

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO - UNINOVE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTU SENSU

GABRIELA GOMES CARDOSO RODRIGUES

**“EFEITO DA TOXINA URÊMICA INDOXIL SULFATO EM
CULTURA DE MIOBLASTOS C2C12 TRATADOS OU NÃO COM
LASER DE BAIXA POTÊNCIA”**

SÃO PAULO

2015

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO - UNINOVE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTU SENSU

GABRIELA GOMES CARDOSO RODRIGUES

**“EFEITO DA TOXINA URÊMICA INDOXIL SULFATO EM
CULTURA DE MIOBLASTOS C2C12 TRATADOS OU NÃO COM
LASER DE BAIXA POTÊNCIA”**

Dissertação de mestrado
apresentada de Pós- Graduação
em Medicina da Universidade
Nove de Julho como requisito para
obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Humberto Dellê

SÃO PAULO

2015

Rodrigues, Gabriela Gomes Cardoso.

Efeito da toxina urêmica indoxil sulfato em cultura de mioblastos C2 C12 tratados ou não com laser de baixa potência. / Gabriela Gomes Cardoso Rodrigues. 2015.

64 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2015.

Orientador (a): Prof. Dr. Humberto Dellê.

1. Miopatia urêmica. 2. Doença renal crônica. 3. Toxinas urêmicas.

I. Dellê, Humberto. II. Título

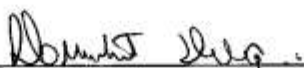
CDU 616

São Paulo, 04 de fevereiro de 2015.

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno (a): GABRIELA GOMES CARDOSO RODRIGUES

Título da Dissertação: "EFEITO DA TOXINA URÊMICA INDOXIL SULFATO EM CULTURA DE MIOBLASTOS C2C12 TRATADOS OU NÃO COM LASER DE BAIXA POTÊNCIA".

Presidente: PROF. DR. HUMBERTO DELLÉ  _____

Membro: PROFA. DRA. LUCIENE MACHADO DOS REIS  _____

Membro: PROFA. DRA. MARIA APARECIDA DALBONI  _____

*“Talvez não tenha conseguido fazer o
melhor, mas lutei para que o melhor
fosse feito. Não sou o que deveria ser.*

DEDICATÓRIA

Primeiramente à Deus, pela minha vida e pela paz e força nos momentos em que me encontrei incapaz de prosseguir;

Ao meu esposo Marcos Antonio Rodrigues que sempre acreditou nos meus sonhos, me apoiou, encorajou e incentivou a continuar mesmo quando eu pensava em desistir e não deixou nossa união se abalar mesmo nos vendo apenas aos finais de semana;

Aos meus avós Jandira Gomes de Lima e Dorival de Lima Cardoso principais responsáveis pela minha vida e a quem devo meu caráter e sempre acreditam no meu potencial.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Nove de Julho, que aceitou me receber no programa de Mestrado e acreditou no meu profissionalismo;

À minha mãe Sandra Ap. Gomes Cardoso que acreditou no meu sonho e abriu a porta de sua casa, além de todo auxílio, amor e compreensão;

Ao professor Humberto Dellê, que muito me ajudou nos experimentos em um primeiro momento, me acolheu de bom grado no segundo ano de mestrado e soube entender minhas limitações e dificuldades;

Ao professor Felype de Carvalho Barreto que foi meu primeiro orientador e amigo que acreditou e me direcionou nessa dissertação;

À minhas co-orientadoras professora Raquel Agneli Mesquita Ferrari e Kristianne Porta Santos Fernandes que sempre me auxiliaram e acreditaram no meu trabalho;

A professora Maria Aparecida Dalboni por ceder seu laboratório e me direcionar para o melhor entendimento do indoxil sulfato;

Ao Laboratório de Nefrologia da Unifesp e aos doutorandos Tércisio e Caren que me ajudaram para a obtenção dos resultados de citometria de fluxo;

Aos meus amigos de mestrado Adriano, Lucas, Adilson, Regiane, José, Mozânia, Otávio e Fábio que me fizeram rir, chorar e continuar a lutar sempre por pior que o momento fosse;

A meus amigos Beatriz Gasperazzo e Vinicius Cardoso que sempre estiveram ao meu lado, ajudando nos experimentos e contribuindo com conhecimento e pela paciência;

Aos Dellezinhos Camila, Rodrigo, Yves, Diego, Luiz e Chrisna por toda a ajuda para obtenção dos resultados e pelas risadas;

A minhas alunas de iniciação científica Giulianna Sibillo e Renata Tarraf por dedicação e auxílio;

E a todas as pessoas que direta ou indiretamente colaboraram para o sucesso deste trabalho.

SUMÁRIO

Resumo	
1. Introdução	
1.1. Doença renal crônica.....	10
1.2. Miopatia urêmica.....	11
1.3. Toxinas urêmicas – indoxil sulfato.....	13
1.4. Considerações gerais sobre o músculo esquelético	
1.4.1. Células satélites.....	16
1.4.2. Miogênese.....	18
1.4.3. Interleucina 6.....	21
1.5. Estresse oxidativo.....	22
1.5.1. Óxido nítrico.....	23
1.6. Terapia com laser de baixa potência (LBP).....	24
2. Objetivos.....	26
3. Material e Métodos	
3.1. Células musculares esqueléticas (C2C12).....	27
3.2. Indoxil sulfato (IS).....	27
3.3. Cultivo Celular.....	28
3.4. Condições de tratamento.....	29
3.5. Irradiação com laser de baixa potência.....	29
3.6. Ensaio de atividade mitocondrial (MTT).....	30
3.7. Ensaio de viabilidade e necrose por citometria de fluxo (PI).....	31
3.8. Determinação da produção de nitrito com avaliação de estresse oxidativo	32
3.9. Avaliação de estresse oxidativo por DPPH.....	33
3.10. Análise da expressão de IL-6, Miogenina e MyoD por PRC em tempo real.....	34
3.10.1. Extração de RNA total.....	34
3.10.2. Síntese de cDNA.....	35
3.10.3. PCR em real time – qPCR.....	35

4. Análise estatística.....	36
5. Resultados	
5.1. Análise da atividade mitocondrial por MTT.....	37
5.2. Viabilidade celular e necrose analisado por citometria de fluxo.....	41
5.3. Análise de estresse oxidativo: mensuração de nitrito pelo método de Griess e citometria de fluxo.....	44
5.4. Avaliação sobre diferenciação	
5.4.1. Cultura de células C2C12.....	46
5.4.2. Expressão de IL-6.....	47
5.4.3. Expressão de miogenina e fator de diferenciação miogênica (MyoD).....	48
6. Discussão.....	49
7. Conclusão.....	53
8. Referências Bibliográficas.....	55

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. (A) Célula satélite. (B) ilustração da localização da célula satélite em relação à fibra muscular esquelética. Imagem através de microscopia eletrônica na primeira descrição da célula satélite documentada na literatura científica ²⁴. Sp= célula satélite; bm= membrana basal; mp= fibra muscular esquelética..... 17

Figura 2. Modelo das etapas de desenvolvimento do músculo esquelético. Primeiramente ocorre a multiplicação celular mediada por fatores de crescimento; na ausência de fatores de crescimento, as células começam a se alinhar e cessam a multiplicação. Após esta etapa as células se fundem em miotubos e a fibra muscular finalmente se forma e apresenta contração espontânea ³²..... 19

Figura 3. Esquema demonstrativo adaptado ³⁵ dos principais eventos durante a miogênese do músculo estriado esquelético. Para tanto, os mioblastos proliferam-se e são induzidos a sofrerem diferenciação em miotubos e posteriormente passam por uma fase de maturação com a formação das miofibras..... 20

Figura 4. Viabilidade das células C2C12 após 24 horas de incubação, avaliada através da atividade mitocondrial (ensaio MTT). ^a p<0,05 vs. Controle; ^b p<0,05 vs. IS 0,6; ^c p<0,05 vs. IS 53..... 39

Figura 5. Viabilidade das células C2C12 após 48 horas de incubação, avaliada através da atividade mitocondrial (ensaio MTT). ^a p<0,05 vs. Controle; ^b p<0,05 vs. IS 0,6; ^c p<0,05 vs. IS 53; ^f p<0,05 vs IS 0,6 + LBP..... 39

Figura 6. Viabilidade das células C2C12 após 72 horas de incubação, avaliada através da atividade mitocondrial (ensaio MTT). ^a p<0,05 vs. Controle....pág. 40

Figura 7. Representação dos resultados de viabilidade e necrose adquiridos por citometria de fluxo..... 41

Figura 8. Viabilidade das células C2C12 avaliada por citometria de fluxo após 72 horas de incubação com IS..... 42

Figura 9. Viabilidade das células C2C12 avaliada por citometria de fluxo após 72 horas de incubação com IS e com tratamento com LBP. * p<0,05 vs. Controle..... 42

Figura 10. Mortalidade por necrose das células C2C12 avaliada por citometria de fluxo após 72 horas de incubação com IS. * p<0,05 vs. Controle..... 43

Figura 11. Mortalidade por necrose das células C2C12 avaliada por citometria de fluxo após 72 horas de incubação com IS e com tratamento com LBP.....	43
Figura 12. Curva padrão para ensaio de nitrito. Os valores mensurados no sobrenadante das células C2C12 não atingiram os padrões da curva.....	44
Figura 13. Imagens de células C2C12 sem estímulo (A) e estimuladas com soro de cavalo para diferenciação em miotubos. Aumento de 100X.....	46
Figura 14. Expressão de IL-6 em células C2C12 após 72 horas de incubação com IS na concentração de 236 mg/l.....	47
Figura 15. Expressão de miogenina em células C2C12 após 72 horas de incubação com IS na concentração de 236 mg/l.....	48
Figura 16. Expressão de MyoD em células C2C12 após 72 horas de incubação com IS na concentração de 236 mg/l.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. A classificação atual de solutos de retenção urêmica.....	14
Tabela 2. Grupos e condições experimentais. Todo meio DMEM utilizado nos ensaios continha SC 2 % e os mesmos parâmetros do laser.....	29
Tabela 3. Parâmetros dosimétricos do LBP.....	30
Tabela 4. Seqüência de primers específicos para os genes.....	36
Tabela 5. Atividade mitocondrial avaliada pelo ensaio do MTT. Variação da atividade mitocondrial em relação ao Controle. A análise estatística está representada nos gráficos abaixo da tabela.....	38
Tabela 6. Viabilidade celular e mortalidade avaliadas por citometria de fluxo.....	41
Tabela 7. Análise do estresse oxidativo através de citometria de fluxo.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS

AsGa – Arseno de Gálio

ATP – Adenosina trifosfato

cm² – Centímetro quadrado

CS – Célula satélite

CTE – Cadeia de transporte de elétrons

DMEM – Meio Eagle Modificado por Dulbecco

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DPPH – Determinação de atividade antioxidante

DRC – Doença renal crônica

ERO/ROS – Espécies reativas de oxigênio

EuTox – European Uremic Toxin Work Group

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

FGF-23 – Fator de crescimento fibrótico 23

FRM – Fatores regulatórios miogênicos

G - Giros

IL- 1 β – Interleucina um beta

IL – 6 – Interleucina seis

IL-8 – Interleucina oito

IS – Indoxil sulfato

J - Jaules

J/cm²– Joules por centímetro ao quadrado

l – litro

LBP – Laser de baixa potência

mg – Miligramas

ml – Mililitros

mM - Milimolar

mW - Miliwatts

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

MRF4 – Fator regulatório miogênico 4

MyoD – Proteína 1 de diferenciação miogênica

Myf5 – Fator miogênico 5

nm - nanômetro

NADPH - Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida

NO – Óxido nítrico

PI – Iodeto de propídio

PTH - Hormônio da paratireóide ou paratormônio

RNA – Ácido ribonucleico

RT – Transcrição reversa

s – Segundos

SBN – Sociedade Brasileira de Nefrologia

SC – Soro de cavalo

SFB – Soro fetal bovino

TFG – Taxa de filtração glomerular

TGF – β – Fator de transformação do crescimento beta

TNF – α – Fator de necrose tumoral alfa

W/cm² – Watts por centímetro quadrado

μ L – Microlitros

°C – Graus Celsius

RESUMO

A doença renal crônica (DRC) é caracterizada pela perda progressiva e irreversível da função renal e que frequentemente cursa com um quadro de fraqueza muscular, cujo conjunto de sinais e sintomas é globalmente designado como miopatia urêmica. Possíveis fatores predisponentes para a miopatia urêmica são as toxinas urêmicas. Dentre as toxinas urêmicas, o indoxil sulfato (IS) é uma derivada do metabolismo do triptofano presente em bactérias intestinais. Devido ao fato do tecido muscular esquelético sofrer constante remodelação graças à diferenciação de mioblastos em miotubos, é possível que toxinas urêmicas tenham um efeito deletério por influenciar este processo, agravando a miopatia urêmica. A terapia a laser de baixa potência (LBP) é considerada como um recurso bioestimulante amplamente utilizado no tratamento de doenças crônicas e tem demonstrado efeitos positivos sobre a modulação do processo de reparo muscular esquelético e também no processo da inflamação. Entretanto, no contexto de DRC, o LBP não foi ainda explorado.

