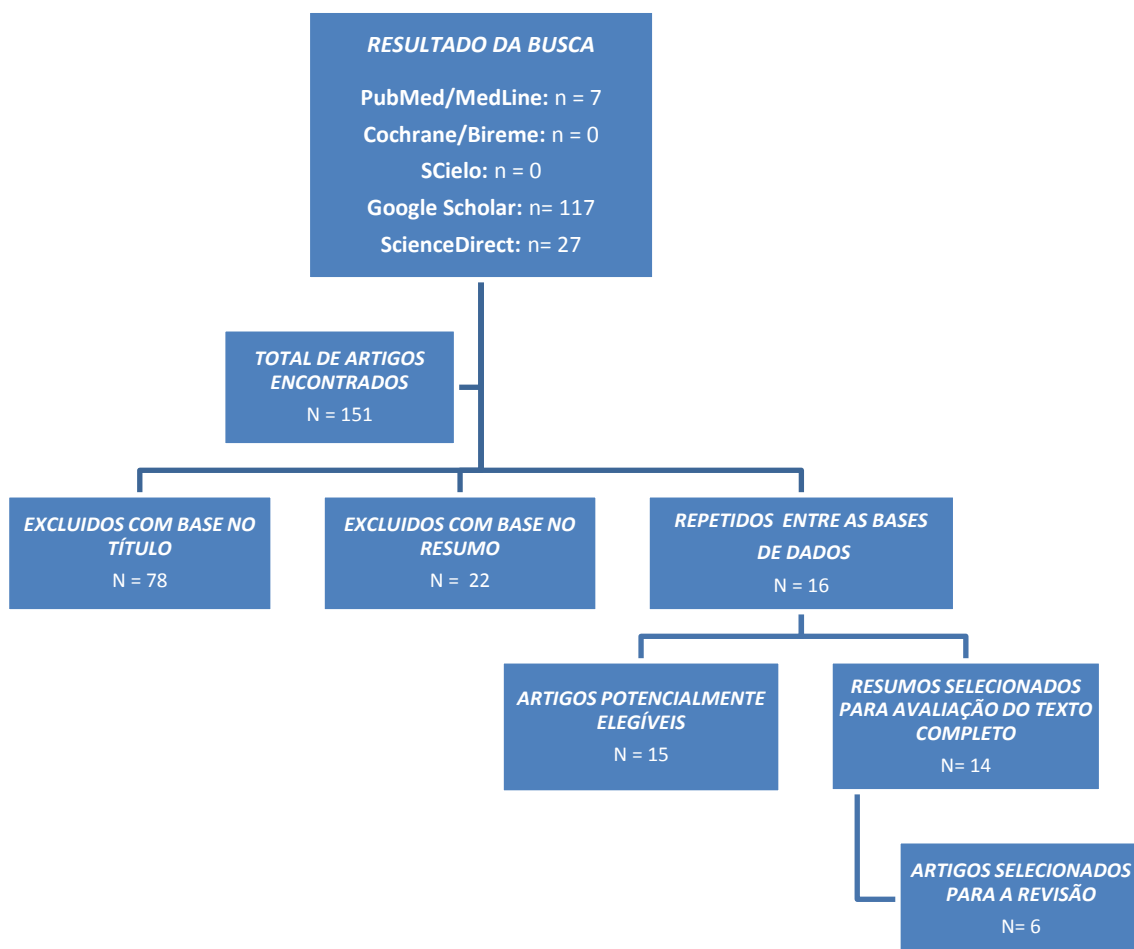
Para a elaboração do proposto estudo foi realizada uma busca exaustiva e sistematizada da literatura, cuja estratégia de busca foi pautada nas bases de dados PubMed/MedLine, Cochrane/Bireme, SCielo, Google Scholar e ScienceDirect, sem designação de periodicidade de registro ou limitações frente ao idioma de escrita. A busca foi complementada em sites de laboratórios de pesquisa aos quais autores de referência desempenham seus projetos. Foram utilizados os descritores: *bone cells**, *osteocyte**, *osteoblast**, *osteoclast**, *low-magnitude**, *high frequency**, *vibration**, e *gene expression**

2.1 Critérios de Inclusão

Foram incluídos neste estudo, trabalhos de delineamento metodológico do tipo experimental verdadeiro e quase experimental, que investigaram *in vitro* os mecanismos de resposta das células ósseas através da expressão de genes liberados a partir de prévia estimulação vibratória do tipo LMHF.

