

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

PAOLA PELEGRINELI ARTILHEIRO

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO LASER EM BAIXA INTENSIDADE E DO
ULTRASSOM TERAPÊUTICO SOBRE A PROLIFERAÇÃO E
DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS PRECURSORAS MIOGÊNICAS**

São Paulo, SP - 2011

PAOLA PELEGRINELI ARTILHEIRO

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO LASER EM BAIXA INTENSIDADE E DO
ULTRASSOM TERAPÊUTICO SOBRE A PROLIFERAÇÃO E
DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS PRECURSORAS MIOGÊNICAS**

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

Orientadora: Profa. Dra. Raquel Agnelli Mesquita Ferrari

Co-orientadora: Profa. Dra. Kristianne Porta Santos Fernandes.

São Paulo, SP – 2011

Artilheiro, Paola Pelegrineli.

Avaliação dos efeitos do laser em baixa intensidade e do ultrassom terapêutico sobre a proliferação e diferenciação de células precursoras miogênicas. / Paola Pelegrineli Artilheiro. 2011.

62 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2011.

Orientador (a): Profa. Dra. Raquel Agnelli Mesquita Ferrari.

1. Laser. 2. Ultrassom terapêutico. 3. Mioblastos. 4. Diferenciação. 5. Proliferação. I. Ferrari, Raquel Agnelli Mesquita. II. Título.

CDU 615.8

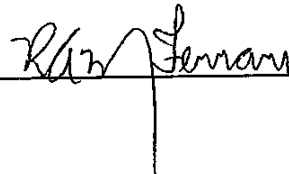
São Paulo, 07 de dezembro de 2011.

TERMO DE APROVAÇÃO

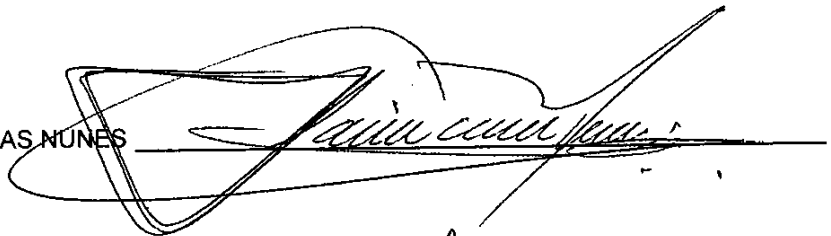
Aluno: PAOLA PELEGRINELI ARTILHEIRO

Título da Dissertação: "AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO LASER EM BAIXA INTENSIDADE E DO ULTRASSON TERAPÊUTICO SOBRE A PROLIFERAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS PRECURSORAS MIOGÊNICAS"

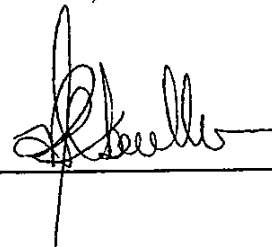
Presidente PROFA. DRA. RAQUEL AGNELLI MESQUITA FERRARI



Membro: PROF. DR. FABIO DAUMAS NUNES



Membro: PROFA. DRA REGIANE ALBERTINI DE CARVALHO



AGRADECIMENTOS

Ao meu marido Tiago pela compreensão diante das noites dedicadas aos artigos e dissertação; pelo apoio nos momentos difíceis e por não me deixar desistir nos momentos de desespero;

À minha mãe pelo apoio e carinho todo esse tempo;

À minha orientadora Profa. Dra. Raquel Agnelli Mesquita Ferrari, por me aceitar como aluna de mestrado; respeitar minhas limitações e me ensinar a superá-las; por me mostrar os caminhos da pesquisa; pela proposta e colaboração na realização de todos os estudos; pelos conselhos e pela grande amizade. Certamente possuí grande influência no meu crescimento profissional.

Aos meus familiares, amigos e companheiros nesta longa jornada, por me darem força e colaboração, principalmente a uma grande amiga Crislene, que ainda durante a iniciação científica me deu muita força diante de momentos pessoais muito difíceis;

Aos meus iniciantes Jean e Mikaele, pelo apoio, colaboração e por todos os sábados e domingos dedicados à pesquisa;

A todos os professores do programa de Mestrado em Ciências da Reabilitação – Universidade Nove de Julho, em especial à minha Co-Orientadora Profa. Dra. Kristianne Porta Santos Fernandes pelo conhecimento transmitido durante esse período;

Obrigada por tudo.

RESUMO

O objetivo do estudo foi analisar o efeito do laser em baixa intensidade (LBI) e do ultrassom terapêutico (US) sobre a proliferação e diferenciação de mioblastos C2C12. Os mioblastos foram cultivados em meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) e induzidos à diferenciação pela substituição do meio de cultivo por meio DMEM 2% de soro de cavalo (SC). O tratamento com LBI (780nm, 10mW de potência, 3 e 5J/cm² de densidade de energia durante 12 e 20 segundos respectivamente) e US (3MHz, pulsado 20%, 0,2 e 0,5W/cm² durante 5 minutos) ocorreu em dois momentos diferentes: (1) Após o processo de diferenciação celular (96h) e (2) Concomitante à indução da diferenciação celular. A proliferação celular foi avaliada nas duas situações descritas utilizando o método de MTT e a diferenciação celular foi avaliada 1 e 3 dias na situação de tratamento concomitante à indução da diferenciação celular por meio da dosagem da atividade de creatinoquinase (CK). Os resultados foram submetidos à análise estatística por Análise de Variância (ANOVA), teste Dunnet, para verificar diferenças entre o grupo controle e os grupos tratados com LBI e US adotando significância de $p \leq 0.05$. Os resultados mostraram que não houve diferença significativa no número de células, na avaliação do tratamento com LBI e US após a diferenciação, contudo quando o tratamento foi realizado concomitante à diferenciação, houve diminuição na proliferação celular no grupo laser 5J/cm² após 96 horas e um aumento da atividade de CK intracelular neste mesmo grupo 3 dias após a indução da diferenciação celular. Em conclusão, foi possível verificar que após a diferenciação celular ambos os recursos não alteram a proliferação celular contudo durante a diferenciação o tratamento com LBI na densidade de energia de 5J/cm² provocou uma redução na proliferação após 96h e aumento de atividade de Ck após 3 dias o que pode sugerir uma aceleração no processo diferenciação.

Palavras-chave: Laser, Ultrassom terapêutico, Mioblastos, Diferenciação, Proliferação.

ABSTRACT

The aim of this study was to analyze the effect of low intensity laser (LLLT) and therapeutic ultrasound (US) on the proliferation and differentiation of C2C12 myoblasts. The myoblasts were grown in culture medium Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) containing 10% fetal bovine serum (FBS) and induced to differentiate by replacing the culture medium by DMEM containing 2% horse serum (SC). Treatment with LLLT (780nm, 10mW 5J/cm² for 12 and 20 seconds) and US (3 MHz, pulsed 20%, 0.2 and 0.5 W/cm² for 5 minutes) occurred in two different moments: (1) After the process of cellular differentiation (96 h) and (2) Concomitant with the induction of cell differentiation. Cell proliferation was evaluated in two situations using the MTT method and cell differentiation was assessed 1 and 3 days in the situation of the concomitant induction of cell differentiation by means of the determination of activity of creatine kinase (CK). The results were statistically analyzed by analysis of variance (ANOVA), Dunnet test to verify differences between the control group and groups treated with LLLT and US adopting significance of $p \leq 0.05$. The results showed no significant difference in the number of cells in the evaluation of treatment with LBI and US after differentiation, yet when the treatment was concomitant with differentiation, decreased cell proliferation in the laser group after 96 hours and 5J/cm² an increase in intracellular CK activity in this same group three days after the induction of cell differentiation. In conclusion, we found that after cell differentiation both features do not alter cell proliferation during differentiation but treatment with LBI in the energy density of 5J/cm² caused a reduction in proliferation after 96 and CK activity increased after 3 days which suggests a faster differentiation process.

Key words: Laser, Ultrasound therapy, Myoblasts, Differentiation, Proliferation.

Palavras-chave: Ultrassom terapêutico, Laser, Mioblastos, Diferenciação, Proliferação.