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos do IS sobre a viabilidade celular, sobre o estresse oxidativo e sobre a diferenciação celular em cultura de mioblastos C2C12. Além disso, verificar a ação do LBP como forma de proteção às células.

Os mioblastos C2C12 foram cultivados em meio de cultura de DMEM, contendo 10% de soro fetal bovino e foram induzidos ao processo de diferenciação por meio da adição de 2% soro de cavalo. Três diferentes concentrações de IS foram usadas para mimetizar as concentrações plasmáticas de indivíduo normal, paciente DRC com uremia moderada e paciente DRC com uremia avançada (0,6 mg/l; 53 mg/l e 236 mg/l, respectivamente), em diferentes períodos de incubação (24 h, 48 h e 72 h). Posteriormente, as células foram submetidas ao tratamento com laser de baixa potência AsGaAl 780 nm (potência de saída de 10 mW, tempo de aplicação de 20 segundos e densidade de energia de 0,5 J/cm²). Como análise, foi utilizado o método MTT para acessar a viabilidade das células, citometria de fluxo para avaliar a viabilidade/mortalidade das células, bem como o estresse oxidativo, dosagem de nitrito para avaliar a produção de óxido nítrico e PCR em tempo real para analisar a expressão de IL-6, miogenina e MyoD (marcadores de inflamação e diferenciação celular).

Os resultados demonstram que o IS na concentração máxima foi tóxico para as células C2C12, pois diminuiu significativamente a viabilidade das células, tanto por MTT como por citometria de fluxo, aumentando a porcentagem de necrose. Este efeito foi presente nos três períodos de incubação. Com relação ao estresse oxidativo, não foi possível nenhuma conclusão, provavelmente pelo tempo das amostras, porém não descartamos a possibilidade do IS induzir este tipo de estresse. Embora o IS tenha induzido morte às células C2C12, as remanescentes não tiveram alteração dos marcadores de diferenciação celular. O tratamento com LBP sensibilizou as células ao IS, diminuindo a viabilidade das células.

Concluimos que o IS age diretamente sobre mioblastos C2C12 com efeito tóxico, podendo ser um dos responsáveis pela miopatia urêmica. O tratamento com LBP não foi eficiente na indução de proteção às células.

Palavras-chave: Miopatia urêmica, Doença renal crônica, Toxinas urêmicas, Indoxil Sulfato.

ABSTRACT

Chronic kidney disease (CKD) is characterized by progressive and irreversible loss of renal function and often progresses with a muscular weakness, whose set of signs and symptoms is generally referred to as uremic myopathy. Possible risk factors for the uremic myopathy are the uremic toxins. Among uremic toxins, indoxyl sulfate (IS) is a derivative of tryptophan metabolism by intestinal bacteria. Because skeletal muscle tissue undergoes constant remodeling due to differentiation of myoblasts in myotubes, it is possible that uremic toxins have a deleterious effect to influence this process, exacerbating the uremic myopathy. Low level laser therapy (LLLT) is regarded as a growth promoter feature widely used in the treatment of chronic diseases and has shown positive effects on the modulation of skeletal muscle repair process and also in the process of inflammation. However, in the context of CKD, the LLLT has not yet been explored.

The aim of this study was to evaluate the effects of the IS on cell viability and on oxidative stress on cellular differentiation in cultured C2C12 myoblasts. In addition, to verify the action of the LLLT as a protective alternative to the cells.

The C2C12 myoblasts were cultured in DMEM culture medium containing 10% fetal bovine serum and were induced to differentiation process by adding 2% horse serum. Three different IS concentrations were used to mimic the plasma concentrations of normal individual, CKD patients with moderate uremia and CKD patients with advanced uremia (0.6 mg/l and 53 mg/l and 236 mg/l, respectively), at different times of incubation (24 h, 48 h and 72 h). Subsequently, the cells were subjected to treatment with LLLT GaAlAs 780 nm (output power 10 mW, 20 seconds application time and energy density of 0.5 J / cm²). In terms of analysis, we used MTT method to assess the viability of the cells, flow cytometry to assess the viability/cell death and oxidative stress, nitrite dosing to evaluate nitric oxide production and real-time PCR to analyze IL-6, myogenin and MyoD expression (inflammation and cell differentiation markers). The results demonstrate that the IS at the maximum concentration was toxic to C2C12 cells, because it significantly decreased cell viability by MTT and by flow cytometry and by increasing the percentage of necrosis. This effect was present throughout the three incubation periods. With respect to oxidative stress, was not any conclusion, probably by the time the samples, but do not rule out the possibility of IS induce this type of stress. Although the IS has induced death to C2C12 cells, the remaining had no change in cell differentiation markers. Treatment with BPL the IS sensitized cells, reducing cell viability.

We conclude that the IS acts directly on C2C12 myoblasts with toxic effect and may be the one factor responsible for uremic myopathy. Treatment with LLLT was not effective in protecting the cells.

Keywords: uremic myopathy, chronic kidney disease, uremic toxins, indoxyl sulfate.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença renal crônica

A doença renal crônica (DRC) caracteriza-se pela perda progressiva da função renal por um período igual ou superior a três meses, mensurada pela taxa de filtração glomerular (TFG), e consequente acúmulo de diversos solutos que são normalmente excretados pelo sistema urinário.¹

Segundo a análise do *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES), feita entre os anos de 1999 e 2004 com adultos não institucionalizados dos EUA, com idade média de 20 anos (n = 13.233), a prevalência da DRC foi de 13% da população americana adulta.²

No Brasil, com dados coletados em 2009, acredita-se que cerca de 2,9 milhões de brasileiros teriam um terço ou menos da TFG dos indivíduos normais.³ Em 2013, o número de pacientes em tratamento dialítico ultrapassou 100.000 mil, sendo um dado expressivo se considerado o alto índice de mortalidade relacionado a DRC.³

Em termos de evolução com perda de qualidade de vida, o primeiro estágio da DRC se dá pela instalação da doença, repercutindo nas células nos tecidos do organismo. O segundo estágio seria os danos causados no organismo onde surgem os sinais e sintomas característicos da doença. O terceiro estágio é representado pela limitação funcional que afeta as atividades de vida diária, e finalmente, o último estágio, onde a incapacidade na realização das atividades funcionais é total.⁴

Os solutos ou toxinas urêmicas que não são excretados naturalmente pelo sistema urinário interagem negativamente com as funções biológicas do organismo, levando ao desenvolvimento dos diversos sinais e sintomas presentes no paciente com DRC. O conjunto dessas manifestações é denominado síndrome urêmica.⁵ Esses resíduos, nem todos identificados até o momento, são chamados de “toxinas urêmicas” ou “solutos de retenção urêmica”.⁵

As manifestações clínicas dessa síndrome são inespecíficas e podem afetar qualquer órgão ou sistema. Assim, o paciente pode desenvolver desde sintomas diretamente relacionados ao rim, como hipertensão arterial e distúrbios hidroeletrólíticos, a distúrbios endocrinológicos, neurológicos, osteoarticulares, distúrbios minerais e ósseos e musculares.⁶

Dentre as disfunções relacionadas ao sistema muscular, a miopatia urêmica é reconhecida como uma das mais incapacitantes e prevalentes no paciente com DRC.⁷

1.2 Miopatia urêmica

A miopatia urêmica é uma doença estrutural e/ou funcional dos músculos, consequente da DRC, estando associada a outros fatores. Geralmente aparece quando a TFG é inferior a 25 ml/min e sua progressão acompanha a piora da função renal. As manifestações clínicas dessa desordem costumam ser mais severas nos estágios finais da DRC e dentre os pacientes que necessitam de tratamento dialítico.^{7,8}

A redução da capacidade física e funcional ocorre devido à vasoconstrição e redução do fluxo sanguíneo muscular, com retenção de solutos e outras toxinas urêmicas dentro do músculo. Esta situação favorece a atrofia e fraqueza musculares (principalmente proximal), dificuldade na marcha, mioclonias e baixa resistência à atividade física, embora a severidade dessas manifestações seja extremamente variável.^{7,8}

As fibras musculares estriadas esqueléticas normais são classificadas como fibras de contração lenta (tipo I) e fibras de contração rápida (tipo II). As do tipo I possuem altas concentrações de enzimas oxidativas e baixas concentrações de enzimas glicolíticas e dos compostos ricos em fosfato.⁷

As fibras do tipo II de contração rápida (glicolítica-oxidativa) podem ser divididas em dois grupos: IIa que apresentam altas concentrações de enzimas oxidativas, enzimas glicolíticas e dos compostos ricos em fosfato; e as fibras IIb que apresentam baixas concentrações de enzimas oxidativas, altas concentrações de enzimas glicolíticas e dos compostos ricos em fosfato.^{7,8}

Os pacientes com DRC têm cerca de 50% da força muscular de indivíduos saudáveis.⁹ Em casos extremos, a fraqueza muscular pode comprometer inclusive a função respiratória.^{7,9}

Os mecanismos fisiopatológicos precisos que levam ao desenvolvimento da miopatia ainda não estão bem esclarecidos. Possíveis fatores predisponentes responsáveis pela disfunção muscular apontados são: anemia, miopatia por desuso, alterações do metabolismo energético, incluindo metabolismo alterado de carboidratos, diminuição da utilização de lipídeos como fonte energética, deficiência de carnitina, decréscimo do fluxo sanguíneo muscular, neuropatia periférica e toxinas urêmicas.⁸

Em um estudo com músculo isolado de rato, Harrison et al. demonstraram que toxinas urêmicas presentes no soro de pacientes renais crônicos em hemodiálise causam, agudamente, fraqueza muscular, a qual pode ser parcialmente revertida com o tratamento dialítico.¹⁰

Todavia, ainda não existem na literatura estudos que tenham investigado o efeito direto de uma toxina urêmica isoladamente sobre células musculares estriadas esqueléticas (mioblastos).

1.3 Toxinas urêmicas – indoxil sulfato

Toxinas urêmicas são compostos que exercem ação biológica e que são retidos no corpo de pacientes com insuficiência renal, enquanto que deveriam ser normalmente excretados pelos rins saudáveis.¹¹

As toxinas urêmicas podem ser subdivididas em:

- Compostos pequenos, hidrossolúveis, não ligados a proteínas;
- Compostos pequenos, lipossolúveis e/ou ligados a proteínas;
- Moléculas maiores ou também conhecidas como moléculas médias.¹²

O Grupo Europeu de Estudo em Toxinas Urêmicas (EUTox) classifica as toxinas de acordo com a retenção urêmica.¹² Estão representadas na Tabela 1.

Tabela 1. A classificação atual de solutos de retenção urêmica

Classificação	Características	Protótipo	Toxicidade
Pequenas moléculas hidrossolúveis	< 500 Da, facilmente removido	Uréia, creatinina	Não necessariamente tóxico
Moléculas grandes	> 500 Da, removidos lentamente	β 2 - M , leptina	Grande variedade
Moléculas se ligam	difíceis de remover	Fenóis, indóis	Grande variedade

As exigências para um dado composto ser considerado uma toxina urêmica são: (1) ser quimicamente identificado e medido de forma precisa, de modo que os níveis plasmáticos e/ou corporais totais devem ser mais altos do que em indivíduos não-urêmicos; (2) as altas concentrações deverão estar correlacionadas as disfunções e sintomas específicos, que desaparecem à medida que as concentrações são reduzidas - a atividade biológica desse composto deve ser comprovada em estudos *ex vivo*, *in vivo* ou *in vitro*; e (3) as concentrações experimentais dessa molécula nesses estudos devem ser compatíveis com aquelas encontradas nos fluidos corporais ou tecidos de pacientes urêmicos.^{11,13}

O indol é um composto orgânico aromático, possui uma estrutura bicíclica, que consiste em um anel benzênico acoplado a um anel de 5 membros com um nitrogênio.¹⁴ Pode ser produzido por bactérias da flora intestinal como um produto da degradação do aminoácido triptofano ou encontrado em vários vegetais. Pela sua ligação a proteínas, sua remoção na diálise fica limitada.¹²

O IS (C₈H₇NO₄S) é uma das mais bem conhecidas e estudadas toxinas urêmicas. Ela é uma toxina de baixo peso molecular (213,21 Da) metabolizada pelo fígado a partir do indol e é produzida por bactérias da flora intestinal como um metabólito do triptofano.^{12,14} O IS é normalmente excretado pelos rins, variando entre 50-70 mg/dia em pessoas saudáveis, e, na DRC, sua taxa média de excreção urinária está diretamente relacionada ao declínio da TFG, aumentando no plasma.¹⁵

Vários estudos têm mostrado um impacto do acúmulo de IS em pacientes com DRC. Concentrações aumentadas de IS competem por ligação protéica ou sua excreção com outras moléculas. O IS provavelmente medeia sua toxicidade por indução direta de uma variedade de genes envolvidos no processo inflamatório e fibrose.¹⁶

As principais vias descritas de lesão celular relacionadas ao IS são produção de citocinas inflamatórias (como TNF- α , IL-6, TGF- β), indução de estresse oxidativo e apoptose. Mais recentemente, foi também demonstrado que o IS pode causar a hipermetilação de genes, sugerindo que modificações epigenéticas induzidas por toxinas urêmicas possam ter um importante papel no mecanismo fisiopatológico da síndrome urêmica.¹⁷

Estudos experimentais têm contribuído para elucidar o papel do IS na síndrome urêmica. Já foram previamente descritos os efeitos deletérios do IS na função endotelial, proliferação de célula muscular lisa, fibrose renal e cardíaca, e função e diferenciação osteoclástica.^{18,19}

Mas apesar dos inúmeros estudos na literatura sobre os efeitos do IS, o papel dessa toxina na miopatia urêmica através da investigação dos mecanismos de lesão em mioblastos ainda não foram descritos na literatura.