3 Resultados

Como resultado das buscas foram obtidos através das bases de dados referidas um total de 151 artigos dos quais, 117 foram obtidos através da base de dados Google Scholar, sete através do PubMed/MedLine e 27 artigos na base ScienceDirect. Do total de artigos, 78 foram excluídos com base no título, 22 excluídos com base no resumo, 16 exclusões ocorreram em decorrência de duplicidade de trabalhos entre as bases de dados, totalizando 14 artigos para avaliação do texto completo, onde seis foram selecionados para revisão. O organograma 1, mostra o sumário gráfico da busca.



ORGANOGRAMA 1 – Representação esquemática da estratégia de busca adotada durante o estudo.

Tabela 1 – Característica dos estudos em cultura celular livre e modelo experimental em animais

AUTOR	Amostra/ Cultura Celular	Frequência Vibratória	Magnitude Aceleração (1 g = 9.8 m/s ²) ou Microtensão	Tempo Exposição (minutos)	Tempo de análise da resposta ao estímulo	Resultados Comparados com o Grupo Controle
1 JUDEX et al., 2005	Células de Fêmeas adultas de Ratos BALB/cByJ	45 Hz	0.3 g	10 min /dia Durante 4- 21 dias	Após os dias 4 e 21	Após 4 dias ativ. Anabólica Inalterada ↑ iNOS (39%, P = 0,07), ↑MMP-2 (54%), e RANKL (32%)
2 KOTIYA et al., 2011	Células de 24 tíbias fêmeas de ratos C57BL/6	70 Hz	0.5 g	15 min./dia (4 grupos) durante 4 horas e Durante 4 dias	Após 4 horas último estímulo	↑ Alp e BMP-2 (após 4 dias) ↑ quimo-transporte ↓ Runx-2 e Osx (após 4 horas) ↑ Wnt / Lrp e Sost, DKK1 COX-2 e BMP-2 (após 4 horas) ↓ Alp, Bsp e OCN ↑ NOS (taxa aceleração máxima)
3 BACABAC et al., 2006	MC3T3-E1	05 - 30 - 60 90 Hz	0.15 - 0.45 g	5 minutos	Imediata em células de cultura	↑ NOS (100 Hz) PGE-2 inalterada ↑ COX-2 (5 Hz > que em 100 Hz)
4 HOU et al., 2011	MC3T3-E1	40 Hz	0,06 - 0,8 g	30 min /dia Durante 3 dias	12 hr. após estímulo e aos (0, 30, 60, 90, 120, 240) minutos para OPG e Wnt10B	↑ OPG (0,06, 0,14, 0,32, e 0,49 g) ↑ Wnt 10 B (2,4 x) ↓ Níveis Esclerostina e RANKL ↑ OPG e Wnt10B (30 min)
5 LAU, et al., 2010	MLO-Y4	30 - 60 - 90 Hz	0.3 g	60 minutos	Imediata em células de cultura	↑ COX2 (30 - 60 - 90 Hz) ↓ RANKL (30 - 60 - 90 Hz) OPG inalterada
6 TANAKA et al., 2003	MC3T3-E1	0 - 50 Hz	300 microtensão	3 min./dia Durante 3 - 7 dias	No 4 ou 8 dia	↑ MMP-9 (no 4º dia)