SUMÁRIO

Lista de figuras.....	06
Lista de Abreviaturas.....	07
1. Introdução	08
2. Objetivos	13
2.1. Geral.....	13
2.2. Específico.....	13
3. Material e Métodos	14
3.1. Cultivo Celular	14
3.2. Diferenciação Celular	14
3.3. Irradiação Laser.....	15
3.4. Irradiação Ultrassônica.....	16
3.5. Ensaio de viabilidade celular (MTT).....	16
3.5.1. Após o processo de diferenciação celular	17
3.5.2. Concomitante à indução da diferenciação celular	17
3.6. Diferenciação celular avaliada por atividade de CK	18
4. Análise dos resultados.....	19
5. Resultados.....	20
5.1. Resultados Publicados	20
5.2. Resultados não Publicados	21
5.2.1 Tratamento com LBI e US concomitante à indução da diferenciação celular	21
5.2.2 Diferenciação celular avaliada por atividade de CK	24
Artigo 1 – Análise comparativa dos efeitos do Ultrassom terapêutico e laser de baixa potência sobre a proliferação de células musculares durante a diferenciação celular. (Aceito para publicação na Revista Fisioterapia em Movimento)	26
5.	
5.2.1	

5.2.2

6. Considerações finais.....	45
7. Referências bibliográficas.....	46
Anexo I – Carta de aceite – Periódico Fisioterapia em Movimento	51
Anexo II - Artigo publicado no periódico <i>Fisioterapia e Pesquisa</i>	52
Anexo III – Avaliação da proliferação celular e da morfologia de mioblastos C2C12 em meio suplementado com SFB e SC	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Irradiação Laser: Método de Irradiação Laser diretamente sobre o precipitado celular.....	15
Figura 2 - Irradiação Ultrassônica: Representação esquemática do aparato para a aplicação do US terapêutico na cultura celular. Adaptado de Mukai <i>et al.</i> (2005).....	16
Figura 3 - Tratamento com LBI e US concomitante à indução da diferenciação celular (24 horas).....	36
Figura 4 - Tratamento com LBI e US concomitante à indução da diferenciação celular (48 horas).....	37
Figura 5 - Tratamento com LBI e US concomitante à indução da diferenciação celular (96 horas).....	38
Figura 6 - Diferenciação celular avaliada por atividade de CK	39

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA - Análise de variância;

AsGaAl – Arseneto de Gálio Alumínio;

C2C12 – Linhagem celular, subclone da linhagem celular de mioblastos C2;

CK – Creatinoquinase;

CO₂ – Dióxido de carbono ou gás carbônico;

DMEM – Meio Eagle modificado por Dulbecco;

Hz - Hertz

LBI – Laser em baixa intensidade;

MEC – Matriz extra celular;

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

PBS1X - Phosphate-buffered saline (solução salina tamponada com fosfato)

SC – Soro de Cavalos;

SFB – Soro fetal Bovino;

U.S – Ultrassom terapêutico;

μL – Microlitros;

W/cm² – Watts por centímetro quadrado.

1. INTRODUÇÃO

A miogênese ou a formação do músculo esquelético é um processo altamente 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 que, finalmente desenvolvem-se para se tornarem fibras do músculo esquelético maduro^{1,2}.

Desta forma, a fusão de mioblastos em miotubos multinucleados é o passo terminal de diferenciação. Após isso, divisões mitóticas dentro dos miotubos ou fibras musculares não ocorrem mais. Núcleos extras, requeridos para crescimento muscular, são garantidos pelas células satélites, que representam a maior parte do potencial regenerativo frente à lesão e adaptação muscular ao exercício².

A capacidade de músculo esquelético adulto para regenerar e restaurar a sua arquitetura celular é devido a essa população de células satélites, que são pequenas células progenitoras mononucleares, situadas entre a membrana basal e sarcolema das fibras musculares. Estudos anteriores estabeleceram que as células satélites estão envolvidas no crescimento normal do músculo, bem como regeneração muscular após uma lesão ou doença muscular, a maioria das células satélites são inativas ou quiescentes. Após uma lesão associada a exercício intenso ou doença, as células satélites tornam-se ativadas, proliferam-se como mioblastos esqueléticos, e se diferenciam em novas células musculares³.

Nos diferentes estágios da miogênese, as células expressam distintos fatores regulatórios miogênicos envolvidos neste processo de diferenciação. Desmina, Myf5 e MyoD são expressos em estágios iniciais enquanto que

miogenina, fator regulatório de miogenina (MRF4) e miosina são expressos nos estágios mais tardios. A expressão destes fatores também é regulada por moléculas de sinalização extracelular da MEC e, também, por outros fatores envolvidos no contato célula-célula ^{4,5,6}.

Quando um músculo sofre uma lesão, este tem a habilidade de iniciar um processo de reparo altamente organizado de forma a prevenir a perda de massa muscular. Este processo é semelhante à miogênese, porém as células que participam são as células satélites ^{7,8}. Uma vez ativadas, as células satélites proliferam sendo então denominadas mioblastos e também expressam os fatores reguladores miogênicos que controlam a proliferação e a diferenciação celular. Essas células se fundem a fibras musculares já existentes ou fundem-se a células satélites vizinhas para gerar novas fibras musculares ^{9,10}.

Há evidências de que o reparo tecidual possa ser estimulado por recursos terapêuticos como o ultrassom e laser em baixa intensidade sendo estes recursos amplamente utilizados na prática clínica, porém, muitos dos estudos são contraditórios no que diz respeito aos parâmetros dosimétricos adequados para promover a regeneração muscular de forma mais rápida e de melhor qualidade frente aos diferentes tipos de lesão ^{11,12}.

O ultrassom é uma das modalidades terapêuticas mais utilizadas no tratamento de lesões de tecidos moles com o objetivo de proporcionar um processo de reparo muscular de melhor qualidade e menor duração ¹³. Estudos *in vitro* avaliando o potencial do US são importantes complementos dos estudos *in vivo*, e podem trazer maiores conhecimentos de forma a permitir a utilização desse recurso de forma mais eficaz e segura ¹⁴.

A energia do US que penetra no organismo pode afetar as células e tecidos por meio de mecanismos térmicos e não térmicos. Evidências mostram que mecanismos não térmicos estariam envolvidos na produção dos efeitos terapêuticos primários do US, isto é, a estimulação da regeneração tecidual por meio do aumento da permeabilidade e difusão em nível membrana celular, influxo de cálcio intracelular e alterações na atividade elétrica do tecido nervoso ^{15,16}.

Segundo Mendonça et al, 2006¹⁷, há um consenso no sentido de que o US promove efeito benéfico sobre diversos tecidos, destacando-se o aumento

da angiogênese, do tecido de granulação, do número de fibroblastos e da síntese de colágeno, e a diminuição de leucócitos e macrófagos, dentre outros nos quais já tem sido demonstrado o aumento da velocidade de cicatrização, a diminuição do número de células inflamatórias e a melhora da qualidade do tecido neoformado.

Estudos *in vitro* demonstraram que os efeitos do US parecem ser dependente do tipo celular, sendo que promove a síntese de DNA em osteoblastos humanos, fibroblastos de gengiva e pele, células de periósteo, mas não em condrócitos¹⁸. Com relação ao efeito do US sobre a proliferação celular foi verificado inicialmente por Johns LD 2002¹⁵ que o US contínuo e pulsado em intensidades de 0,1 a 0,7W/cm² era capaz de diminuir a taxa de crescimento celular porém, em estudos posteriores, foi evidenciado que o US utilizado nas freqüências de 1 e 3 MHz em intensidades variadas promovia aumento da proliferação de fibroblastos e osteoblastos^{19,20,21,22,23,24}.

Encontramos na literatura estudos que avaliaram o potencial terapêutico do US realizados em osteoblastos^{25,26,27}, condrócitos^{28,29,30}, fibroblastos³¹, células epiteliais³² e células endoteliais³³.

Piedade 2008³⁴ avaliou a lesão de gastrocnêmio de rastos Wistar, e pode verificar que o US pulsado é capaz de estimular a diferenciação de células musculares, o que favoreceria a regeneração tecidual. Por outro lado foi possível verificar que também há uma maior disposição de fibras colágenas, o que poderia significar um pior desempenho funcional.

Segundo Ribeiro et al 2009 o US terapêutico pulsado nas intensidades de 0,2 e 0,5W/cm², 1 e 3 MHz de potência, durante 5 minutos, não foi capaz de alterar a proliferação de células musculares após o período de 72 horas de incubação.³⁵

O enorme potencial terapêutico do US está longe de ser estabelecido em virtude de novas aplicações serem adicionadas regularmente ao seu repertório³⁶.