1.4 Considerações gerais sobre o músculo esquelético

1.4.1 Células Satélites

O músculo estriado esquelético é responsável pela sustentação e movimentação corporal devido a sua capacidade de contração. É composto, principalmente, pelas células musculares que dão sustentação e por células nervosas com papel de inervar este tecido e garantir sua função contrátil, transformando a força em movimento. Este tecido possui alta capacidade adaptativa e regenerativa garantida pela presença de pequenas células mononucleares progenitoras musculares conhecidas como células satélites (CS).^{20,21}

As CS fazem parte de uma população de células com grande atividade mitogênica para o crescimento muscular pós-natal e estão envolvidas no reparo de fibras musculares danificadas e na manutenção do músculo esquelético adulto saudável. São mitoticamente quiescentes e não expressam marcadores de diferenciação.²²

Estão localizadas na periferia do músculo esquelético maduro, entre a lâmina basal e o sarcolema (Figura 1). Após uma lesão muscular, as CS participam diretamente do processo de reparo uma vez que, juntamente com o processo inflamatório, são ativadas e se diferenciam em mioblastos. Estes proliferam, diferenciam-se e se fundem para reestabelecerem a região danificada com novas fibras musculares funcionais.^{21,23}

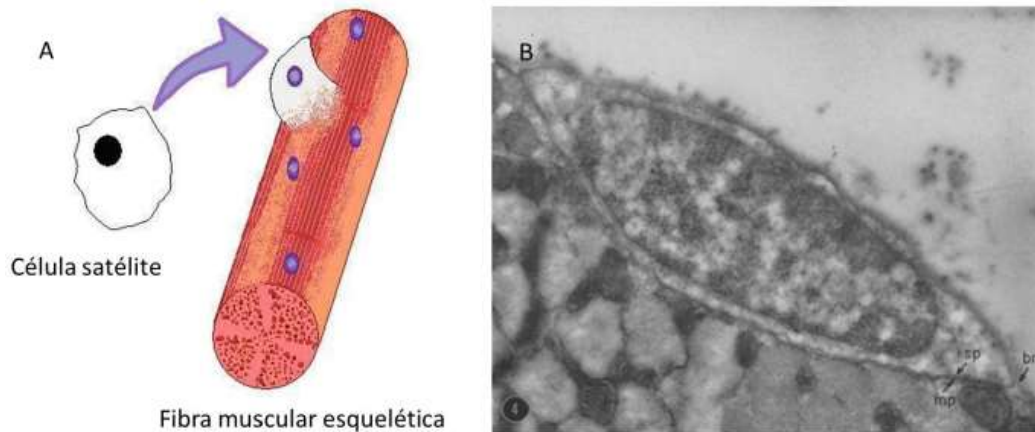


Figura 1. (A) Célula satélite. (B) ilustração da localização da célula satélite em relação à fibra muscular esquelética. Imagem através de microscopia eletrônica na primeira descrição da célula satélite documentada na literatura científica.²⁴ Sp= célula satélite; bm= membrana basal; mp= fibra muscular esquelética.

Há evidências de que as CS constituem uma população bastante heterogênea, pois algumas células podem sofrer diferenciação imediata, enquanto outras primeiramente proliferam, gerando uma célula filha para diferenciação e outra para uma futura proliferação.²⁵

Yablonka-Reuveni e River²⁶ demonstraram em um estudo recente que apenas 50% das CS que proliferam entram em fase final de diferenciação, expressando a proteína miosina do desenvolvimento.²⁶

O processo de reparo muscular com ativação das CS em resposta ao dano sofrido requer a ação coordenada de vários tipos celulares, incluindo células do infiltrado inflamatório e do tecido local.²⁷ Segundo Shin et al²⁸ o processo de reparo pode ser dividido em 4 fases sendo: amplificação da lesão, proliferação, diferenciação inicial e diferenciação terminal.²⁸ A progressão das fases acontece pela interação entre moléculas das células músculo-progenitoras e células do infiltrado inflamatório.²⁸

Durante a fase de amplificação, as citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 secretadas pelos miócitos danificados fazem o papel de recrutar mais neutrófilos, além de regular sua função proteolítica dada por enzimas e espécies reativas de oxigênio (ERO) e a ação de citocinas pró-inflamatórias, juntamente com macrófagos M1.²⁸ Neste mesmo momento, a resposta Th1 dos macrófagos também promove a proliferação dos mioblastos até a fase final da inflamação quando há predominância da população de macrófagos M2, que induzem a diferenciação e a fusão dos mioblastos para formar novas fibras musculares.²⁷

1.4.2 Miogênese

A formação do músculo esquelético, mais conhecida como miogênese, é um processo complexo que envolve a expansão de células musculares mononucleadas progenitoras ao longo da via miogênica até se tornarem mioblastos que se fundem para formar miotubos e, finalmente, desenvolvem-se em fibras do músculo esquelético maduro (Figura 2). Este processo pode ser novamente ativado após uma lesão muscular, porém as células participantes são as CS.^{29,30,31}

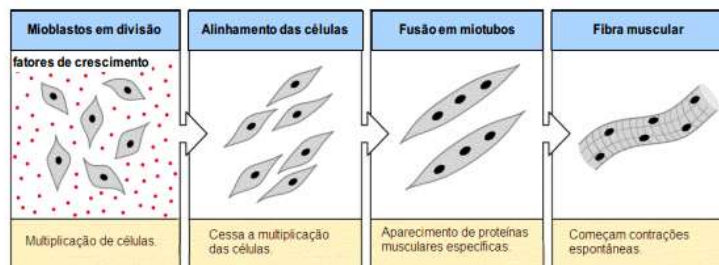


Figura 2. Modelo das etapas de desenvolvimento do músculo esquelético. Primeiramente ocorre a multiplicação celular mediada por fatores de crescimento; na ausência de fatores de crescimento, as células começam a se alinhar e cessam a multiplicação. Após esta etapa as células se fundem em miotubos e a fibra muscular finalmente se forma e apresenta contração espontânea.³²

Durante os períodos de crescimento e/ou regeneração muscular, as CS são ativadas e seus núcleos podem diferenciar-se em novos mionúcleos e incorporar-se à fibra pré-existente ou reparar lesões da fibra muscular. A morfologia das CS quiescentes difere-se das ativadas por apresentarem alta relação núcleo/citoplasma, com poucas organelas, núcleo menor quando comparado com os núcleos adjacentes da fibra muscular e aumento da heterocromatina nuclear comparada à do mionúcleo. Quando ativadas, ocorre redução da heterocromatina, aumento na relação citoplasma/núcleo e aumento no número de organelas intracelulares.³³

Nos diferentes estágios da miogênese, as células expressam distintos fatores regulatórios miogênicos envolvidos no processo de ativação, proliferação e diferenciação das CS (Figura 3), em parte, pelos fatores regulatórios miogênicos, sendo a MyoD e o *myogenic factor 5* (Myf5) relacionadas com a proliferação, e a miogenina e o *myogenic regulatory factor 4* (MRF4) com a diferenciação celular. A deficiência na proliferação e diferenciação das células satélites dificulta a regeneração e promove atrofia muscular.³⁴

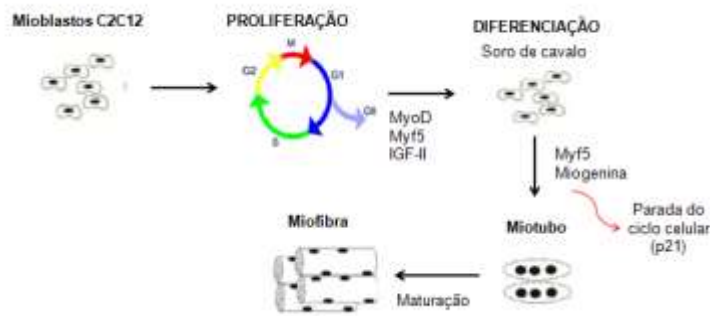


Figura 3. Esquema demonstrativo adaptado ³⁵ dos principais eventos durante a miogênese do músculo estriado esquelético. Para tanto, os mioblastos proliferam-se e são induzidos a sofrerem diferenciação em miotubos e posteriormente passam por uma fase de maturação com a formação das miofibras.

A expressão destes fatores também é regulada por moléculas de sinalização presentes na matriz extracelular, além de fatores envolvidos no contato célula-célula.³⁶

O MyoD desempenha um papel importante na ativação e proliferação dos mioblastos e controla a diferenciação de células na linhagem miogênica. As CS MyoD negativas apresentam uma capacidade de diferenciação reduzida e retardada, sendo assim um excelente marcador de CS ativadas.³⁷ É possível detectar sua expressão apenas doze horas após um traumatismo muscular, juntamente com as outras proteínas relacionadas com a diferenciação celular como a miogenina.³⁸

A miogenina tem se mostrado mais importante para a diferenciação e é um fator regulador da miogênese que se encontra expresso em CS ativadas e mioblastos.³⁹

1.4.3 Interleucina 6

Em uma lesão do músculo esquelético, as células satélites são ativadas para iniciar a proliferação e diferenciação, levando a fibras musculares a se regenerarem. As respostas inflamatórias são componentes importantes da reação do hospedeiro à uma lesão muscular e desempenham um papel crucial na regeneração muscular posterior e após a lesão. Existe um grande número de células inflamatórias infiltradas no local da lesão.⁴⁰

Múltiplos fatores, incluindo a sinalização endógena que controla a auto-ativação das CS, a proliferação e diferenciação, e a interação entre CS e o microambiente são mediados por citocinas inflamatórias, porém os mecanismos envolvidos neste controle não são completamente elucidados.⁴⁰

A interleucina-6 (IL-6) é e uma glicoproteína de peso molecular entre 22 a 27 kDa, sendo uma citocina que pode atuar na resposta imune inata como na adaptativa. É sintetizada por monócitos, células endoteliais, fibroblastos e outras células em resposta a microrganismos e também à estimulação por outras citocinas, principalmente interleucina-1 (IL-1) e a fator de necrose tumoral (TNF- α).⁴¹

É um importante marcador inflamatório, pois está envolvida em uma série de atividades imunológicas e normalmente é expressa em baixos níveis,

exceto durante um processo infeccioso, trauma ou outros fatores estressantes.⁴²

Essa interleucina é um dos importantes mediadores de indução e controle da síntese e liberação de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos durante estímulos dolorosos, que após algum tipo de lesão, as concentrações plasmáticas de IL-6 são detectáveis em 60 minutos, com pico entre 4 e 6 horas, podendo persistir por 10 dias.⁴³

1.5 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo pode ocorrer pelo excesso de produção de radicais livres e/ou pela deficiência dos mecanismos antioxidantes.^{44,45}

Radicais livres são moléculas que contenham um ou mais elétrons não emparelhados e capazes de reduzir outras moléculas fornecendo elétrons para elas. Esses radicais também podem ser gerados por outras células do organismo, induzidas por fatores externos como toxinas, drogas, produtos químicos, agentes poluidores ambientais ou em várias outras situações patológicas onde são causados danos aos diferentes componentes celulares.^{46,47}

Os efeitos do estresse oxidativo dependem da produção e das variações de espécies reativas do oxigênio (ERO), como radicais livres e peróxidos. Uma célula é normalmente capaz de superar os efeitos do estresse oxidativo se as variações no equilíbrio redox forem pequenas, restabelecendo o equilíbrio intracelular. Entretanto, se as variações forem de grande escala podem levar à morte celular, apoptose e até necrose.⁴⁸