No trabalho de Hou et al., 2011, o potencial osteogênico e os mecanismos mecanobiológicos da vibração mecânica com propriedades de 40 Hz e amplitudes variáveis (0,06, 0,14, 0,32, 0,49, 0,66, e 0,8 x g) foram analisados. A periodicidade de submissão dos estímulos aos quais as células (osteoblastos - MC3T3-E1) foram submetidas foi de exatos 30 minutos por dia durante 3 dias. Como marcadores da atividade celular osteogênica, foram analisadas as transcrições de fatores da glicoproteína Wnt10B, Osteoprotegerina (OPG), ativador do receptor do fator nuclear Kb (*RANKL*) e da proteína esclerostina (*sost*), comparando sua atividade através de um grupo controle cultivado de forma semelhante, em placa estacionária pelo mesmo período do grupo de exposição. As avaliações dos marcadores bioquímicos foram realizadas 12 horas após o último ciclo de estimulação (terceiro dia) em ambos os grupos. A osteogênese foi relacionada com a transcrição de fatores Wnt10B, OPG e RANKL. Como resultado a expressão de OPG aumentou significativamente nas acelerações entre 0,06, 0,14, 0,32, 0,49g quando comparadas com as culturas controle ($p < 0,001$). Os níveis de RANKL diminuíram em todas as amplitudes. Para investigar se as mudanças estão relacionadas com a sinalização de vias Wnt (rede de proteínas sensibilizadora dos receptores localizados nas superfícies das células para a expressão de DNA no núcleo celular), os autores acompanharam os níveis de proteína Wnt10B. Desta forma os autores verificaram que os níveis da proteína Wnt10B foi aumentada em 2,4 vezes, onde a ligação e inibição com outras moléculas foi determinante indutora da atividades osteoblástica e inibidora da atividade osteoclástica. Neste mesmo estudo os autores investigaram se o tempo de vibração do tipo LMHF foi determinante na expressão dos genes a uma frequência de 40 Hz e amplitudes de 0,49 g com intervalos de tempo de 0, 30, 60, 90, 120, 240 minutos. Como resultado evidenciou-se um pico de expressão dos

níveis de RNAm, OPG e Wnt10B alcançados em 30 minutos, porém após esse período os níveis de RNAm foram decrescentes.

Lau et al., 2010, investigaram os efeitos da vibração LMHF na ativação dos osteócitos, em consideração à sua dispersão, teorizando sobre seu potencial mecanosensor responsável por detectar a estímulos vibratórios produzindo fatores solúveis que modulariam a atividade das células efectoras. Para tanto foram investigadas duas linhagens de células murinas (MLO-Y4 e RAW264.7). As culturas de MLO-Y4 (Ostoblastos) foram expostas à frequências de 30 - 60 e 90 Hz, com acelerações de 0,3 g por 60 minutos. A transcriptase reversa, enzima capaz de realizar um processo de transcrição contrária em relação ao padrão celular, foi o método utilizado para mensurar a resposta mecanobiologica através da expressão dos genes de prostaglandina H2 sintase, percussora da também conhecida Cicloxigenase 2 (COX2), OPG e RANKL, e comparadas com grupo sem vibração. Os resultados mostraram aumento significativo dos níveis de RNAm de COX-2, em todas a frequências, quando comparado com o grupo controle onde o maior nível foi encontrado em frequências de 90 Hz, algo em torno 3.4 vezes ou 344% ($p < 0,01$). Uma hora de carga vibratória LMHF em MLO-Y4 diminuiu a expressão RNAm de RANKL em todas as frequências, e mais significativamente, a 60 Hz muito embora o nível de RNAm de OPG não tenham sofrido alterações significativas, a diminuição da RANKL contribuiu para uma diminuição significativa de proteína RANKL/OPG em todas as frequências. Em conjunto, estes dados sugerem que a vibração LMHF dirige a expressão do RNAm produzindo fatores solúveis que atenuam efeitos anti-reabsorção.

Em 2005, Judex et al. realizou in vivo, experimento com 45 ratos fêmeas BALB/cByJ, divididos em 3 grupos; controle, desuso e estimulação vibratória. Para o

grupo de estimulação vibratória os animais foram submetidos à frequências de 45 Hz, e amplitudes de 0.3 g, 10 minutos por dia, cinco dias por semana. Seis animais de cada grupo foram sacrificados no quarto dia e nove dos respectivos grupos no 21º dia. Analisando os dados através de histomorfometria e quantificação de genes de expressão através de PCR, assim os autores monitoraram a expressão de 13 genes divididos em 2 grupos, dos quais os genes caracterizados como essenciais para a formação óssea incluíam: núcleo de fator alfa de ligação 1 (Cbfa1), osterix (Osx), fator de crescimento de insulina -1 (IGF-1), proteína morfogenética do osso-2 (BMP-2), integrina b3, o colágeno tipo I, metaloproteinase- 2 (MMP-2 ou gelatinase A), e osteonectina. Em contrapartida os genes relacionados com a reabsorção óssea incluíram: RANKL, óxido nítrico sintase indutível (iNOS ou NOS2), catepsina K, metaloproteinase-9 (MMP-9 ou gelatinase B), e osteopontina (OPN). Os achados mostraram que quatro dias de estimulação vibratória não foram capazes de produzir diferenças significativas na expressão dos genes anabólicos quando comparado com o controle. Após 21 dias de vibração LMHF, houve mudanças significativas na expressão de genes MMP2 (54%) já nos genes osterix em 14%, BMP-2 (18%) e colágeno tipo I (19%), as modificações não foram estatisticamente significativas para os genes esses ligados a atividade osteoblástica. Em relação aos genes de reabsorção RANKL (32%), e iNos (39%), houve aumento estatisticamente significativo de ambos marcadores.