Outro recurso muito utilizado na prática clínica após lesões musculares é o laser em baixa intensidade, ou seja, aquele que possui baixa energia e ausência de potencial foto-térmico. Existem diversos tipos, sendo os mais usados os que se encontram na porção óptica do espectro vermelho e do infravermelho (400 a 780 nm e 780 a 1mm). Seus fótons de energia são inferiores a

2,0 elétron-volt (eV), portanto, inferiores à energia da ligação das moléculas biológicas e do DNA, não podendo quebrar ligações químicas e não sendo capazes de induzir mutação e carcinogênese^{37,38}.

Estudos têm mostrado que o laser é capaz de influenciar a proliferação de fibroblastos^{39,40}, osteoblastos⁴¹, e células epiteliais⁴². Além disso, essa terapia também possui efeitos sobre o colágeno e a síntese de colágeno^{43,40}. Um estudo analisou os efeitos do laser de AsGaAL nos parâmetros de 830 nm (0,3J/cm²), 685 nm (0,6J/cm²) e 670 nm (1,2J/cm²) sobre células precursoras miogênicas em cultura primária e concluiu que a taxa de proliferação celular induzida por estas irradiações foi de 84,3%, 70,6% e 56,8% respectivamente⁴⁴.

Os estudos de Ferreira et al 2009 e Mesquita-Ferrari 2011 avaliaram o efeito do laser em baixa intensidade sobre a cultura de mioblastos em diferentes condições nutricionais, mostrando que os diferentes tipos de laser (AsGaAl e InGaAlP), diferentes intensidades (3.8, 6.3 e 10 J/cm², e 3.8, 10 e 17.5 J/cm², respectivamente), não foram capazes de alterar o crescimento de células C2C12 em qualquer uma das condições, nutrição regular ou deficiência nutricional em diferentes períodos de incubação avaliados⁴⁵.

Contudo, a diferenciação destas células frente ao tratamento com estes recursos não foi avaliada^{45,46}.

Os efeitos mitogênicos da irradiação com laser em baixa intensidade nas células se baseiam na capacidade de modulação de diversos processos metabólicos, mediante a conversão da energia luminosa aportada pelo laser através de processos bioquímicos e fotofísicos, os quais transformam a luz laser em energia útil para as mesmas^{38,40,47,44,37,43}.

O efeito de bioestimulação depende da combinação de parâmetros como comprimento de onda, potência, intensidade e também do tipo celular a ser avaliado^{40,47,38,44,37,41}.

Nogueira et al 2009 revisou os efeitos da laserterapia de baixa potência sobre o tecido ósseo, concluindo que a laserterapia de baixa potência pode acelerar a proliferação de osteoblastos bem como a cicatrização do tecido ósseo⁴⁸.

É importante ressaltar que a linhagem celular C2C12 aqui utilizada é um subclone da linhagem de mioblastos C2, células derivadas de células-satélite de ratos adultos, exibem a maioria das características dos mioblastos normais

e diferenciam-se em cultura, propiciando um bom modelo de estudo da regeneração muscular. O uso de linhagens celulares em modelos para análise de proliferação celular elimina a possibilidade da influência da irradiação laser e do US sobre a produção de fatores de crescimento por células não miogênicas contidas em culturas primárias, como fibroblastos e macrófagos ^{49,44,50,1}.

Além disso, dificuldades na medição de variáveis relacionadas à dor e reparação tecidual em modelos animais ou em ambientes clínicos enfatizam a necessidade de estudos *in vitro* relacionados ao uso de recursos bioestimulantes como o LBI e US ⁵¹.

Assim, o melhor entendimento sobre os efeitos do LBI e US sobre as células musculares poderá contribuir de forma positiva para o estabelecimento de protocolos adequados para o processo de reparo muscular e recuperação clínica dos pacientes.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Avaliar os efeitos do LBI e US sobre a proliferação e diferenciação de mioblastos C2C12.

2.2. Específicos

Avaliar os efeitos do LBI e US após e concomitantemente a indução do processo de diferenciação de mioblastos C2C12 por meio da dosagem da atividade de creatinoquinase (CK).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Cultivo celular

As células utilizadas no presente estudo foram mioblastos C2C12 gentilmente doadas pelo professor José Ernesto Belizário, do Instituto de Ciências Biomédicas – USP/SP. As células foram cultivadas no meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Cultilab, Campinas, SP, Brasil) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, SP, Brasil).

Os mioblastos foram mantidos em estufa (HEPA class 3110, Thermo Electron Corporation, Marietta, OH, EUA) 100 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 se tornou subconfluenta para a perpetuação da linhagem celular, mante do uma monocamada entre 50 e 60% de subconfluência, sempre em fluxo laminar (Linha 400, Pachane, Piracicaba, SP, Brasil). Para tanto, 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 3 minutos a 37°C. Após incubação foi realizada nova lavagem com meio para inativação da tripsina, centrifugação a 1200 rpm a 20°C por 5 minutos (Centrífuga Excelsa 4-280R, Fanem, São Paulo, SP, Brasil) e posteriormente ressuspensão em 1ml de meio DMEM com 10% de Soro Fetal Bovino adicionado antibióticos e antimicóticos. A viabilidade das células foi avaliada por contagem com corante vital azul de Trypan (0,4%) utilizando o

hemocitômetro e foram utilizadas nos ensaios as culturas com viabilidade maior que 95%.

3.2. Diferenciação celular

A diferenciação celular foi induzida através da adição de 2% de soro de cavalo (SC) em meio de cultura de DMEM (Cultilab, Campinas, SP, Brasil), durante 96 horas^{52,1}. Os mioblastos submetidos á diferenciação foram mantidos em estufa (HEPA class 3110, Thermo Electron Corporation, Marietta, OH, EUA) 100 a 37°C, numa atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. A monitorização da viabilidade e crescimento celular foi feita a cada 24 horas, utilizando-se microscópio invertido de fase (Eclipse TE 2000U, Nikon, Melville, NY, EUA).

O tratamento com LBI e US foi realizado em 2 momentos distintos:

- 1) Análise do tratamento após a diferenciação, ou seja, após o período de 96h em meio de diferenciação contendo 2% de SC;
- 2) Tratamento concomitante ao processo de diferenciação, ou seja, juntamente com a adição do meio de diferenciação contendo 2% de SC.

Não sendo realizada a troca do meio de cultura em ambas as condições durante os períodos de análise.

3.3. Irradiação laser

Para o tratamento com LBI foi utilizado o equipamento Twin-laser de Arseneto de Gálio Alumínio (AsGaAL) (MM Optics, São Carlos – SP - Brasil) no comprimento de onda em 780nm. A densidade de energia utilizada foi de 3 e 5J/cm², tendo como potência 10 mW durante 12 e 20 segundos⁴⁶. As irradiações foram realizadas em tubos de centrifugação contendo os precipitados celulares, sendo de baixo para cima na extremidade inferior dos tubos, de modo que o feixe de laser atinja diretamente o precipitado celular sem passar pelo meio de cultura^{37,39}. Os experimentos foram realizados num ambiente com obscuridade parcial para não sofrer interferência da luz externa.

As células do grupo controle sofreram a mesma manipulação, mas não foram irradiadas.



Figura 1: Método de Irradiação Laser diretamente sobre o precipitado celular ^{37,39}

3.4. Irradiação ultrassônica

Para aplicação do Ultrassom utilizamos o equipamento de US Sonomaster Microcontrolled Communicator, nas intensidades de 0,2 e 0,5 W/cm^2 , frequência de 3MHz, modo pulsado 20% durante 5 minutos. A irradiação foi feita num tubo de centrifugação (tubo falcon estéril) contendo o precipitado celular, mergulhado em banho-maria mantido a 37°C de acordo com o modelo proposto por Mukai et al. ³⁰. A cabeça do transdutor (que possui 3 cm de diâmetro) foi posicionada perpendicularmente ao tubo de cultivo celular e fixada na armação de madeira permanecendo a 3cm da cultura celular. O tanque de água foi revestido com borracha para eliminar múltiplas reflexões (figura 2). O grupo controle sofreu a mesma manipulação, mas não foi irradiado.