Essas ERO ocorrem em repouso e durante a contração muscular como um subproduto da respiração mitocondrial. A fraqueza muscular resulta em uma mudança adaptativa em relação a diminuição do metabolismo oxidativo no músculo esquelético, assim como alterações na perfusão muscular devido ao deficit de oxigênio do capilar para a mitocôndria.⁴⁹

O estresse oxidativo inibe a diferenciação de miócitos, reduzindo a expressão de fatores reguladores miogénicos e proteínas sarcoméricas, promovendo atrofia muscular.⁵⁰

1.5.1 Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO, do inglês *nitric oxide*) constitui uma das menores e mais simples moléculas biossintetizadas. É um radical livre, gasoso, inorgânico, incolor, que possui sete elétrons de nitrogênio e oito de oxigênio, tendo um elétron desemparelhado.⁵¹

O NO é sintetizado a partir de L-arginina, O₂ e NADPH, pela enzima óxido nítrico síntase e é produzido no músculo esquelético em resposta à lesão e reparação. Também pode ser estimulado por componentes da parede celular bacteriana, sendo uma substância importante a ser considerada em quadros de infecções musculares.^{52,53,54}

O processo de fusão de mioblastos durante a miogênese requer a produção de NO, porém, o envolvimento desta substância na diferenciação destas células e sua influência na resposta imune específica e não-específica ainda permanecem pouco elucidados.⁵⁵

O NO possui um papel importante na função imune, regulação do tônus vascular, plasticidade neuronal e sinalização intracelular. Evidências recentes demonstraram que o NO participa da fisiologia muscular modulando os processos de vasodilatação, metabolismo e contração. A produção excessiva de NO sobre o músculo esquelético pode induzir lesão oxidativa e morte celular por apoptose, resultando em distrofia muscular, caquexia e envelhecimento.⁵⁶

1.6 Terapia com laser de baixa potência (LBP)

A palavra *laser* originou-se da abreviação de “*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*”, a qual significa “Amplificação da Luz por Emissão Estimulada por Radiação”.^{57,58} A luz laser se originou da teoria do físico Albert Einstein, que em seu artigo “Zur Quantum Theories der Strahlung” de 1917 demonstrou os princípios físicos da emissão estimulada dos lasers e os classificou em “alta potência” (com potencial destrutivo) e em “baixa potência” (sem potencial destrutivo).⁵⁹

A ação do laser consiste na absorção da luz pelos tecidos, resultando em modificações no metabolismo celular. Quando o laser é aplicado nos tecidos, a luz é absorvida por fotorreceptores localizados nas células, sendo capaz de modular as reações bioquímicas específicas dentro da célula e estimular uma série de reações em cadeia mitocondrial, resultando em síntese de ATP.^{60,61,62}

O efeito de bioestimulação pelos fótons de luz depende da combinação de parâmetros como comprimento de onda, potência, intensidade e também do tipo celular ou tecido alvo.^{63,64,65,66} Estas biomodulações são, também,

dependentes da densidade de energia entregue ao meio. Doses entre 1 e 3 J/cm² exibem um efeito anti-inflamatório e circulatório, de 2 a 4J/cm² efeito analgésico e aplicações compreendidas entre 3 e 6J/cm²apresentam efeito regenerativo. Contudo, segundo Yoo ⁶⁷, a densidade de energia a ser aplicada deve ser calculada com foco no efeito desejado.

Adicionalmente, a terapia a LBP é considerada como um recurso bioestimulante em tecidos por meio de seus efeitos biológicos, tais como analgésicos, anti-inflamatórios e cicatrizantes. Irradiação por laser de baixa potência são amplamente utilizados no tratamento de doenças crônicas e também como terapia de reabilitação.⁵⁸

A fototerapia tem demonstrado efeitos positivos sobre a modulação do processo de reparo muscular esquelético e, também, no processo da inflamação, especificamente sobre as CS. Diversos comprimentos de onda são pesquisados, mas os principais se encontram na porção óptica do espectro iniciando com o vermelho até o infravermelho (400 nm a 1 mm).^{54,55} O laser infravermelho pode ser usado *in vitro* para estimular a função celular por promover um aumento no número de células e estimular a síntese de RNA, causando também a diferenciação das células.^{68,69}

Ferreira et al ⁶² e Mesquita-Ferrari et al ⁶⁶ avaliaram o efeito do LBP nos comprimentos de onda de 660 nm e 780 nm utilizando diversos parâmetros e não evidenciaram alteração da proliferação de mioblastos da linhagem C2C12, cultivados sem a indução de diferenciação. Estudos ainda têm mostrado que este recurso é capaz de influenciar a proliferação de fibroblastos ⁷⁰, osteoblastos ⁶⁵ e células epiteliais.⁷¹

2. OBJETIVOS

O objetivo central do presente estudo foi analisar o efeito do IS sobre células C2C12, a fim de verificar um possível efeito tóxico do IS sobre estas células, propondo um possível mecanismo envolvido na miopatia de pacientes com DRC. Adicionalmente, analisar o possível efeito protetor do LBP sobre estas células.

Mais especificamente, os objetivos foram:

- Avaliar o efeito do IS sobre a atividade celular e a viabilidade das células C2C12 irradiadas ou não com LBP;
- Avaliar o efeito do IS sobre o estresse oxidativo em células C2C12 irradiadas ou não com LBP;
- Avaliar o efeito do IS sobre a expressão gênica da citocina pró-inflamatórias IL-6 pelas células C2C12;
- Avaliar o efeito do IS sobre a diferenciação das células C2C12 utilizando como marcadores os fatores regulatórios miogênicos (miogenina e MyoD).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado no laboratório de cultivo celular da Universidade Nove de Julho (UNINOVE) e os ensaios de Citometria de Fluxo foram realizados no laboratório de Nefrologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

3.1 Células musculares esqueléticas (C2C12)

Os mioblastos utilizados foram da linhagem C2C12 (células satélites de camundongo) ATCC CRL-1772™, gentilmente doadas pelo professor José Ernesto Belizário, do Instituto de Ciências Biomédicas – USP/SP. As células foram cultivadas no meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Vitrocell Embriolife, Campinas, SP, Brasil) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) (Vitrocell Embriolife, Campinas, SP, Brasil).

3.2 Indoxil sulfato (IS)

O IS, classificado como toxina urêmica pelo EUTox, foi adquirido comercialmente (3-IS, Sal Potássico, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), sendo mantido refrigerado a - 20°C até o momento de sua diluição, preparada no momento de sua utilização. A pesagem e a diluição da solução mãe a 5.000 µM ou (1,26 mg/ml) foram feitas no momento dos experimentos.

Foram pesados 22,68 mg de IS e depois dissolvidos em 18ml de DMEM estéril. Após a diluição da solução mãe, eram feitas as diluições para atingir os valores referentes a IS 0,6 mg/l (2,3 µM), IS 53 mg/l (210,5 µM) e IS 236 mg/l (939,1 µM).

3.3 Cultivo Celular

Os mioblastos foram mantidos em estufa (HEPA Class 3110, Thermo Electron Corporation, Marietta, OH, EUA) a 37°C, numa atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. A monitorização do crescimento celular foi feita a cada 24 horas, utilizando-se microscópio invertido de fase (Eclipse TE 2000U, Nikon, Melville, NY, EUA).

O subcultivo foi realizado quando a monocamada celular tornava-se subconfluente para a perpetuação da linhagem celular, sempre em fluxo laminar (Linha 400, Pachane, Piracicaba, SP, Brasil). Para tanto, o sobrenadante foi removido, as células lavadas com tampão PBS1X (NaCl 140mM; KCl 2,5mM; Na₂HPO₄ 8mM; KH₂PO₄ 1,4mM; pH 7.4) e tratadas com solução de tripsina 0,25% durante 4 minutos a 37°C. Após incubação, foi realizada nova lavagem com meio, centrifugação a 1.200 rpm (aproximadamente 300 g) a 20°C por 5 minutos (Centrífuga Excelsa 4-280R, Fanem, São Paulo, SP, Brasil) e posteriormente ressuspensão em 1ml de meio DMEM. A viabilidade das células foi avaliada por contagem com corante vital azul de Trypan (0,4%), sendo consideradas para os ensaios as culturas com viabilidade maior que 95%.

Os mioblastos foram avaliados na condição de indução de diferenciação pela adição de 2% soro de cavalo (SC) em meio de cultura DMEM (Vitrocell Embriolife, Campinas, SP, Brasil), conforme estudos prévios.^{31,72}

Todos os experimentos foram realizados com as C2C12 estimuladas com soro de cavalo 2%.

3.4 Condições de tratamento

As culturas de mioblastos C2C12 foram tratadas com o IS na concentração basal de 0,6 mg/L 2,3 μ M (semelhante a encontrada em indivíduos não urêmicos), na concentração de 53 mg/L 210,5 μ M (semelhante a urêmica moderada) e na concentração de 236 mg/L 939,1 μ M (semelhante a urêmica máxima descrita). Como protocolo, as células foram cultivadas e submetidas de acordo com as condições apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Grupos e condições experimentais. Todo meio DMEM utilizado nos ensaios continha SC 2 % e os mesmos parâmetros do laser.

GRUPOS	CONDIÇÕES
Controle	DMEM sem IS + SC 2%
IS 0,6	DMEM + IS 0,6 mg/l + SC 2%
IS 53	DMEM + IS 53 mg/l + SC 2%
IS 236	DMEM + IS 236 mg/l + SC 2%
Controle + LBP	DMEM sem IS + LBP+ SC 2%
IS 0,6 + LBP	DMEM + IS 0,6 mg/l + SC 2% + LBP
IS 53 + LBP	DMEM + IS 53 mg/l + SC 2% + LBP
IS 236 + LBP	DMEM + IS 236 mg/l + SC 2% + LBP

3.5 Irradiação com laser de baixa potência (LBP)

Utilizou-se o laser com meio ativo de arseneto de gálio e alumínio (AsGaAl), da marca DMC®, modelo Twin Laser com os parâmetros descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Parâmetros dosimétricos do LBP.

Meio ativo	AsGaAl
Comprimento de onda (nm)	780
Densidade de energia (J/cm ²)	5
Energia total (J)	3.57
Potência (mW)	10
Densidade de Potência (W/cm ²)	0.357
Área do feixe/Área irradiada (cm ²)	0,028
Modo de aplicação	Pontual
Tempo de irradiação (s)	20

3.6 Ensaio de atividade mitocondrial por MTT

Para determinar a atividade mitocondrial, utilizou-se a avaliação através do ensaio do MTT, uma técnica indireta baseada na análise colorimétrica da habilidade da enzima mitocondrial succinato desidrogenase (encontrada somente em células viáveis). Ao clivar enzimaticamente os anéis de tetrazólio do MTT, formam-se cristais azuis escuros de formazana, os quais são impermeáveis às membranas celulares, ficando, então, retidos no interior das células viáveis.^{73,74} A posterior lise celular faz com que estes sais de formazana sejam liberados. O número de células viáveis é diretamente proporcional a concentração de cristais de azul de formazana formados.

Para os ensaios, após o tratamento com o IS, os mioblastos foram semeados em placas de cultura de fundo chato de 96 poços (TPP) (1X10⁴/poço), mantidos em DMEM suplementado com 2% de soro de cavalo.

A atividade mitocondrial foi avaliada após 24 horas, 48 horas e 72 horas (n=6). Os tempos foram escolhidos na tentativa de mimetizar os períodos em que os pacientes realizam a diálise. Após o período de cultivo, foi realizada a lavagem dos poços com 200µL de PBS 1X. Em seguida, foram adicionados 50µL de MTT (0,5µg/mL em tampão) (3-[4,5-Dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue – SIGMA) e realizada uma incubação de 3h a 37°C em estufa de CO₂.

Terminado o tempo de incubação, esta solução foi removida cuidadosamente e foram adicionados 100µL de Isopropanol para ressuspender e solubilizar o precipitado. Por fim, foi realizada a leitura da absorbância a 620 nm com auxílio de um leitor de placas (Anthos 2020, Eugendorf, Austria).

Todos os experimentos foram repetidos seis vezes, de forma independente. Cada amostra foi feita em triplicata. Os resultados estão apresentados na forma de porcentagem em relação ao controle.

3.7 Ensaio de necrose por Citometria de Fluxo (PI)

O marcador nuclear fluorescente iodeto de propídio (PI) é utilizado para distinguir células apoptóticas de células necróticas. O iodeto de propídio é uma molécula que se intercala no DNA celular, desde que a membrana celular esteja permeável. Tal propriedade deve-se ao fato de que marcadores de DNA de elevado peso molecular, como o PI, não são passíveis de penetrar na célula intacta em decorrência do seu tamanho, bem como não marcam células apoptóticas sem que estas apresentem alterações na permeabilidade da membrana plasmática, como ocorre nos estágios finais da apoptose.