Kotiya et al., 2011, investigaram as alterações do tecido ósseo cortical a nível molecular em resposta a carga vibratória de LMHF (70 Hz, 0,5 g), comparando os resultados com o estímulo de estresse de alta compressão (*High-strain compression – HSC*). Nesse mesmo estudo os autores analisaram a capacidade de cada uma desses estímulos em alterar o quimio-transporte das células, em resposta

a 5 minutos de estimulação vibratória (30 ciclos) e de HSC a 10.0N. Vinte e quatro ratos C57BL/6 machos foram aleatorizados em 4 grupos assim divididos: (1) Grupo HSC (60 ciclos), (2) grupo de vibração (15 minutos) ambos com eutanásia 4 horas após o estímulo. Para mensurar os efeitos crônicos, estímulos diários de (3) HSC (60 ciclos/dia) e (4) vibração (15 min./dia) com eutanásia no quarto dia 4 horas após o último estímulo. Os genes analisados foram fosfatase alcalina (*Alp*), *Bmp-2*, Sialoproteína do osso (*Bsp*), *Cox-2*, proteína Dickkopf (*Dkk1*), *Sost*, osterix (*Osx*), Fator de transcrição Runt – 2 (*Runx-2*) e osteocalcina (*Ocn*). Foram observados que em ambos os períodos, de 4 horas bem como em 4 dias o grupo de LMHF obteve mudanças somente nos níveis de RNAm de COX-2 e Ocn. Os níveis de COX-2 foram aumentados em 4 dias quando comparado com o controle. Os níveis de expressão de Ocn apresentaram decréscimo no quarto dia ($p < 0,075$).

Tanaka et al., 2003 tiveram como objetivos, investigar os efeitos sobre a proliferação celular, a atividade da enzima fosfatase alcalina, além da expressão dos genes de RNAm de Ocn, colágeno tipo I, OPN, conexina 43 (Cx43), e quatro metaloproteinases de matriz (MMPs-1^a, -3, -9, -13) associados com a resposta anabólica no osso através da estimulação mecânica em culturas de osteoblastos (MC3T3-E1). Os autores analisaram três grupos propostos: (1) Grupo de estimulação sinusoidal de 3 Hz, com 0-3000 microstrain (2), Grupo de vibração (0 a 50 Hz - 300 microstrain), e (3) grupo de tensão sinusoidal combinada à vibração do tipo LMHF (S + V). As culturas foram expostas a uma periodicidade de 3 minutos por dia durante 3 ou 7 dias. As células foram analisadas em tempo real (PCR-RT) um dia após a última carga vibratória (dias 4 ou 8). Em relação aos achados referentes aos níveis da fosfatase alcalina os autores observaram no grupo 3 (S+V) redução significativa da proliferação celular no oitavo dia de exposição vibratória, quando

comparado com o controle. Um aumento da expressão do RNAm de OCN foi observada após 7 dias de estímulos S+V. A expressão de RNAm de metaloproteinase-9 (MMP-9) também foi afetada por estímulos mecânicos e vibratórios combinados após 3 dias. Nenhuma alteração foi observada na atividade da fosfatase alcalina e os níveis de ARNm de colágeno tipo I, osteopontina, Cx 43, MMP-1A, -3, -13. A expressão de RNAm de MMP-1A permaneceu inalterada em todos os grupos. A PCR revelou que o tratamento de S+V induziu um aumento de 2,6 vezes nos níveis de RNAm de OCN no oitavo dia quando comparado com o controle, enquanto à estimulação vibratória LMHF, elevou a expressão de RNAm de MMP-9 no quarto dia. O estímulo vibratório aumentou significativamente a expressão de RNAm de MMP-9 em 1,3 vezes em relação ao controle. Já a estimulação senoidal isolada não alterou a expressão do RNAm de qualquer gene.