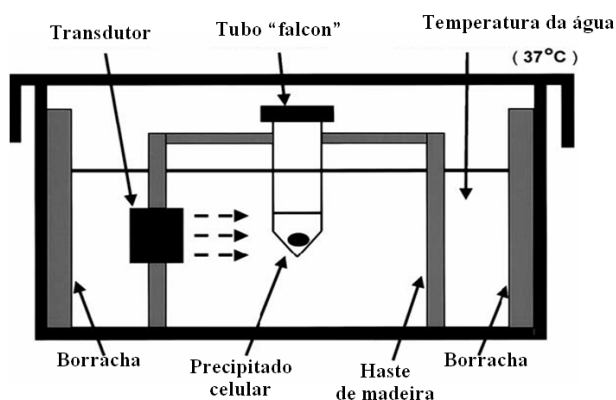


Figura 2: Representação esquemática do aparato para a aplicação do US terapêutico na cultura celular. Adaptado de Mukai *et al.* (2005).

3.5. Ensaio de viabilidade e proliferação celular (MTT)

A metodologia se baseia na habilidade da enzima mitocondrial desidrogenase, encontrada somente em células viáveis, em clivar os anéis de tetrazólio do MTT, formando cristais azuis escuros de formazana, os quais são impermeáveis às membranas celulares, ficando então retidos no interior das células viáveis⁵³. A posterior lise celular faz com que estes sais de formazana sejam liberados. O número de células viáveis é diretamente proporcional ao nível de cristais de azul de formazana formados.

Aproliferação celular foi avaliada em 2 situações diferentes:

- 1) Avaliação da proliferação celular na situação de tratamento (LBI e US) após o processo de diferenciação celular: análise 1 e 3 dias;
- 2) Avaliação da proliferação celular na situação de tratamento realizado concomitante à indução da diferenciação celular: análise 24, 48 e 96 horas.

3.5.1 Após processo de diferenciação celular

Para os ensaios de proliferação, utilizando irradiação com LBI e US após 96h de diferenciação, os mioblastos (1×10^3 /poço) foram incubados em placas de cultura de fundo chato de 96 poços (TPP), mantidos em DMEM 10% de SFB (controle) após a diferenciação celular com a adição de 2% de Soro de Cavalo em meio DMEM. A viabilidade celular foi avaliada 1 e 3 dias após a diferenciação por 96h com soro de cavalo.

3.5.2 Concomitante à indução da diferenciação celular

Nos ensaios de proliferação utilizando tratamento concomitante à indução da diferenciação celular, os mioblastos ($0,5 \times 10^3$ /poço) foram submetidos aos tratamentos com US e LBI, posteriormente incubados em placas de cultura de fundo chato de 96 poços (TPP) mantidos em DMEM 10% de SFB (controle) e em DMEM 2% de Soro de Cavalo para indução da diferenciação celular. A viabilidade celular foi avaliada após 24, 48 e 96 horas

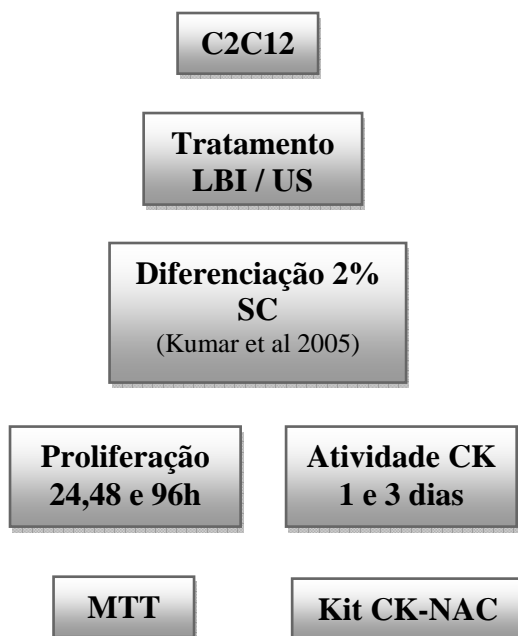
de incubação das células submetidas a tratamento com LBI e US e induzidas à diferenciação pela adição de 2% de SC.

Ao término do período de incubação de ambas as condições (3.5.1 e 3.5.2), foi realizada lavagem com 200 μ l de PBS 1X, foram adicionados 50 μ l de MTT (0,5 μ g/ml em tampão) (3-[4,5-Dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue – SIGMA) e realizada uma incubação de 4h a 37°C.

Terminado o tempo de incubação foram adicionados 100 μ l de isopropanol para ressuspender e solubilizar o precipitado. Por fim, foi realizada a leitura da placa com auxílio de um leitor de placas a uma absorbância de 620nm^{54,55}.

Todos os experimentos foram repetidos 3 vezes, de forma independente, e cada amostra foi feita em triplicata.

Uma curva padrão foi elaborada por meio da incubação de células em diferentes quantidades de forma a permitir a quantificação do número de células dos experimentos.



3.6. Diferenciação celular avaliada por atividade de CK

A metodologia foi baseada em Amack & Mahadevan (2001) e consiste na dosagem de CK intracelular. Para tanto as células controle e submetidas a

tratamento com ambos recursos terapêuticos foram lisadas utilizando o tampão (1 x PBS + 0,1% Triton X-100) em temperatura ambiente por 10 minutos⁵⁴. Em seguida centrifugadas a 10000 rpm por 10 min à 4°C. Posteriormente o sobrenadante foi armazenado a -80°C. A atividade de CK em alíquotas de sobrenadante foi determinada utilizando o kit comercial “CK-NAC liquorfm” (Labtest, Minas Gérias, Brasil) seguido as orientações do fabricante. A atividade de CK foi avaliada no 1º e 3º dia após a indução da diferenciação celular e tratamento^{56,57,58,59,60}.

A avaliação por atividade de CK foi realizada somente na condição de tratamento concomitante à indução da diferenciação celular uma vez que há necessidade de níveis detectáveis de CK.

4. ANÁLISE DOS RESULTADOS

As comparações entre os grupos foram feitas utilizando análise de variância (ANOVA). O teste de Dunnett foi utilizado para determinar diferenças significativas entre os grupos experimentais e o grupo controle. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Os dados foram analisados por meio do programa GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, E.U.A.). Todos os experimentos foram realizados em quadruplicata e repetidos por três vezes.

5. RESULTADOS

5.1 Resultados Publicados

Efeitos do LBI e US sobre a proliferação celular

Os resultados permitiram verificar que não houve diferença significativa na proliferação celular, avaliada pelo método MTT, entre as células musculares submetidas a tratamento com ambos os recursos terapêuticos e as células controle, tanto no período de 24h (figura 3), quanto no período de 72h (figura3). Após o período de 96h de diferenciação celular, induzida com a adição de 2% de SC.

Além disso, foi possível verificar que não houve modificação significativa no número de células quando comparados os períodos de 24 e 72h de incubação após o tratamento com os recursos, confirmando o processo de diferenciação celular, conforme esperado (figura 3).

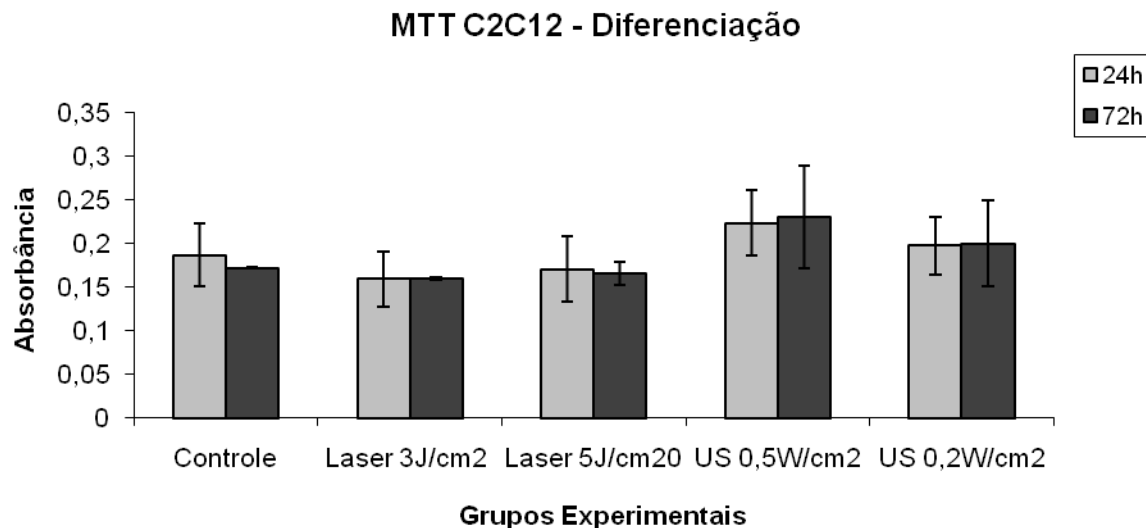


Figura 3. Avaliação da proliferação e viabilidade de células musculares cultivadas em meio regular (10% de SFB) por 24 e 72h, na ausência (controle) e presença de tratamento com LBI e US, não apresentando aumento significativo no número de células dentro dos períodos de 24 e 72h após tratamento, confirmando o processo de diferenciação celular.