Os tubos com 1×10^6 células estimuladas ou não com IS e tratadas ou

não com LBP foram centrifugados por 10 minutos, a 300 g e com a temperatura de 10°C. O sobrenadante foi desprezado e as células ressuspensas em 100 µL de EDTA 3 mM (Sigma, St. Louis, MO, USA), acrescidos de 20 µl de iodeto de propídeo (PI) na concentração de 8µg/ml (diluído 6X). A mistura foi posteriormente incubada por 20 minutos em ambiente escuro. Em seguida, foi adicionado a cada tubo 300 µl de EDTA 3 mM para parar a reação e leitura no citômetro de fluxo.

A detecção de necrose foi realizada em Citômetro de Fluxo BD. Facscanto, através do *software* Facs Diva; da mesma forma foram adquiridos 10.000 eventos para cada ensaio. Foi analisado histogramas onde a intensidade de iluminescência foram expressas através da média geométrica de intensidade de fluorescência em FL-1 para todos os tubos estimulados e não estimulados (por IS) e tratados e não tratados (por laser de baixa potência).

3.8 Determinação da produção de nitrito como avaliação indireta de NO

A produção de óxido nítrico foi determinada por meio da mensuração de nitritos nos sobrenadantes das culturas celulares segundo o ensaio de DING et al.⁷⁵ Brevemente, alíquotas de 50 µl do sobrenadante das culturas foram incubadas com igual volume de reagente de Griess (1% de sulfanilamida, 0,1% de dihidroclorato de N-1-naftilenodiamina e 2,5% de ácido orto-fosfórico) à temperatura ambiente por 10 minutos.

A absorbância foi determinada em um leitor de ELISA, com filtro de 540nm, contra branco constituído por meio de cultura e reagente de Griess volume a volume. Os resultados foram expressos em µM de NO₂⁻ com base em

curva padrão com concentrações conhecidas de nitrito de sódio (NaNO₂) em meio de cultura.

3.9 Avaliação de estresse oxidativo por DCFH

O metabolismo oxidativo foi estudado através da produção das espécies reativas de oxigênio (ERO). Para isso, utilizamos o reagente 2', 7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA, Sigma, St. Louis, MO, USA). Esse reagente possui a propriedade de penetrar rapidamente nas células por difusão. Uma vez no espaço intracelular, reage com ERO gerado pelo metabolismo oxidativo intracelular formando o DCFH (2', 7'-diclorofluoresceína), que é um componente fluorescente e impermeável à membrana celular. No citômetro de fluxo, a luz emitida por esse composto é captada pelo canal de fluorescência respectivo ao comprimento de onda de 525 a 550 nm. Nos ensaios, foram medidas a produção de ERO espontânea (sem estímulo) e após estímulo (doses de IS) e com ou sem tratamento (LBP).

Os tubos com 5x10⁵ cel/mL foram incubados por 30 minutos com DCFH a 0,3 mM, em banho-maria com agitação à 37°C. Em seguida foi adicionado a cada tubo, 1 mL de EDTA 3 mM (Sigma, St. Louis, MO, USA) para parar a reação. Os tubos foram centrifugados novamente, por 10 minutos, a 500 g e com a temperatura de 4°C. O sobrenadante foi desprezado e as células ressuspendidas em 500 µL de EDTA EDTA 3 mM e levado para leitura no citômetro de fluxo.

A detecção de ERO foi realizada em Citômetro de Fluxo BD. Facscanto, através do *software* Facs Diva; da mesma forma foram adquiridos 10.000 eventos após a construção de histogramas onde a produção de ERO foram

medidas através da média geométrica de intensidade de fluorescência em FL-1 para todos os tubos estimulados (por IS) e tratados (por laser de baixa potência).

3.10 Análise da expressão gênica de IL – 6, miogenina e MyoD por PCR em tempo real

Para estas expressões, as células C2C12 foram cultivadas em placas de 6 wells (TPP, Nova Iorque, EUA). Após confluência de 70 %, as células foram estimuladas com soro de cavalo 2 %, sendo que metade recebeu IS na concentração de 236 mg/l. Após 72 horas de incubação, foram encaminhadas para extração de RNA.

3.10.1 Extração de RNA total

RNA total foi extraído das células em cultura utilizando-se o kit Paris (Invitrogen, Califórnia, EUA), seguindo-se o protocolo sugerido pelo fabricante. A quantificação do RNA foi feita em espectrofotômetro (NanoDrop, Thermo Scientific, EUA), medindo-se a densidade óptica nos comprimentos de onda 260 e 280 nm. Foi feito o cálculo da concentração de RNA, expresso em $\mu\text{g/mL}$, a partir da absorvância à 260nm. A leitura de 1 OD corresponde a uma solução pura de RNA em fita-simples na concentração de 40 $\mu\text{g/mL}$. A leitura a 280 nm foi utilizada para determinar a contaminação das amostras com proteínas. A análise foi feita baseando-se na razão entre as absorvâncias a 260 e 280nm e o valor aceitável foi de 1,7 a 2,0.

Qualquer resíduo de DNA contaminante foi removido através DNase I (Invitrogen), na concentração de 1uni/ μg RNA na presença de 20 mM Tris-HCl,

pH 8.4, contendo 2 mM MgCl₂ por 15 minutos a 37 °C, seguido de incubação a 95°C durante 5 minutos para inativação da enzima. Logo após a quantificação, serão realizadas as reações de transcrição reversa (RT), para a síntese do cDNA.

3.10.2 Síntese de cDNA

Todos reagentes utilizados para a reação de síntese do DNA complementar (cDNA) foram da marca Promega (Promega, San Luis Obispo, EUA). Um microlitro de oligo dT primer (500µg/ml) foi misturado com 11 µl de uma solução de RNA a 0,1 µg/µl. Esta solução foi aquecida a 70°C por 10 minutos e resfriada em gelo por 5 minutos. Em seguida, foi acrescentado 4µl de tampão [5X] (Tris-HCl 250 mM pH=8,3, cloreto de potássio 375 mM, cloreto de magnésio 15 mM) , 2µl de DTT 0,1M, 1 µl de dNTP Mix (10mM de dATP, dGTP, dCTP e dTTP) e 1µl (200u) da enzima transcriptase reversa M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus). A reação foi realizada a 42°C por 50 minutos, passando posteriormente por um período de 15 minutos a 70°C para a inativação da enzima.

O cDNA foi mantido em freezer a -20°C até a realização da reação em cadeia da polimerase (PCR).

3.10.3 PCR em tempo Real - qPCR

Para a qPCR foi utilizado o fluoróforo SYBR Green (Applied Biosystems, Foster City, CA). A reação foi montada da seguinte maneira: a 1,0 µl de cDNA, foram adicionados 0,5 µl de primer 1 (10 µM), 0,5 µl de primer 2 (10µM), 10 µl de Master Mix 2X (Applied Biosystems) e água suficiente para

20 µl de reação. As condições dos ciclos térmicos foram: 95 ° C durante 10 minutos, seguido por 40 ciclos a 95 ° C durante 15 s e 60 ° C durante 1 minuto. O equipamento utilizado foi o 7500™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Califórnia EUA). As análises foram realizadas em triplicata para cada ponto de dados. O mRNA dos genes alvo foram quantificados como um valor relativo em comparação com uma referência interna, beta-actina (housekeeping). Os primers utilizados são apresentados na tabela 4.

Tabela 4. Seqüência de primers específicos para os genes relacionados.

Gene alvo	Primer forward (5'-3')	Primer reverse (5'-3')
MyoD	GGA GAC ATC CTC AAG CGA TGC	GGA GAC ATC CTC AAG CGA TGC
Miogenina	ACT ACC CAC CGT CCA TTC AC	TCG GGG CAC TCA CTG TCT CT
IL-6	ACTTACAAGTCGGAGGCTT	TGCAAGTGCATCATCGTTGT

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram expressos em média e erro padrão. Os dados foram analisados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA), com pós-teste Newman-Keuls, para verificar diferenças entre mais de dois grupos estudados, ou test T-student (paramétrico) ou Mann – Whitney (não paramétrico) para comparação entre dois grupos. A significância de $p < 0,05$ foi adotada.

5. RESULTADOS

5.1 Análise da atividade mitocondrial por MTT

A atividade mitocondrial das células C2C12 foi avaliada através do ensaio MTT, a fim de analisarmos de maneira indireta a viabilidade dessas células após incubação com IS e tratamento com LBP. Para tanto, as células C2C12 foram incubadas com 3 diferentes concentrações de IS, sendo avaliadas em 3 períodos diferentes (24, 48 e 72 horas). Os resultados estão apresentados na forma de tabela (Tabela 5) e na forma de gráficos (Figuras 4, 5 e 6).

Como demonstrado na Tabela 5 e nas Figuras 4, 5 e 6, a concentração de 236 mg/l reduziu significativamente a atividade mitocondrial das células C2C12, em todos os períodos analisados, sugerindo uma redução significativa na viabilidade celular. As concentrações de 0,6 mg/l e 53 mg/l não foram tóxicas para as células.

O tratamento das células C2C12 com LBP não preveniu a toxicidade do IS. Vale a pena salientar que houve uma redução significativa da atividade mitocondrial com a concentração de IS de 53 mg/l em 24 horas quando associado ao LBP (Figura 4).

Tabela 5. Atividade mitocondrial avaliada pelo ensaio do MTT. Variação da atividade mitocondrial em relação ao Controle. A análise estatística está representada nos gráficos abaixo da tabela ($p < 0,05$).

	24 h	48 h	72 h
Controle	100,0 ± 1,5 %	100,0 ± 1,2 %	100,0 ± 8,0 %
IS 0,6	101,0 ± 2,8 %	98,2 ± 4,8 %	92,1 ± 7,0 %
IS 53	100,9 ± 2,9 %	93,5 ± 8,2 %	94,6 ± 10,1 %
IS 236	84,4 ± 4,7 %	67,9 ± 7,9 %	63,6 ± 9,7 %
Controle + LBP	88,9 ± 13,3 %	93,9 ± 9,5 %	100,4 ± 9,2 %
IS 0,6 + LBP	91,5 ± 8,2 %	93,8 ± 6,5 %	91,8 ± 10,2 %
IS 53 + LBP	80,2 ± 5,2 %	83,5 ± 5,9 %	73,0 ± 9,5 %
IS 236 + LBP	78,1 ± 4,7 %	65,6 ± 7,1 %	66,4 ± 10,1 %

Atividade Mitocondrial -

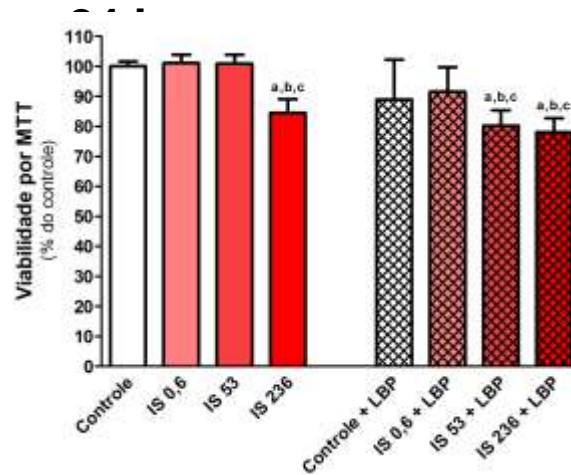


Figura 4. Viabilidade das células C2C12 após 24 horas de incubação, avaliada através da atividade

Atividade Mitocondrial -

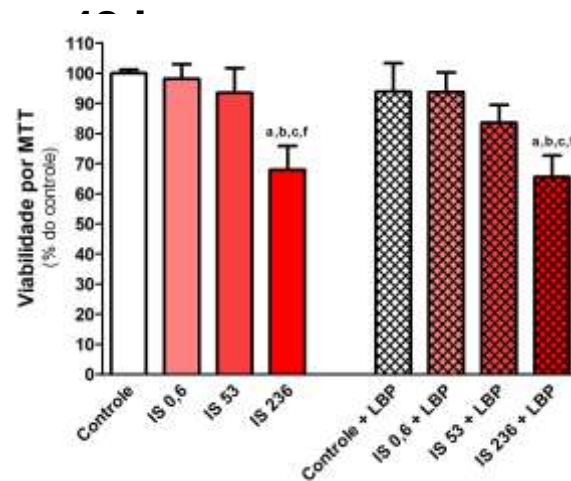


Figura 5. Viabilidade das células C2C12 após 48 horas de incubação, avaliada através da atividade

Atividade Mitocondrial -

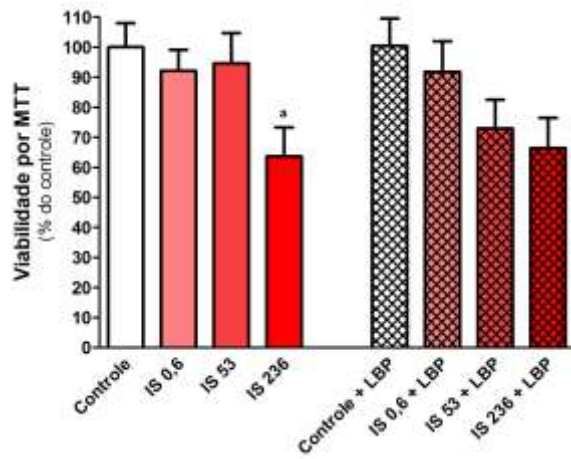


Figura 6. Viabilidade das células C2C12 após 72 horas de incubação, avaliada através da atividade

5.2 Viabilidade celular e necrose analisadas por citometria de fluxo

A viabilidade celular e a necrose foram avaliadas através do ensaio por citometria de fluxo, onde células não-viáveis em estágio necrótico são marcadas por PI. As células C2C12 foram incubadas com a concentração máxima de IS (236 mg/l) no período de 72 horas, pois os testes de MTT já haviam demonstrado toxicidade com essa concentração de IS.