Bocabac et al., 2006, realizaram uma análise acerca das influências do estresse vibratório sobre o núcleo citoplasmático das células osteoblásticas (MC3T3-E1), submetidas a diferentes frequências e amplitudes vibratórias. O tratamento vibratório consistiu de aplicação de estímulos de frequências variadas (05 - 30 - 60 – 100 Hz), durante 5 minutos com amplitudes (5, 4.5, 1,75, 0,75 mm), taxa de aceleração máxima (0.15, 30.1, 93.8, 186 km/s^3) e velocidade máxima (0.15, 0.85, 0.66, 0.47 m/s) variando respectivamente as frequências impostas. Os autores analisaram os efeitos agudos (imediatos) e de longo prazo (30 minutos após) da estimulação vibratória. As respostas agudas em frequências de 100 Hz, apresentou um aumento da expressão de NO em relação às taxas de aceleração máxima dos estímulos vibratórios após 5 minutos de aplicação do estresse, porém não houve correlação linearmente positiva da vibração em relação à liberação de NO através da velocidade máxima (m/s). Os efeitos tardios do estresse vibratório sobre as

células ósseas foi medida através do acúmulo de prostaglandina 2 (PGE 2) liberada após 5 minutos de tratamento com diferentes propriedades vibratórias, sem que houvesse relação positiva da taxa de aceleração máxima associada sem linearidade também em relação à taxa de velocidade máxima aplicada. Quando os autores analisaram os efeitos de longo prazo do estresse vibratório de 100 Hz, após 5 minutos de LMHF, sobre as células ósseas, observaram um aumento expressão do RNAm de COX-2/PGE2, em relação a outras frequências (5 - 30 - 60 Hz) 30 minutos após o estímulo. Durante a estimulação vibratória de 100 Hz a relação entre as frequências foi duas vezes maior do que os estímulos de 5 Hz e 30 Hz. A tabela 1 mostra a caracterização dos estudos selecionados realizada a partir da extração dos parâmetros e características vibratórias.

4 Discussão

Hou et al, 2011, com um trabalho relevante e de rigor metodológico importante, verificaram através da comparação com grupo controle uma correlação positiva e estatisticamente significativas em vias de sinalização Wnt, aumentando a sensibilidade de osteoblastos em estimulação vibratória de baixa amplitude e alta frequência em relação à efeitos agudos e crônicos das vibrações mecânicas do tipo LMHF fornecendo margens importantes para a interpretação a cerca dos mecanismos de mecanotransdução de células ósseas.

Lau et al., 2010, buscaram um melhor entendimento dos mecanismos de mecanotransdução celular analisando secundariamente a correlação entre a expressão de COX-2 e a produção de PGE 2 através da vibração LMHF, teorizando se esse efeito seria semelhante ao produzido pelo fluxo de fluido. Importante ressaltar que esse sistema faz parte de mecanismos pro inflamatórios atuando em

osteoblastos induzindo a síntese de COX-2 mediada por PGE 2 e a expressão de RANKL que induz a diferenciação de osteoclastos progenitores em osteoclastos maduros pela ligação ao receptor para RANKL presente no osteoclasto progenitor. Assim houve um decréscimo significativo nos níveis de PGE2 no grupo de vibração (-61%, $p < 0,01$) em comparação com o controle. Em concordância com o descrito por Rocabac et al. (2006) os resultados confirmam os mecanismos anti-absortivos da vibração LMHF.

O modelo de Judex et al., 2005, através de um estudo morfométrico, forneceu sobre tudo uma metodologia voltada para a identificação dos reais fatores que poderiam estimular a expressão de genes diferenciais na atividade metabólica do tecido ósseo. Os autores através de comparações e inferências com grupo controle forneceram a 15 ratos fêmeas estímulos vibratórios in vivo. Quando os autores correlacionaram os genes anabólicos e catabólicos do tecido ósseo para qualquer dos grupos em dois “*Clusters*” observaram que havia semelhança na expressão padrões entre muitos genes distintos que respondem para os sinais anabólicos e catabólicos que resultam de uma co-dependência intrínseca de eventos moleculares envolvidos na adaptação osso através de estímulos mecânicos o que confirma a alta complexidade do metabolismo das células ósseas e a necessidade de posteriores metodologicamente confiáveis.