Com relação a morfologia das células musculares também foi possível observar que os recursos terapêuticos utilizados não provocaram alterações evidentes, quando avaliada de maneira qualitativa por dois examinadores experiente de forma independente e cega. Como não existiram diferenças apenas uma figura representativa de cada grupo experimental foi adicionada (figura 4).

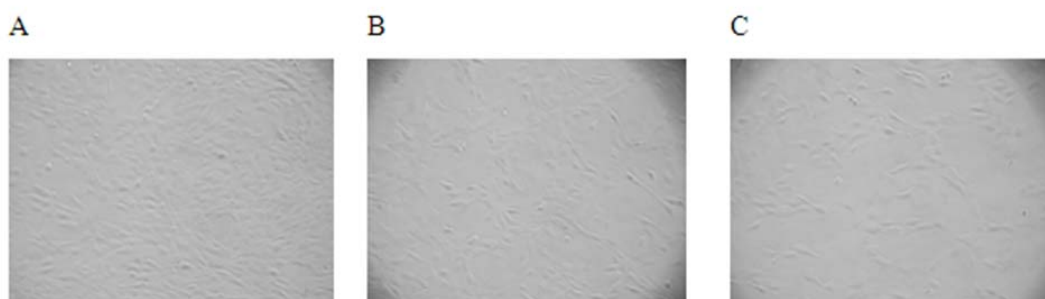
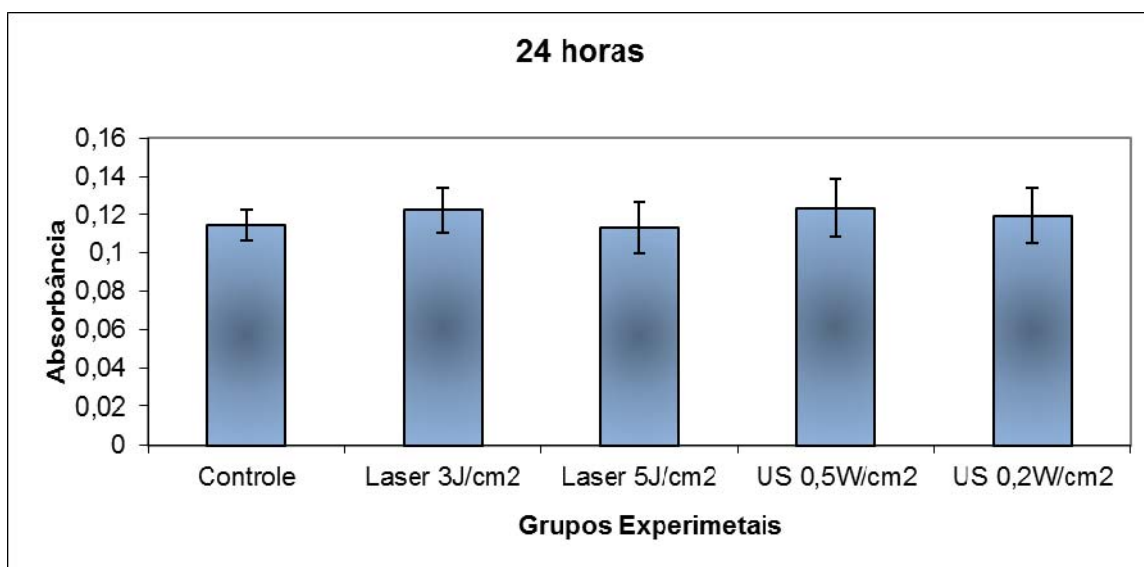


Figura 4. Avaliação da morfologia das células musculares (A) Controle; (B) Tratadas com o US; (C) Tratadas com o LBI.



5.2. Resultados não publicados e discussão

3.7.

3.7.

3.7.

3.7.

3.7.

1.4.

1.1.2.

5.2.1 Tratamento com LBI e US concomitante à indução da diferenciação celular.

Não houve diferença estatisticamente significativa na proliferação celular avaliada pelo método MTT, entre as células musculares submetidas a tratamento com ambos os recursos e as células controle nos períodos de 24 e 48 horas (figuras 5 e 6).

Figura 5. Avaliação da proliferação de células musculares submetidas a tratamento com LBI e US e concomitante incubação em meio de diferenciação (2% de Soro de Caval) por 24 horas não apresentando diferença estatisticamente significativa.

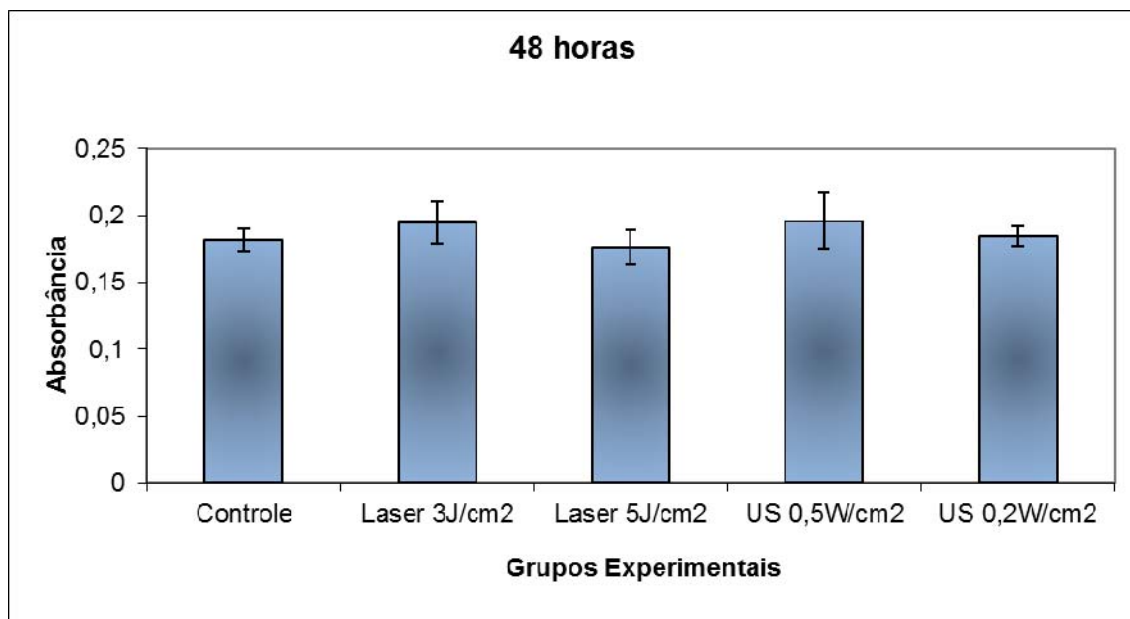


Figura 6. Avaliação da proliferação de células musculares submetidas a tratamento com LBI e US e concomitante incubação em meio de diferenciação (2% de Soro de Cavalos) por 48h, não apresentando diferença estatisticamente significativa.

Os resultados permitiram verificar que houve uma redução significativa na proliferação celular das células musculares submetidas a tratamento com Laser 5J/cm² no período de 96 horas de diferenciação celular comparado as células controle e aos demais grupos experimentais (figura 5).