Conforme demonstrado na Tabela 6 e nas Figuras 8, 9, 10 e 11, o IS na concentração de 236 mg/l diminuiu a viabilidade das células C2C12 após 72 horas, aumentando significativamente a mortalidade. O tratamento das células com LBP intensificou a perda de viabilidade e o aumento da mortalidade.

Tabela 6. Viabilidade celular e mortalidade avaliadas por citometria de fluxo na concentração de IS 236 mg/l no período de 72 horas.

	Viabilidade celular	Mortalidade por necrose
Controle	97,7 ± 0,4 %	7,9 ± 0,4 %
Controle + LBP	*90,8 ± 1,0 %	*8,9 ± 1,0 %
IS 236	88,9 ± 1,4 %	11,6 ± 0,8 %
IS 236 + LBP	*85,9 ± 2,9 %	*13,2 ± 2,7 %

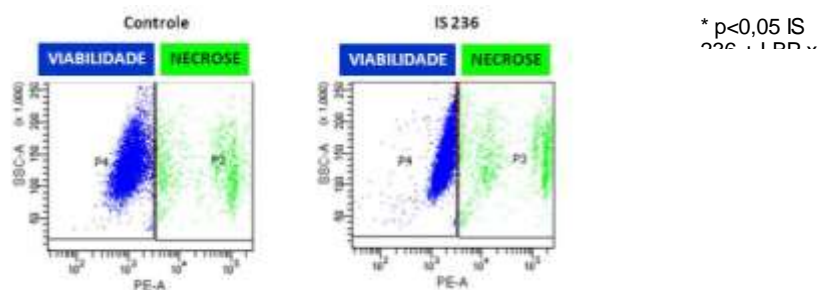


Figura 7. Representação dos resultados de

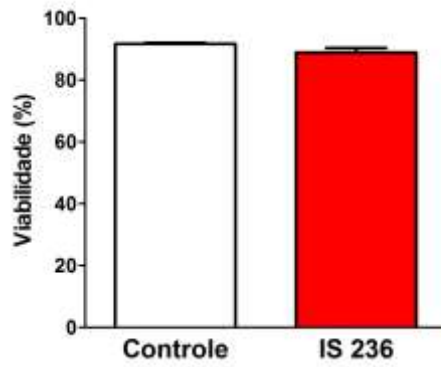


Figura 8. Viabilidade das células C2C12 avaliada

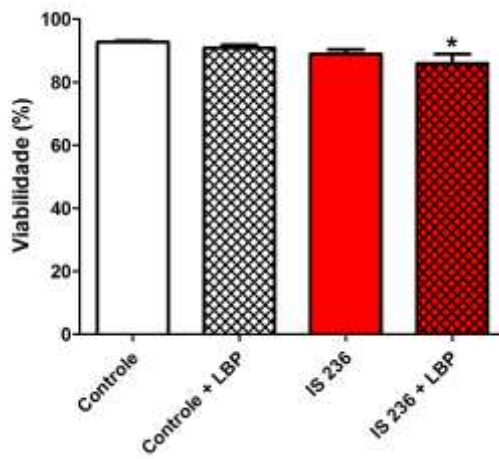


Figura 9. Viabilidade das células C2C12 avaliada

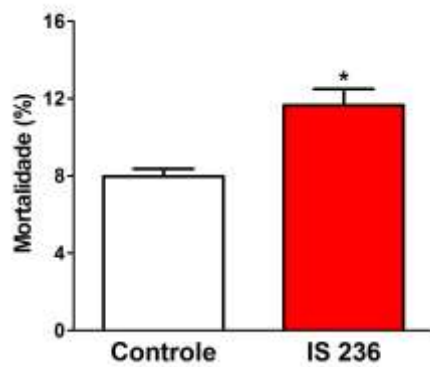


Figura 10. Mortalidade por necrose das células

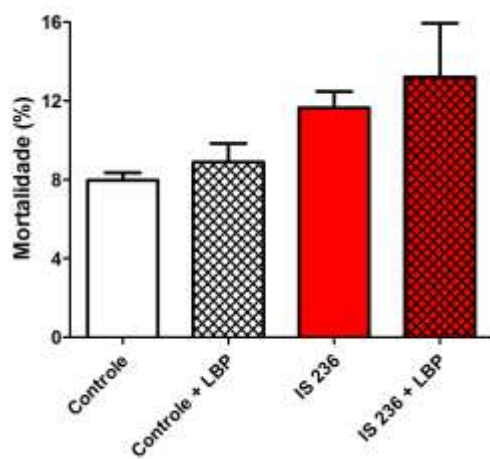


Figura 11. Mortalidade por necrose das células

5.3 Análise do estresse oxidativo: mensuração de nitrito pelo método de Griess e citometria de fluxo

Para avaliarmos o estresse oxidativo das células C2C12 incubadas com IS, foi realizada a técnica de Griess, que visa mensurar o nitrito contido nas amostras nos tempos de 24 e 72 horas, refletindo a quantidade de óxido nítrico presente no fluido. Nesta etapa, não obtivemos sucesso. Os níveis baixos de nitrito nos sobrenadantes não permitiram a detecção adequada pelo espectrofotômetro, mesmo a curva padrão apresentando-se com boa qualidade (Figura 12).



Figura 12. Curva padrão para ensaio de nitrito. Os valores mensurados no sobrenadante das

Como não obtivemos resultados a partir do método de Griess, tentamos avaliar o estresse oxidativo através de citometria de fluxo.

Infelizmente, de três experimentos que foram realizados com as células C2C12, apenas um forneceu resultados interessantes com 72 horas de

incubação (Tabela 7). Novos experimentos serão realizados para esclarecer o possível papel do IS na indução de estresse oxidativo nas células C2C12.

Tabela 7. Análise do estresse oxidativo através de citometria de fluxo (n=1).

	72 h
Controle	1,4 %
IS 0,6	3,4 %
IS 53	4,0 %
IS 236	13,1 %
Controle + LBP	2,3 %
IS 0,6 + LBP	3,2 %
IS 53 + LBP	5,5 %
IS 236 + LBP	15,0 %

5.4 Avaliação sobre a diferenciação

5.4.1 Cultura de células C2C12

A Figura 13 (A) ilustra a cultura de células C2C12 com soro fetal bovino 10%, onde podemos observar uma subconfluência de aproximadamente 70%. A Figura 13 (B) representa a cultura de células C2C12 após indução dos mioblastos em miotubos, utilizando o soro de cavalo a 2%. As células adquiriram aspecto mais alongado e fusiforme.

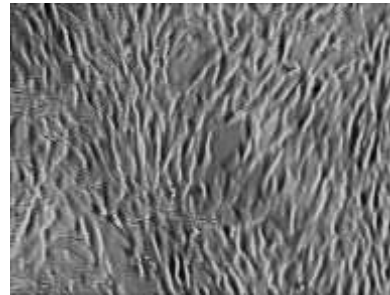
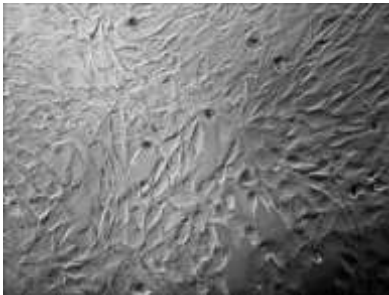


Figura 13. Imagens de células C2C12 sem estímulo

(A) e (B) estimuladas com soro de cavalo para

5.4.2 Expressão de IL-6

Para analisar o efeito do IS sobre a expressão de IL-6, foi realizada PCR em tempo real. Como demonstrado na Figura 14, embora tenha havido uma diminuição da expressão de IL-6 (n=3) com a incubação com IS, não houve diferença significativa. A expressão relativa de IL-6 no Controle foi de $1,00 \pm 0,29$ e no IS 236 foi de $0,13 \pm 0,50$.

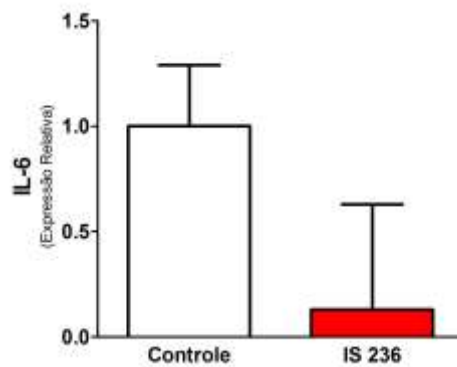


Figura 14. Expressão de IL-6 em células C2C12 após 72 horas de incubação com IS no

5.4.3 Expressão de miogenina e fator indutor de diferenciação miogênica (MyoD)

Para analisar o efeito do IS sobre a diferenciação das células C2C12 em miotubos, o presente estudo verificou a expressão de miogenina e MyoD. As células C2C12 foram incubadas (n=3) com soro de cavalo 2 % para a indução da diferenciação e receberam IS na concentração de 236 mg/l. Conforme demonstrado nas Figuras 15 e 16, não houve alteração da expressão destes fatores indutores de miogênese com tratamento com IS após 72 horas. A expressão relativa para miogenina foi $1,00 \pm 0,46$ no Controle e $1,07 \pm 0,37$ no IS 236 e a expressão relativa para MyoD foi $1,00 \pm 0,21$ no Controle e $0,76 \pm 0,33$ no IS 236.

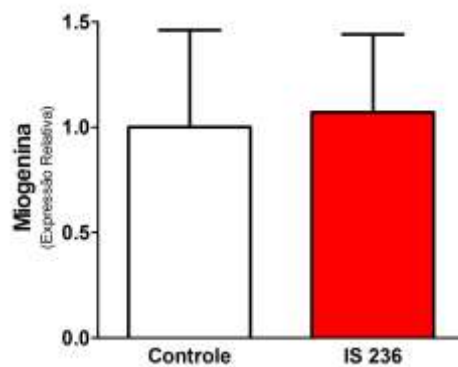


Figura 15. Expressão de miogenina em células

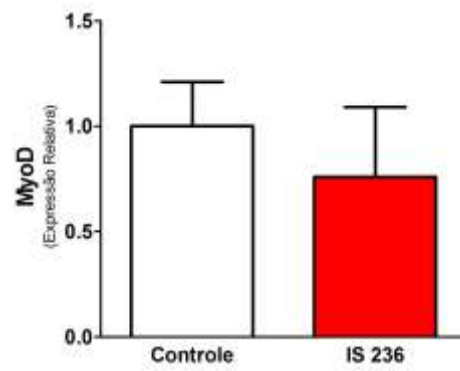


Figura 16. Expressão de MyoD em células C2C12

6. DISCUSSÃO

A miopatia urêmica é uma das muitas complicações crônicas do paciente com DRC. Acredita-se que seja resultado de múltiplos fatores associados, porém a ideia de que as toxinas urêmicas podem exercer um papel fundamental na fisiopatologia deste distúrbio é plausível. Neste contexto, o IS, uma das mais bem conhecidas toxinas urêmicas, pode exercer um papel importante na miopatia urêmica. Neste sentido, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito direto do IS sobre mioblastos C2C12 a fim de verificar um possível efeito tóxico sobre estas células.