Kotiya et al. (2011), realizaram o primeiro estudo experimental que teorizou a respeito do aumento do infiltrado ósseo em resposta a estímulos vibratórios e diante do fato de ambos os tratamentos promoverem um aumento do infiltrado na rede lacunar canalicular do osso cortical melhorando assim o quimio-transporte celular (QTC), os autores afirmaram que as alterações no QTC são necessárias para a mecanotransdução, mas não é suficiente para estimular a

formação óssea. A ausência de resposta mecanobiológica das células ósseas sobre a influência do estímulo vibratório pode ser atribuído neste estudo ao tratamento dado as culturas durante o preparo para a análise dos genes em tempo real (PCR-RT) e através do descrito por Bacabac et al., 2006 que atribuiu à viscoelasticidade das células, as respostas células específicas a diferentes propriedades vibratórias onde altas frequências seriam traduzidas pelo núcleo celular (menor deformação) enquanto baixas frequências influenciariam por exemplo à parede celular com maior capacidade de deformação, excitando as células ósseas por diferentes vias, o que pode alterar inclusive a expressão dos genes envolvidos. Assim, os achados macro e microscópicos sugeriram que as vibrações LMHF, foram ineficientes na estimulação do osso cortical, quando comparado com o controle e em relação ao HSC que por sua vez promoveu alterações macroscópicas na massa óssea e na expressão de genes osteogênicos e anti-osteoclásticos.

O modelo de Tanaka et al. (2003), não analisou as respostas celulares imediatas à aplicação dos estímulos, dado esse limitador frente os resultados apresentados. Em decorrência da propriedade dinâmica do tecido ósseo, a resposta aguda ao estímulo deveria ser considerada uma vez que os eventos de transdução de sinais, tais como a ativação de canais de cálcio e de sinalização com quinases ocorrem em milissegundos ou minutos, respectivamente (Liedert et al., 2006). Os resultados do estudo sugerem que os osteoblastos são mais sensíveis estímulos vibratórios de alta frequência e baixa amplitude. O aumento na expressão de OCN faz menção ao seu papel como um importante marcador mecanobiológico para a diferenciação osteoblastogênica. A regulação de RNAm de MMP-9 obtido através da vibratório mecânica sugere um papel potencial na remodelação da matriz extracelular matriz. O fato de os níveis de RNAm de MMP-1 (colagenase 1), MMP-3

e e MMP-13 (colagenase 3), não apresentarem alterações aos estímulos mecânicos utilizados e em contrapartida a expressão dos genes de MMP-9 apresentarem elevação dos seus níveis durante o tratamento vibratório, seu verdadeiro papel na estimulação de osteoblastos ainda é desconhecido em sua complexidade e novas investigações são necessário para compreender o papel da MMP-9 bem como das outras MMPs em resposta à vibração de LMHF.

Bocabac et al. (2006) analisaram através de análise de variância (ANOVA one-way) as diferenças entre o DNA total, RNA e proteínas de expressão de diferentes de tipos de vibração. Foram consideradas basicamente a quantificação dos genes de NO e PGE2 e sua relação com o pico de aceleração do estímulo vibratório, que por sua vez foi analisado através de regressão linear. Os resultados sugeriram que a resposta de células ósseas estimuladas através de vibração dependia sobre tudo da frequência do estímulo aplicado e que o movimento do núcleo celular seria o mecanismo responsável pela liberação desses marcadores bioquímicos. Apesar de os autores não utilizaram grupo controle clássico, o estudo fornece uma consistência metodológica importante e fornece parâmetros significativos para a quantificação de genes específicos envolvidos na mecanotransdução de células ósseas. Em suma as diferentes frequências e amplitudes aplicadas sobre o núcleo citoplasmático das células osteoblásticas foram reconhecidos como determinantes da expressão de RNAm de COX-2, NO e prostaglandinas 2 (PGE 2) das células e o mapeamento desses genes são de fundamental relevância para o proposto nesta revisão.

5 Conclusão

Modelos animais são eficientes instrumentos para o entendimento acerca da influência das vibrações mecânicas sobre as células ósseas, fornecendo dados importantes para o desenvolvimento de terapias e modelos de mecanotransdução celular subjacentes às variadas vias de transdução de sinal para o osso. Porém estes dados devem ser pensados para adaptação do complexo metabolismo ósseo de humanos. As dificuldades em estabelecer parâmetros vibratórios ideais para a expressão de genes, proliferação celular, síntese da matriz, e liberação de fatores de crescimento, justificam a elaboração de novos estudos que devem considerar as particularidades dos diferentes níveis de sensibilização celular com o desígnio de obter positiva adaptação tecidual.