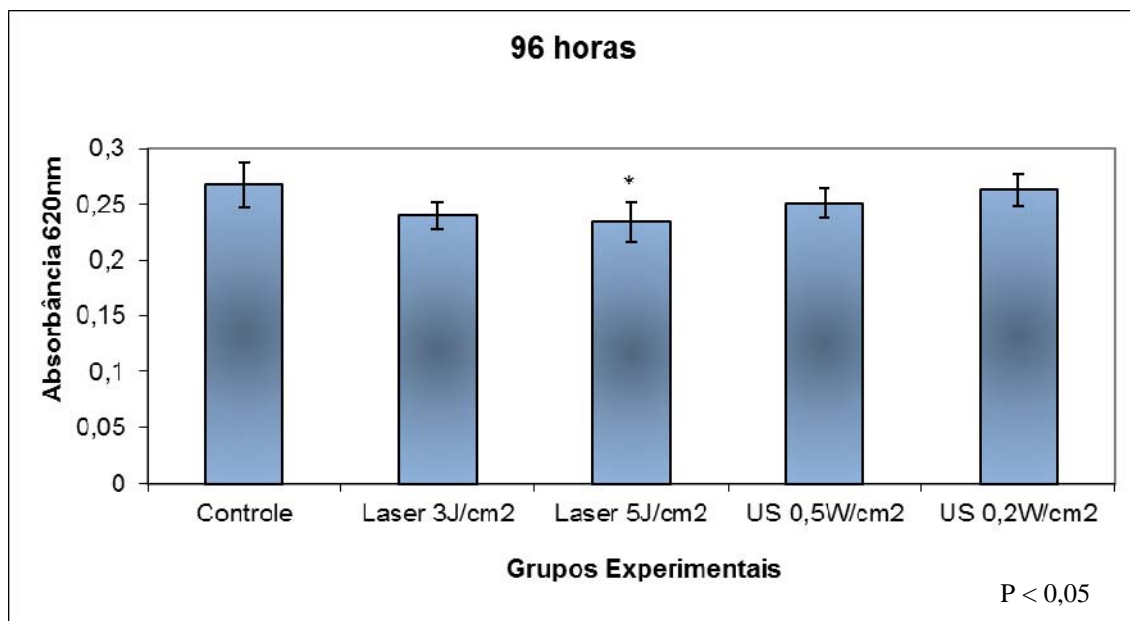


Figura 7. Avaliação da proliferação de células musculares submetidas a tratamento com LBI e US e concomitante incubação em meio de diferenciação (2% de Soro de Caval) por 96 horas, apresentando diminuição estatisticamente significativa no número de células no grupo 5J/cm².

A redução de proliferação pode sugerir que o processo de diferenciação foi acelerado, uma vez que os mioblastos proliferam-se, mas permanecem indiferenciados por fatores mitogênicos presentes no soro fetal bovino e a retirada do soro (substituição por soro de cavalo – pouco mitogênico) leva à saída irreversível do ciclo celular e ativação de genes específicos envolvidos na diferenciação causando a fusão de miotubos multinucleados. E durante a miogênese, a fusão de mioblastos em miotubos multinucleados é o passo terminal de diferenciação. Após isso, divisões mitóticas não ocorrem mais ^{1,2}.

Os estudos de Ferreira et al (2009) e Mesquita-Ferrari (2011) avaliaram o efeito do laser em baixa intensidade sobre mioblastos C2C12 em diferentes condições nutricionais, mostrando que os diferentes tipos de laser (AsGaAl e InGaAlP), em diferentes intensidades (3.8, 6.3 e 10 J/cm², e 3.8, 10 e 17.5 J/cm², respectivamente), não foram capazes de alterar a proliferação celular de células cultivadas tanto em nutrição regular quanto em situação de deficiência nutricional (modelo de simulação de lesão) em diferentes períodos de incubação avaliados⁴⁵. Porém, nestes estudos não houve a indução de diferenciação com soro de cavalo uma vez que o objetivo era verificar se o LBI seria capaz de induzir a diferenciação.

Desta forma, os resultados obtidos no presente estudo, que utilizou a indução da diferenciação com SC, permitiram verificar que o LBI na densidade de $5\text{J}/\text{cm}^2$ foi capaz de modular a proliferação celular.

3.7.

3.7.

5.1.3.

6.1.3.

7.1.3.

8.1.3.

5.2.2. Diferenciação celular avaliada por atividade de CK

Os resultados permitiram verificar que após 1 dia de diferenciação, não houve diferença da atividade de CK entre os grupos controle e tratados com ambos recursos terapêuticos, já após 3 dias de diferenciação, foi possível verificar um aumento da atividade de CK no tratamento concomitante à indução da diferenciação celular, entre as células submetidas a tratamento com laser $5\text{J}/\text{cm}^2$ comparado as células controle (figura 6).

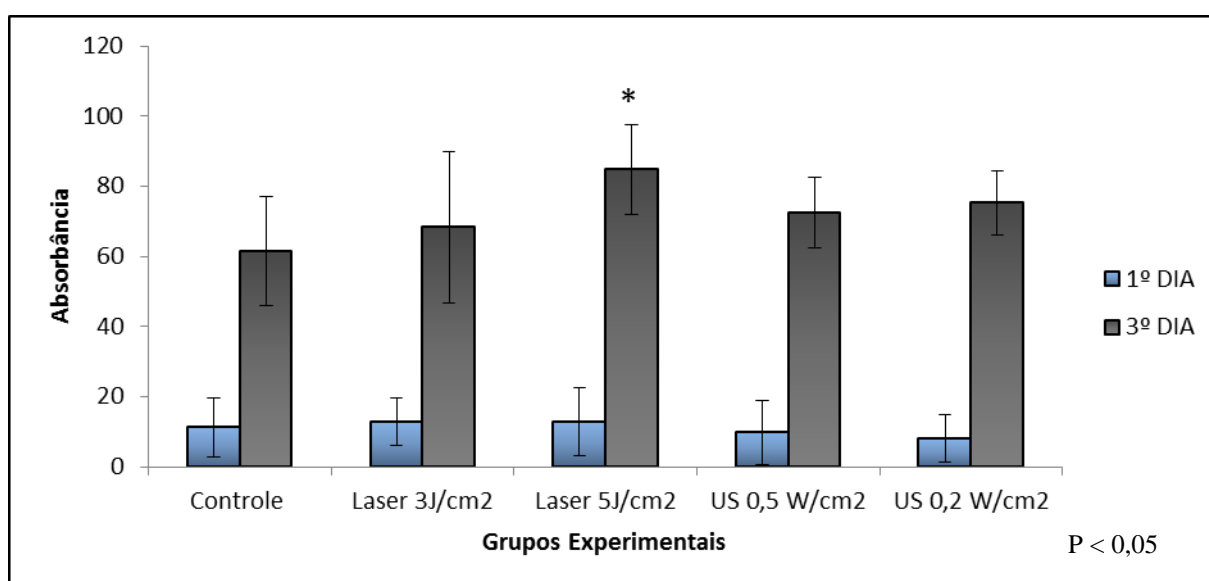


Figura 8. Avaliação da diferenciação celular por atividade de CK. Apresentando aumento significativo no grupo $5J/cm^2$ no período de 3 dias após tratamento concomitante à indução da diferenciação celular.

Diel et al 2008⁶⁰ verificou uma diminuição da proliferação celular e consequente aumento dos níveis de CK intracelular de acordo com o aumento do tempo de diferenciação celular ao analisar a capacidade dos anabolizantes esteroides de induzir e modular a diferenciação de células C2C12 nos períodos de 1, 3 e 6 dias de diferenciação. Já Jeffery et al 2001 avaliou os níveis de CK intracelular nos períodos de 1, 3 e 5 dias de diferenciação celular frente à regeneração muscular na distrofia miotônica, encontrando aumento nos níveis de CK de acordo com o aumento do tempo de diferenciação celular. Contudo, a diferenciação destas células relacionada ao tratamento com LBI e US não foi avaliada.

**ARTIGO 1 - Aceito para publicação na Revista Fisioterapia em Movimento
(carta de aceite – Anexo I)**

**ANÁLISE COMPARATIVA DOS EFEITOS DO ULTRASSOM TERAPÊUTICO
E LASER DE BAIXA POTÊNCIA SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS
MUSCULARES DURANTE A DIFERENCIAÇÃO CELULAR.**

Comparative analysis between the effects of therapeutic ultrasound and low power laser on the proliferation of C2C12 myogenic precursor cells during cell differentiation

Ouvir

Ler foneticamente

Artilheiro PP¹, Barbosa JLP², Oliveira EN¹, Oliveira TS², Bussadori SK³, Fernandes KPS³, Mesquita-Ferrari RA³.

¹ Mestranda em Ciências da Reabilitação, Universidade Nove de Julho – UNINOVE, São Paulo, SP, Brasil.

² Aluno do curso de biomedicina da Universidade Nove de Julho – UNINOVE, São Paulo, SP, Brasil.

³ Docente do Mestrado em Ciências da Reabilitação, Universidade Nove de Julho -UNINOVE, São Paulo, SP, Brasil.