Os mioblastos C2C12 são importantes representantes de células satélites com capacidade mitótica e de diferenciação em miotubos, garantindo uma renovação do tecido muscular esquelético. Se toxinas urêmicas forem tóxicas para este tipo celular, é provável que esta manutenção do tecido muscular esquelético seja comprometida, o que levaria a uma diminuição da massa muscular esquelética, bem como da atividade funcional deste tecido. Um indivíduo perde massa muscular devido ao envelhecimento, por conta de doença (miopatia), ou pela inatividade física. Além da redução da massa muscular, a redução da capacidade física e funcional ocorre devido à vasoconstrição e redução do fluxo sanguíneo muscular, com retenção de solutos e toxinas como o IS dentro do músculo, resultando na diminuição da tolerância ao exercício, ao sedentarismo e conseqüentemente na redução das atividades da vida diária.^{76,77}

No estudo foram utilizadas três concentrações diferentes de IS, na tentativa de mimetizar as condições de normalidade, de DRC moderada e de DRC avançada. Vale salientar que essas concentrações tornam-se

extrapoladas, pois correspondem a IS na forma livre, sem fração ligada à albumina como ocorre no plasma dos pacientes com DRC. O IS é uma toxina ligada a albumina sérica, dificultando sua passagem através dos capilares sanguíneos. A intenção do presente estudo foi avaliar a forma livre do IS.

Nossos resultados demonstraram que o IS na concentração de 236 mg/l foi tóxico para as células C2C12, pois houve uma diminuição significativa da atividade mitocondrial, avaliada pelo MTT, representando uma perda da viabilidade celular. Esta perda deve à diminuição do número de células após incubação com IS, fato confirmado pela citometria de fluxo que acusou aumento da porcentagem de células necróticas com a incubação com IS. Fala-se de morte celular quando as suas funções orgânicas e processos do metabolismo cessam. A necrose ocorre devido lesão celular irreversível na membrana celular ou inabilidade de restaurar a função mitocondrial, geralmente causada por agentes químicos tóxicos ou resposta imunológica danosa e deve ser diferenciada da apoptose que é a morte celular natural e programada pela natureza, não seguida de autólise que serve ao equilíbrio do organismo.

Os mecanismos pelos quais o IS torna-se tóxico para as células não foram completamente elucidados, porém acredita-se que estejam relacionados ao aumento de citocinas pró-inflamatórias e ao aumento do estresse oxidativo.⁷⁸ Kim e colaboradores demonstraram que o IS quando adicionado à cultura de osteoblastos induziu a produção de espécies reativas do oxigênio e de citocinas pró-inflamatórias, tendo um efeito deletério para este tipo celular.⁷⁹ Por este motivo, uma das nossas propostas do presente estudo foi avaliar o

estresse oxidativo das células C2C12 após incubação com IS, bem como a expressão de IL-6.

Nas análises de estresse oxidativo, tanto nos ensaios de ERO (citometria de fluxo) como de síntese de NO (reagente de Griess), não expressaram valores mensuráveis para avaliação. Apenas um experimento foi realizado com sucesso e aponta para um aumento de estresse oxidativo quando o IS está presente. Nossa proposta era demonstrar um possível mecanismo do IS em induzir morte celular. Experimentos serão realizados para demonstrar esse efeito. Com relação à expressão de IL-6, não houve alteração da expressão com a adição de IS na concentração máxima, analisada por PCR em tempo real.

Além do efeito citotóxico direto do IS sobre as células C2C12, o estudo teve como objetivo verificar se o IS poderia ter efeito sobre a diferenciação das células C2C12 remanescentes em miotubos. Por esse motivo, utilizamos PCR em tempo real para analisarmos a expressão de miogenina e MyoD, fatores fundamentais e que servem como marcadores da diferenciação. Nossos resultados demonstram que o IS na concentração máxima não influenciou a expressão destes marcadores, demonstrando que o IS não influencia a diferenciação destas células. Apesar de possuir um efeito tóxico sobre as células, não interferiu no processo de diferenciação em miotubos.

Embora o IS tenha sido tóxico somente na dose máxima, devemos levar em consideração que no paciente há muitas outras condições lesivas, além de muitas outras toxinas urêmicas que podem agir em sinergismo ao IS na indução de toxicidade.

A literatura tem sugerido que a terapia com LBP é uma alternativa eficaz para o tratamento de doenças crônicas e também como terapia de reabilitação devido aos efeitos analgésicos, anti-inflamatórios e cicatrizantes.⁵⁶

Segundo Szymanska *et al*⁸⁰, a radiação com LBP pode influenciar as células através da absorção da energia emitida pelos fotorreceptores localizados no interior das células. Sugere-se que, dentre tais fotorreceptores, as mitocôndrias, que fornecem energia para as células, contém uma série de enzimas que participam nas reações redox da cadeia respiratória, tornando-se o principal mecanismo das reações metabólicas ocorridas em uma célula, além do citocromo c oxidase e superóxido dismutase- NADH, que demonstraram alteração após emissão de fótons, alterando o nível de oxidação e alterando a fluência dos elétrons de uma molécula, capazes de aumentar a síntese de DNA e RNA.^{80,81}

No entanto, os resultados evidenciam que o tratamento dessas células com o LBP em curto prazo não alterou a atividade mitocondrial, estresse oxidativo, quando comparadas às células que não receberam tratamento.

Nos resultados de viabilidade celular e necrose o LBP apresentou um efeito deletério aumentando a mortalidade e diminuição da viabilidade celular.

A dose do laser escolhida foi baseada na literatura mostrando, em cultura celular, um efeito benéfico do laser vermelho em doses baixas como a utilizada de 5 J/cm², mas não demonstraram eficácia na proteção e nem na reversão dos quadros contra a toxina IS e aparentemente teve um efeito ruim induzindo a morte celular por necrose.

Ferreira *et al*⁶⁰ e Mesquita-Ferrari *et al*⁶⁴ avaliaram o efeito do LBP no comprimento de onda de 780 nm utilizando outros parâmetros e não

evidenciaram alteração da proliferação de mioblastos da linhagem C2C12, cultivados sem a indução de diferenciação. Pode ser um dos fatores contribuintes para os resultados a indução de diferenciação associada a uma toxina.

Efeitos biológicos do LBP dependem também de sua monocromaticidade, influência e fase de crescimento celular em que as células que receberam a irradiação.⁸¹

Futuros experimentos *in vitro* serão realizados, pois a principal ação do laser consiste na absorção da luz pelos tecidos, resultando em modificações no metabolismo celular. Assim poderemos investigar se o IS foi o principal indutor da queda na viabilidade celular causando alto índice de necrose nas células musculares no processo de diferenciação, assim como o estresse oxidativo, citocinas inflamatórias e fatores miogênicos e comprovar os efeitos benéficos do LBP descritos na literatura.

7. CONCLUSÃO

Dentro das condições experimentais, para os mioblastos C2C12 induzidos à diferenciação celular na presença da toxina urêmica IS tratados ou não com LBP, podemos concluir que:

- 1) O IS foi tóxico para células C2C12 na concentração urêmica máxima descrita no valor de 236 mg/l;
- 2) O IS foi tóxico em todos os tempos (24, 48 e 72 horas) na concentração de 236 mg/l e o LBP não apresentou efeito protetor nem reparador, tendo ainda um efeito em sensibilizar as células ao efeito tóxico do IS;
- 3) Não foi possível avaliar os efeitos sobre estresse oxidativo tanto de ERO como NO, porém ainda não descartamos a possibilidade do IS induzir estresse oxidativo nas células C2C12;
- 4) O IS não alterou a expressão da citocina pró-inflamatória IL-6 em células C2C12;
- 5) O IS não alterou a diferenciação das células utilizando como marcadores os fatores regulatórios miogênicos miogenina e MyoD.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MEYER TW, HOSTETTER TH. Uremia. **N Engl J Med**, v, 27;357, n, 13, p, 1316-25, 2007.
2. BASTOS MG, KIRSZTAJN GM. Chronic kidney disease: importance of early diagnosis, immediate referral and structured interdisciplinary approach to improve outcomes in patients not yet on dialysis. **J Bras Nefrol** v, 33, n, 1, p, 74-87, 2011.
3. SHLIPAK MG, FRIED LF, CUSHMAN M, MANOLLO TA, PETERSON M, STEHMAN-BEEN C. Cardiovascular mortality risk in chronic kidney disease. **JAMA**, v293, p,1737-45, 2005.
4. TAWNEY KW, TAWNEY PJW, KOVACH J. Disablement and rehabilitation in end-stage renal disease. **Seminars in Dialysis**, v16, p,447-52, 2003.
5. ALMERAS C, ARGILÉS A. The general picture of uremia, **Semin Dial**, v22, n 4, p329-33, 2009.
6. CHEEMA BSB, SINGH MAF. Exercise training in patients receiving maintenance hemodialysis: A systemic review of clinical trials. **Am J Nephrol**, v 25, p352-65, 2005.
7. MOREIRA PR, BARROS E. Atualização em fisiologia e fisiopatologia renal: Bases fisiopatológicas da miopatia na insuficiência renal crônica, **J. Bras. Nefrol**, v22, p201-208, 2001.
8. RIZZO MA, FREDIANI F, GRANATA A, RAVASI B, CUSI D, GALLIENI M. Neurological complications of hemodialysis: state of the art, **J Nephrol**, v25, n2, p170-82, 2012.
9. QUINTANILLA AP, SAHGAL V. Uremic myopathy. **Int J Artif Organs**, v7, n5, p239-42, 1984.
10. HARRISON AP, NIELSEN AH, EIDEMAK I, MOLSTED S, BARTELS EM. The uremic environment and muscle dysfunction in man and rat. **Nephron Physiol**, v103, n1, p33-42, 2006.
11. VANHOLDERI R. Uremic toxins. **Nephrologie**, v24, n7, p373-6, 2003.

12. RIELLA MC. **Princípios de Nefrologia e distúrbios hidroeletrólíticos**. Editora Guanabara Koogan, 5 ed, p830, 2010.
13. BARRETO FC, STINGHEN AEM, OLIVEIRA RB, FRANCO ATB, MORENO NA, BARRETO DV, FILHO RP, DRUEKE TB, MASSY ZA. Em busca de uma melhor compreensão da doença renal crônica: uma atualização em toxinas urêmicas. **J Bras Nefrol**, v36(2), p221-235, 2014.
14. NIWA, T. Uremic toxicity of indoxyl sulfate. **Nagoya J Med Sci**, v72, n1-2, p1-11, 2010.
15. BARRETO FC, BARRETO DV, LIABEUF S, MEERT N, GLORIEUX G, TEMMAR M, et al. Serum indoxyl sulfate is associated with vascular disease and mortality in chronic kidney disease patients. **Clin J Am Soc Nephrol**, v4, n10, p1551-8, 2009.
16. LOWENSTEIN, J. The anglerfish and uremic toxins. **FASEB J**, v,25, p1781-85, 2011.
17. SUN CY, CHANG SC, WU MS. Suppression of Klotho expression by protein-bound uremic toxins is associated with increased DNA methyltransferase expression and DNA hypermethylation. **Kidney Int**, v 81, n 7, p, 640-50, 2012.
18. MOZAR A, LOUVET L, MORLIERE P, GODIN C, BOUDOT C, KAMEL S, et al. Uremic toxin indoxyl sulfate inhibits human vascular smooth muscle cell proliferation. **Ther Apher Dial**, v15, n2, p135-9, 2011.
19. NEIRYNCK N, VANHOLDER R, SCHEPERS E, ELOOT S, PLETINCK A, GLORIEUX G. An update on uremic toxins. **Int Urol Nephrol**, v45, n1, p139-50, 2013.
20. FILIPPIN LI, MOREIRA AJ, MARRONI NP, XAVIER RM. Nitric oxide and repair of skeletal muscle injury. **Nitric Oxide**, v 21, p157–163, 2009.
21. TEDESCO FS, DELLAVALLE A, DIAZ-MANERA J, MESSINA G, COSSU, G. Repairing skeletal muscle: regenerative potential of skeletal muscle stem cell. **The Journal of Clinical Investigation**, 2010.
22. FOSCHINI RMS, RAMALHO FS, BICAS HEA. Células satélites musculares. **Arq. Bras Oftalmol**, v67, p6818-7, 2004.