6 Referências

KOTIYA, A.A.; BAYLY, P.V.; SILVA, M.J. Short-term low-strain vibration enhances chemo-transport yet does not stimulate osteogenic gene expression or cortical bone formation in adult mice, **Bone**. **2011**; Volume 48, Issue 3, 1 March, 468-475

LAU, E.; AL-DUJAILI, S.; GUENTHER, A.; LIU, D.; WANG, L.; YOU, L. Effect of low-magnitude, high-frequency vibration on osteocytes in the regulation of osteoclasts. **Bone**. **2010**; 46(6): June;1508–1515.

HESS, R.; DOUGLAS, T.; MYERS, K.A.; RENTSCH, B.; RENTSCH, C.; WORCH, H.; SHRIVE, N.G.; HART, D.A.; SCHARNWEBER, D. Hydrostatic pressure stimulation of human mesenchymal stem cells seeded on collagen-based artificial extracellular matrices. **J Biomech Eng**. 2010; 132: 021001.

RUBIN, M.R.; COSMAN, F.; LINDSAY, R.; BILEZIKIAN J.P. The anabolic effects of parathyroid hormone. **Osteoporosis International**. 2002; (13) 267–277.

GARMAN, R.; GAUDETTE, G.; DONAHUE, L.; RUBIN, C.; JUDEX, S. Low-level accelerations applied in the absence of weight bearing can enhance trabecular bone formation. **J Orthop Res**. 2007; 25: 732-740

RUBIN, C.; CAPILLA, E.; LUU, Y.K.; BUSA, B.; CRAWFORD, H.; NOLAN, D.J.; MITTAL, V.; ET AL. Adipogenesis is inhibited by brief, daily exposure to

highfrequency, extremely low-magnitude mechanical signals. **Proc Natl Acad Sci USA** 104. 2007. 17879-17884.

JUDEX, S.; ZHONG, N.; SQUIRE, M.E.; YE, K.; DONAHUE, L.; HADJIARGYROU, M.; RUBIN, C.T. Mechanical Modulation of Molecular Signals Which Regulate Anabolic and Catabolic Activity in Bone Tissue. **Journal of Cellular Biochemistry**. 2005; 94: 982–994

HUANG, C.; OGAWA, R. Mechanotransduction in bone repair and regeneration. **The FASEB Journal**. 2010; 24. 10 3.625-3.63

INGBER, D.E. Tensegrity-based mechanosensing from macro to micro. VOLUME 97, Issues 2-3, june-july. 2008; 163-179. ISSN 0079-6107,0.1016/j.pbiomolbio. 2008.02.005.

CLARKE, B. Normal bone anatomy and physiology. **Clin J Am Soc Nephrol**. 2008; 3 Suppl 3: S131-9.

PLANELL, J. A, ED-BEST, S.M.; LACROIX, D.; MEROLLI, A. Bone repair biomaterials. **Cambridge, Woodhead Publishing Ltd**. 2009; pp. 25-117.

TIRKKONEN, L. The effects of vibration loading on adipose stem cell viability, proliferation and osteogenic differentiation. Master's thesis. Institute of Medical Technology. **University Tampere**. Finland. May 2010.

GUSMÃO, C.V.B.; BELANGERO, W.D. Como a célula óssea reconhece o estímulo mecânico? **Rev Bras Ortop.** 2009; 44(4):299-305

HOU, W.W.; ZHU, Z.L.; ZHOU, Y.; ZHANG, C.X.; YU, H.Y. Involvement of Wnt activation in the micromechanical vibration-enhanced osteogenic response of osteoblasts. **J Orthop Sci.** 2011; 16:598–605

TANAKA, S.M.; LIB, J.; DUNCANA, R.L.; YOKOTAB, H.; BURRB, D.B.; TURNER, C.H. Effects of broad frequency vibration on cultured osteoblasts. **Journal of Biomechanics.** 2003; 36: 73–80

LIEDERT, A.; KASPAR, D.; BLAKYTNY, R.; CLAES, L.; IGNATIUS, A. Signal transduction pathways involved in mechanotransduction in bone cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 2006; 349, 1-5.

BACABAC, R.G.; SMIT, T.H.; VAN LOON, J.J.W.A.; DOULABI, B.Z.; HELDER, M.; KLEIN-NULEND, J. Bone cell responses to high-frequency vibration stress: does the nucleus oscillate within the cytoplasm? **The FASEB Journal.** 2006; Vol. 20 May 858-