Título para as páginas: Diferenciação e células musculares

Autor correspondente:

Profa Dra Raquel Agnelli Mesquita Ferrari

Programa de Mestrado em Ciências da Reabilitação

Universidade Nove de Julho - UNINOVE

Rua Vergueiro, 235, CEP 01504001

São Paulo-SP

tel (11)3385-9222

e-mail- raquel.mesquita@gmail.com

RESUMO

Existe um grande interesse no estabelecimento de recursos e terapias a serem utilizados na tentativa de proporcionar um processo de reparo muscular de melhor qualidade e menor duração. O ultrassom terapêutico e o laser de baixa potência são recursos muito usados na prática clínica, porém são escassas, e por vezes contraditórias, as evidências científicas que determinem com segurança os parâmetros dosimétricos e metodológicos adequados. O objetivo do estudo foi analisar o efeito do ultrassom (US) terapêutico e do laser de baixa potência (LBP) sobre a proliferação durante a diferenciação de mioblastos C2C12. Os mioblastos foram cultivados em meio de cultura de "Eagle" modificado por Dulbecco, contendo 10% de soro fetal bovino (SFB), sendo induzida à diferenciação pela adição de 2% soro de cavalo durante 96 horas. Posteriormente as células foram irradiadas com US pulsado a 20%, 3MHz de frequência (intensidades de 0,2 e 0,5W/cm², durante 5 minutos) ou submetidas ao tratamento com LBP (potência de saída de 10mW, densidade de energia de 3 e 5J/cm², por 20 segundos). As células não irradiadas serviram como controles. Foram realizados três experimentos independentes, em cada condição citada. A proliferação celular foi avaliada após 24 e 72h utilizando o método de MTT. Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística utilizando a Análise de Variância (ANOVA), teste Dunnet, para verificar diferenças entre o grupo controle (não tratado) e os grupos tratados com US e LBP adotando significância de $p < 0.05$. Os resultados evidenciaram que não houve diferença significativa na proliferação celular, entre as células musculares submetidas a tratamento com ambos os recursos terapêuticos e as células controle, nos períodos de 24 e 72h após tratamento. Além disso, foi possível verificar que não houve aumento significativo no número de células após o período de 72h quando comparado a 24h, confirmando o processo de

diferenciação celular, conforme esperado. Conclui-se que o US e o LBP, nos parâmetros avaliados, não alteraram a proliferação de mioblastos em processo de diferenciação.

Palavras-chave: Ultrassom terapêutico, Laser, Mioblastos, Diferenciação, Proliferação.

ABSTRACT

There is great interest in establishing resources and therapies to be used in an attempt to provide a process of muscle repair better and shorter. Two features commonly used to facilitate the healing process are the therapeutic ultrasound and laser power, however, are still scarce and sometimes contradictory scientific evidence to determine with certainty the dosimetric parameters and methodology necessary to acquire these goals. Thus, the objective of this project was examine the effect of ultrasound (U.S.) continuous therapeutic (Sonomaster - KW) and the effect of low power laser GaAlAs 660nm (Twin-Laser ®) on the proliferation and differentiation of C2C12 myoblasts. The myoblasts were cultivated in culture medium of Eagle modified by Dulbecco, containing 10% fetal bovine serum (bsf), were induced to differentiate by addition of 2% horse serum for 96 hours. Subsequently, cells were irradiated with pulsed U.S. using 20%, frequency of 3MHz, the intensities of 0.2 and 0.5 W/cm² for 5 minutes or be subjected to treatment with low power laser (output power of 10mW, density Power of 3 and 5J/cm² for 20 seconds). The non-irradiated cells serve as controls. Three independent experiments were performed for each condition cited. Cell proliferation was evaluated after 24 and 72h using the MTT method. The results were statistically analyzed using analysis of variance (ANOVA), Dunnet test to check differences between the control (untreated) and groups treated with laser and ultrasound adopting significance of $p < 0.05$. The results showed that no significant differences in viability and cell proliferation, between muscle cells subjected to treatment and control cells, for periods of 24 and 72 h after treatment. Furthermore, was observed no increase in the number of cells within the evaluation period after treatment, confirming the process of cell differentiation, as expected. Hence

U.S. and the Laser of low power, in the same parameters, was not able to alter the viability and proliferation of myoblasts.

[Ouvir](#)

[Ler foneticamente](#)

Dicionário - [Ver dicionário detalhado](#)

Keywords: Ultrasound therapy, Laser, Myoblasts, Differentiation, Proliferation.

INTRODUÇÃO

A miogênese ou a formação do músculo esquelético é um processo altamente 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 que, finalmente desenvolvem-se para se tornarem miofibrilas do músculo esquelético maduro^{1,2}.

A fusão de mioblastos de mamíferos ocorre em duas fases³. Inicialmente, mioblastos se fundem a outros para formar pequenos miotubos. Adicionalmente, outros mioblastos se fundem a esses miotubos para formar miotubos maiores e maduros^{4,5}. Durante a miogênese, a fusão de mioblastos em miotubos multinucleados é o passo terminal de diferenciação. Após isso, divisões mitóticas dentro dos miotubos ou fibras musculares não ocorrem mais. Núcleos extras, requeridos para crescimento muscular, são garantidos pelas células satélites, que são células musculares quiescentes localizadas abaixo da membrana basal da fibra muscular. Estas células representam a maior parte do potencial regenerativo frente à lesão e adaptação musculares ao exercício⁶.

Nos diferentes estágios da miogênese, as células expressam distintos fatores regulatórios miogênicos envolvidos neste processo de diferenciação. Desmina, Myf5 e MyoD são expressos em estágios iniciais enquanto que miogenina, fator regulatório de miogenina (MRF4) e miosina são expressos nos estágios mais tardios. A expressão destes fatores também é regulada por moléculas de sinalização extracelular da MEC e, também, por outros fatores envolvidos no contato célula-célula^{7,8,9}.

A miogenina tem papel importante durante a miogênese, pois sua expressão marca o início da diferenciação, conseqüentemente, quando se expressa a miogenina, as fibras musculares desenvolvem-se a partir dos mioblastos previamente formados¹⁰. Por outro lado, a miostatina inibe a proliferação e diferenciação celular e se expressa predominantemente no desenvolvimento muscular¹¹. Estudos prévios relataram uma influência negativa da miostatina sobre a proliferação celular. Parâmetros testados levou à confirmação de que a expressão de miostatina está fortemente inibida na fase terminal da diferenciação^{11,12,13}.

Quando um músculo sofre uma lesão, este tem a habilidade de iniciar um processo de reparo altamente organizado de forma a prevenir a perda de massa muscular sendo capaz de restaurar a citoarquitetura dentro de um período de aproximadamente 2 semanas. Este processo é semelhante à miogênese, porém as células que participam são as células satélites^{14,15}(Shi & Garry, 2006; Chargè et al, 2004). Uma vez ativadas, as células satélites proliferam sendo então denominadas mioblastos e também expressam os fatores reguladores miogênicos que controlam a proliferação e a diferenciação celular. Essas células se fundem a fibras musculares já existentes ou fundem-se a células satélites vizinhas para gerar novas fibras musculares^{16,17}.

Há evidências de que o reparo tecidual possa ser estimulado por recursos terapêuticos como o ultrassom e laser de baixa potência sendo estes recursos amplamente utilizados na prática clínica, porém, muitos dos estudos são contraditórios no que diz respeito aos parâmetros dosimétricos adequados para promover a regeneração muscular de forma mais rápida e de melhor qualidade frente aos diferentes tipos de lesão^{18,19}.

Uma das modalidades terapêuticas mais utilizadas no tratamento de lesões de tecidos moles é o ultrassom, com o objetivo de proporcionar um processo de reparo muscular de melhor qualidade e menor duração. As ondas ultrassônicas causam vibrações e colisões moleculares, aumentando a atividade molecular e, por consequência, o aumento da temperatura²⁰.

A energia do US que penetra no organismo pode afetar as células e tecidos por meio de mecanismos térmicos e não térmicos e as estruturas aquecidas preferencialmente pelo US incluem músculos, tendões, cicatrizes e a maioria das raízes nervosas. Evidências mostram que mecanismos não térmicos estariam envolvidos na produção dos efeitos terapêuticos primários do US, isto é, a estimulação da regeneração tecidual por meio do aumento da permeabilidade e difusão em nível membrana celular, influxo de cálcio intracelular e alterações na atividade elétrica do tecido nervoso^{21,22}.