23. FILIPPIN LI, CUEVAS MJ, LIMA E, MARRONI NP, GONZALEZ-GALLEGO J, XAVIER RM. Nitric oxide regulates the repair of injured skeletal muscle. **Nitric Oxide** v 24, p43–49, 2011.
24. MAURO A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. **J, Biophys, Biochem, Cytol**, v 9, p493-95, 1961.
25. RANTANEN J, HUEME T, LUKKA R, HEINO J, KALIMO H. Satellite cell proliferation and the expression of myogenin and desmin in regenerating skeletal muscle: evidence for two different populations of satellite cells. **Lab Invest**, n72, v3, p341-7, 1995.
26. YABLONKA-REUVENI Z, RIVIERA AJ. Temporal expression of regulatory and structural muscle proteins during myogenesis of satellite cells on isolated adult rat fibers, **Dev Biol**, n164, v2, p588-603, 1994.
27. KHARRAZ Y, GUERRA J, MANN CJ, SERRANO AL, MUÑOZ-CÁNOVES P. Macrophage Plasticity and the Role of Inflammation in Skeletal Muscle Repair. **Mediators of Inflammation**, Volume 1, 2013.
28. SHIN EH, CATERSON EJ, JACKSON WM, NESTI LJ. Quality of healing: Defining, quantifying, and enhancing skeletal muscle healing. **Wound Rep Reg** v22, p18–24, 2014.
29. SHI X, GARRY DJ. Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. **Genes & Development**, v 20, p1692–1708, 2006.
30. CHARGÈ SBP, RUDNICKI MA. Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration. **Physiol Rev**, v84, p209–238, 2004.
31. KUMAR A, MOHAN S, NEWTON J, REHAGE M, TRAN K, BAYLINK DJ. Pregnancy-associated Plasma Protein-A Regulates Myoblast Proliferation and Differentiation through an Insulin-like Growth Factor-dependent Mechanism. **J Biol Chem**, v280, n45, p37782–9, 2005.
32. WOLPERT L, BEDDINGTON R, BROCKES J, JESSEL T, LAWRENCE P, MEYEROWITZ E. Principios da Biologia do Desenvolvimento. **Porto Alegre: Artmed**, 484 p, 2000.
33. SCHULTZ E, MCCORMICK KM. Skeletal muscle satellite cells. **Rev Physiol Biochem Pharmacol**, n123, p213-57, 1994.

34. GUIZONI DM, LIMA ARR, MARTINEZ PF, DAMATTO RL, CEZAR MDM, BONOMO C, OKOSHI K, DAL PAI-SILVA M, OKOSHI MP. Miostatina e redução da massa muscular em doenças crônicas. **Revista Bras de Clínica Médica**, v8, n3, p266-71, 2010.
35. WATABE S, Myogenic regulatory factors. Johnston, I. A. Fish physiology - Muscle Development and Growth. **Academic Press**, v156, p19-39, 2001.
36. GOLDSPINK G, SCUTT A, LOUGHNA PT, WELLS DJ, JAENICKE T, GERLACH GF. Gene expression in skeletal muscle in response to stretch and force generation. **Am J Physiol**, n262, p356-363, 1992.
37. CORNELISON DD, OLWIN BB, RUDNICKI MA, WOLD BJ. MyoD satellite cells in single-fiber culture are differentiation defective and MRF4 deficient, **Dev Biol**, n224, v2, p122-37, 2000.
38. KITZMANN M, CARNAC G, VANDROMME M, PRIMIG M, LAMB NJ, FERNANDEZ A. The muscle regulatory factors MyoD and myf-5 undergo distinct cell cyclespecific expression in muscle cells. **J Cell Biol**, n142, v6, p1447-59, 1998.
39. GROUNDS MD, GARRETT KL, LAI MC, WRIGHT WE, BEILHARZ MW. Identification of skeletal muscle precursor cells in vivo by use of MyoD1 and myogenin probes. **Cell Tissue Res**, n267, v1, p99-104, 1992.
40. ZHANG C, LI Y, WU Y, WANG L, WANG X, DU J. Interleukin-6/Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) Pathway Is Essential for Macrophage Infiltration and Myoblast Proliferation during Muscle Regeneration. **J Biol Chem**, 2013 Jan v18, n288, p1489-99, 2013.
41. SOUZA JRM, OLIVEIRA RT, BLOTTA MHSL, COELHO OR. Níveis séricos de interleucina-6 (IL-6), interleucina-18 (IL-18) e proteína-C reativa (PCR) na síndrome coronariana aguda sem supradesnivelamento do ST em pacientes com diabetes tipo 2. **Arq Bras Cardiol**, v90, n2, p94-99, 2008.
42. GOMES MAM, NETO NCM, BISPO IGA. Interleucina-6, Moléculas de Adesão Intercelular-1 e Microalbuminúria na Avaliação da Lesão Endotelial: Revisão de Literatura. **Rev Soc de Card Est Rio de Janeiro**, v22, n6, p398-403, 2009.

43. DE OLIVEIRA CMB, SAKATA RK, ISSY AM, GEROLA LR, SALOMÃO R. Citocinas e Dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v61, n2, p260-261, 2011.
44. PETEAN CC, GOMES FM, ROSA E SILVA JC, FERRIANI RA, MOURA MD, REIS RM, NAVARRO PAAS. Peroxidação lipídica e vitamina E no soro e no fluido folicular de mulheres inférteis com endometriose submetidas à estimulação ovariana controlada. **Rev Bras Ginec Obst**, v29, n6, p303-9, 2007.
45. BARREIROS ALB, DAVID JM. Estresse Oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim Nova**, v29, n1, p113-23, 2006.
46. HALLWELL B, GITTERIDGE JMC. **Free radicals in Biology and Medicine**. 2ª ed, London: Clarendon Press Oxford; 1989.
47. SCHAFER F, BUETTNER G. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. **Free Radic Biol Med**, v30, n11, p1191-212, 2001.
48. LENNON S, MARTIN S, COTTER T. Dose-dependent induction of apoptosis in human tumour cell lines by widely diverging stimuli. **Cell Prolif**, v24, n2, p203-14, 1991.
49. REBOREDO MM. Exercícios Físicos em pacientes dialisados. **Rev. Bras. Med. Esporte**, v13, n8, p427-30, 2007.
50. MURRAY J, AUWERX J, HUSS JM. Impaired myogenesis in estrogen-related receptor γ (ERR γ)-deficient skeletal myocytes due to oxidative stress, **FASEB J**, v1, p135-50, 2013.
51. DUSSE LMS, VIEIRA LM, CARVALHO MG. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v39, n4, p343- 50, 2003.
52. MESSINA A, KNIGHT KR, DOWSING BJ. Localization of inducible nitric oxide synthase to mast cells during ischemia/reperfusion injury of skeletal muscle. **Lab Invest**, n80, p423-31, 2000.

53. WEHLING M, SPENCER MJ, TIDBALL JG. A nitric oxide synthase transgene ameliorates muscular dystrophy in mdx mice. **J Cell Biol**, v1, n155, p123-31, 2001.
54. FROST RA, NYSTROM GJ, LANG CH. Epinephrine stimulates IL-6 expression in skeletal muscle and C2C12 myoblasts: role of c-Jun NH2-terminal kinase and histone deacetylase activity. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v286, p809–817, 2004.
55. TRIPATHI P, TRIPATHI P, KASHYAP L, SINGH, V. The role of nitric oxide in inflammatory reactions. **FEMS Immunol Med Microbiol**, n51, p443–52, 2007.
56. LEE MH, JANG MH, KIM EK, HAN SW, CHO SY, KIM CJ. Nitric oxide induces apoptosis in mouse C2C12 myoblast cell. **J Pharmacol Sci**, v97, p369-76, 2005.
57. MALUF AP, UGHINI GC, MALUF RP, PAGNONCELLI RM. Utilização de laser terapêutico em exodontia de terceiros molares inferiores, **RGO- Porto Alegre**, v54, p182-4, 2006.
58. LINS RD, DANTAS EM, LUCENA KC, CATÃO MH, GRANVILLE-GARCIA AF, CARVALHO NETO LG. Biostimulation effects of low-power laser in the repair process. **Review, An Bras Dermatol**, v85, n6, p849-55, 2010.
59. ROCHA JRAM, ANDRADE LCF, OLIVEIRA RG, AARESTRUP FM, FARIAS RE. Modulação da proliferação fibroblástica e da resposta inflamatória pela terapia a laser de baixa intensidade no processo de reparo tecidual. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v 81, n 2, p150-6, 2006.
60. DORTBUDAK O, HAAS R, MALLATH-POKORNY G. Biostimulation of bone marrow cells with a diode soft laser. **Clin, Oral Implants Res**, v16, p540–545, 2000.
61. STEIN A, BENAYAHU D, MALTZ L, ORON,U. Low level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. **Photomed, Laser Surg**, v 23, p161–166, 2005.
62. RENNÓ AC, TOMA RL, FEITOSA SM, FERNANDES K, BOSSINI OS, DE OLIVEIRA P, PARIZOTTO N, RIBEIRO DA. Comparative effects of low-

intensity pulsed ultrasound and low-level laser therapy on injured skeletal muscle. **Photomed Laser Surg**, v29, n1, p5-10, 2011.

63. FERREIRA MPP, MESQUITA-FERRARI RA, GRAVALOS ED; MARTINS MD, BUSSADORI SK, BIASOTTO-GONZALEZ DA, FERNANDES KPS. Effect of low-energy GaAlAs and InGaAlP laser irradiation on the viability of C2C12 myoblasts in a muscle injury model. **Photomed, Laser Surg**, v27, n6, p901-6, 2009.

64. AZEVEDO LH, EDUARDO FP, MOREIRA MS, EDUARDO CP, MARQUES MM. Influence of different power densities of LILT on cultured human fibroblast growth. **Lasers Med Sci**, n21, p86–89, 2006.

65. MARQUES MM, PEREIRA NA, FUJIHARA NA, NOGUEIRA FN, EDUARDO CP. Effect of low-power LASER irradiation on protein synthesis and ultrastructure of human gingival fibroblasts. **LASERs Surg Med**, 2004.

66. MESQUITA-FERRARI RA, RIBEIRO R, SOUZA NHC, SILVA CAA, MARTINS MD, BUSSADORI SK, FERNANDES KPS. No effect of low-level lasers on in vitro myoblast culture. **Indian Journal of experimental biology**, 2011.

67. YOO BH, PARK CM, OH TJ, HAN S, KANG HH. Investigation of jewelry powders radiating far infrared rays and the biological effects on human skin. **Journal of Cosmetic Science**, n53 p175-184, 2002.

68. FUJIHARA NA. Estudo da adesão, proliferação e síntese de proteínas por osteoblastos cultivados e submetidos à ação do LASER de baixa potência, São Paulo - Faculdade de Odontologia da Universidade São Paulo, 2002.

69. MOORE P, RIDGWAY TD, HIGBEE RG, HOWARD EW, LUCROY MD. Effect of wavelength on low-intensity LASER irradiation-stimulated cell proliferation in vitro. **LASERs Surg Med**, 2005.

70. ALMEIDA-LOPES L, RIGAU J, ZÂNGARO RA, GUIDULI-NETO J, JAEGER MMM. Comparison of the low level therapy effects on cultured gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and fluence. **Lasers Surg Med** n29, p179–184, 2001.

71. EDUARDO FP, MEHNERT DU, MONEZI TA, ZECELL DM, SCHUBERT MM, EDUARDO CP, MARQUES MM. Cultured epithelial cells response to phototherapy with low intensity laser. **Lasers Surg Med**, v39, n4, p365-72, 2007.
72. MCFARLANE C, HENNEBRY A, THOMAS M, PLUMMER E, LING N, SHARMA R, et al. Myostatin signals through Pax7 to regulate satellite cell self-renewal. **Experimental cell research**, v314, p317-329, 2008.
73. MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, **J Immunol Methods**, v16; 65, n1-2, p55-63, 1983.
74. LÖSTER K, HORSTKORTE R. Enzymatic quantification of cell-matrix and cell-cell adhesion. **Micron**, v31, n1, p41-53, 2000.
75. DING AH, NATHAN CF, STUEHR DJ. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages: comparison of activating cytokines and evidence for independent production. **J, Immunol**, v141, p2407-2412, 1988.
76. CHEEMA BSB, SINGH MAF. Exercise training in patients receiving maintenance hemodialysis: A systematic review of clinical trials. **Am, J, Nephrol**, n25, p352-64, 2005.
77. BASTOS MG. Anemia e progressão da doença renal crônica. **J, Bras, Nefrol**, n28, p18-21, 2006.
78. Rossi M, Campbell KL, Johnson DW, Stanton T, Vesey DA, Coombes JS, Weston KS, Hawley CM, McWhinney BC, Ungerer JP, Isbel N. Protein-bound uremic toxins, inflammation and oxidative stress: a cross-sectional study in stage 3-4 chronic kidney disease. **Arch Med Res**. 2014 May;45(4):309-17.
79. Kim YH, Kwak KA, Gil HW, Song HY, Hong SY. Indoxyl sulfate promotes apoptosis in cultured osteoblast cells. **BMC Pharmacol Toxicol**. 2013 Dec 1;14:60.
80. SZYMANSKA J, GORALCZYK K, KLAWE JJ, LUKWICZ M, MICHALSKA M, GORALCZY B, ZALEWSKI P, NEWTON JL, GRYKO L, ZAJAC A, ROSC D. Phototherapy with low –level laser influences the proliferation of endothelial

cells and vascular endothelial growth factor and transforming growth factor-beta secretion, **Journal of physiology and pharmacology**, n64, v3, p387-391, 2013.

81. KARU T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near - IR radiation on cells, **J, Photochem Photobiol Biol**, n49, p1-17, 1999.