Estudos *in vitro* demonstraram que os efeitos do US parecem ser dependente do tipo celular, sendo que promove a síntese de DNA em osteoblastos humanos, fibroblastos de gengiva e pele, células de periósteo, mas não em condrócitos²³. Com relação ao efeito do US sobre a proliferação celular foi verificado inicialmente por Jonhs et al²¹ que o US contínuo e pulsado

em intensidades de 0,1 a 0,7W/cm² era capaz de diminuir a taxa de crescimento celular porém, em estudos posteriores, foi evidenciado que o US utilizado nas frequências de 1 e 3 MHz em intensidades variadas promovia aumento da proliferação de fibroblastos e osteoblastos^{24,25,26,27,28,29}.

Os estudos mais recentes que avaliaram o potencial terapêutico do US foram realizados em osteoblastos^{30,31,32}, condrócitos^{33,34,35}, fibroblastos³⁶, células epiteliais³⁷ e células endoteliais³⁸.

O enorme potencial terapêutico do US está longe de ser estabelecido em virtude de novas aplicações serem adicionadas regularmente ao seu repertório³⁹. Assim, o melhor entendimento sobre os efeitos do US sobre as células musculares poderá contribuir de forma positiva para o estabelecimento de protocolos adequados para a melhoria do processo de reparo muscular e da recuperação clínica dos pacientes.

Outro recurso muito utilizado na prática clínica após lesões musculares é o laser de baixa potência, ou seja, aquele que possui baixa energia e ausência de potencial foto-térmico. Existem diversos tipos sendo os mais usados os que se encontram na porção óptica do espectro vermelho e do infra-vermelho (400 a 780 nm e 780 a 1mm). Seus fótons de energia são inferiores a 2,0 elétron-volt (eV), portanto, inferiores à energia da ligação das moléculas biológicas e do DNA, não podendo quebrar ligações químicas e não sendo capazes de induzir mutação e carcinogênese^{40,41}.

Estudos têm mostrado que o laser é capaz de influenciar a proliferação de fibroblastos^{42,43}, osteoblastos⁴⁴, e células epiteliais⁴⁵. Além disso, essa terapia também possui efeitos sobre o colágeno e a síntese de colágeno^{46,43}. Mais recentemente, um estudo analisou os efeitos do laser de AsGaAL nos parâmetros de 830 nm (0,3J/cm²), 685 nm (0,6J/cm²) e 670 nm (1,2J/cm²) sobre células precursoras miogênicas e concluiu que a taxa de proliferação celular induzida por estas irradiações foi de 84,3%, 70,6% e 56,8% respectivamente⁴⁷.

Os efeitos miogênicos da irradiação com Laser de Baixa Potência nas células se baseiam na capacidade de modulação de diversos processos metabólicos, mediante a conversão da energia luminosa aportada pelo laser através de processos bioquímicos e fotofísicos, os quais transformam a luz laser em energia útil para as mesmas^{41,43,48,47,40,44}.

O efeito de bioestimulação depende da combinação de parâmetros como comprimento de onda, potência, intensidade e também do tipo celular a ser avaliado^{43,48,41,47,40,44}.

Dificuldades na medição de variáveis relacionadas à dor e reparação tecidual em modelos animais ou em ambientes clínicos enfatizam a necessidade de estudos in vitro relacionados ao uso do Laser⁴⁹.

Nosso grupo de pesquisa iniciou em 2007 os primeiros estudos avaliando o efeito de ambas as modalidades terapêuticas descritas em células precursoras miogênicas da linhagem C2C12, porém, detectou que estes recursos, nos parâmetros utilizados, não foram capazes de alterar a proliferação de mioblastos. Deste modo, nossa proposta foi avaliar, de forma comparativa, os possíveis efeitos do laser e ultrassom terapêutico sobre a proliferação das células musculares após 96h de diferenciação com soro de cavalo.

É importante ressaltar que os mioblastos C2C12 derivam de músculo esquelético de camundongos, exibem a maioria das características dos mioblastos normais e diferenciam-se em cultura, propiciando um bom modelo para estudar a regeneração muscular. Além disso, o uso linhagens celulares em modelos para análise de proliferação celular elimina a possibilidade da influência da irradiação laser sobre a produção de fatores de crescimento por células não miogênicas contidas em culturas primárias, como fibroblastos e macrófagos^{50,47,1}.

MATERIAL E MÉTODOS

Cultura celular

A linhagem celular C2C12 utilizada no presente trabalho é um subclone da linhagem celular de mioblastos C2, células derivadas de células-satélite de ratos adultos^{36,37}. Estas células foram cultivadas no meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Cultilab, Campinas, SP, Brasil) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e 1% antibiótico solução antimicótica (CULTILAB) e mantidas em estufa 37°C, numa atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. O monitoramento do crescimento celular foi feita a cada 24 horas e quando a monocamada celular se tornava subconfluenta para a perpetuação da linhagem celular, foi realizado o subcultivo com lavagem tampão PBS1X (NaCl 140mM; KCl 2,5mM; Na₂HPO₄ 8mM; KH₂PO 1,4mM; pH 7,4) e solução de tripsina. As células foram centrifugadas a 1200rpm e posteriormente ressuspensas em 1ml de meio DMEM. A viabilidade das células foi avaliada por contagem com corante vital azul de Trypan (0,4%) e foram utilizadas nos experimentos as células com viabilidade maior que 95%.

Para indução da diferenciação as células foram mantidas em meio DMEM contendo 2% soro de cavalo por um período de 96h e, após este, foi realizado o tratamento das células com os recursos laser e ultra-som.

Ensaio de proliferação celular (MTT)

A metodologia utilizada para avaliação da viabilidade e proliferação celular se baseia na habilidade da enzima mitocondrial desidrogenase, encontrada somente em células viáveis, em clivar os anéis de tetrazólio do MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue), formando cristais azuis escuros de formazana, os quais são impermeáveis às membranas celulares, ficando então retidos no interior das células viáveis⁵¹. A posterior lise celular faz com que estes sais de formazana sejam liberados. O número de células viáveis é diretamente proporcional ao nível de cristais de azul de formazana formados.

Foram utilizadas para este ensaio 1×10^3 células/poço adicionadas a placas de cultura de fundo chato de 96 poços, estéreis²⁰ e incubadas a 37°C e 5%CO₂ durante os diferentes períodos de incubação avaliados, ou seja, 24 e 72 horas após o período de 96h em que ficaram na presença de meio de

diferenciação (DMEM com 2% de soro de cavalo). Ao término do período de incubação, foi feita a lavagem dos poços com PBS1X (NaCl 140mM; KCl 2,5mM; Na₂HPO₄ 8mM; KH₂PO 1,4mM; pH 7,4) para remoção das células mortas e adicionado o MTT (0,5 µg/ml) (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e realizada a incubação das células por 4h a 37°C e 5%CO₂. Em seguida, foi adicionado isopropanol para solubilizar os cristais formados. Por fim, foi realizada a leitura da absorbância a 620nm com auxílio de um leitor de placas (Anthos 2020, Anthos Labtec Instruments, Wals, Áustria) (Mosmann 1983, Woerdenbag, 1994). Todos os experimentos foram repetidos 3 vezes, de forma independente, e cada amostra foi analisada em quadruplicata.

Para avaliar a morfologia das células musculares frente ao tratamento com o US e LBP foram feitos registros fotográficos com auxílio do microscópio invertido (Nikon) antes da realização da avaliação da proliferação pelo método de MTT, ou seja, também após 24 e 72h.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

As comparações entre os grupos foram feitas utilizando análise de variância (ANOVA). O teste de Dunnett foi utilizado para determinar diferenças significativas entre os grupos experimentais e o grupo controle. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Os dados foram analisados por meio do programa GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, E.U.A.).

RESULTADOS

Efeitos do US e LBP sobre a proliferação celular

Os resultados permitiram verificar que não houve diferença significativa na proliferação celular, avaliada pelo método MTT, entre as células musculares submetidas a tratamento com ambos os recursos terapêuticos e as células controle, tanto no período de 24h (figura 1), quanto no período de 72h (figura1).

Além disso, foi possível verificar que não houve modificação significativa no número de células quando comparados os períodos de 24 e 72h de incubação após o tratamento com os recursos, confirmando o processo de diferenciação celular, conforme esperado (figura 1).

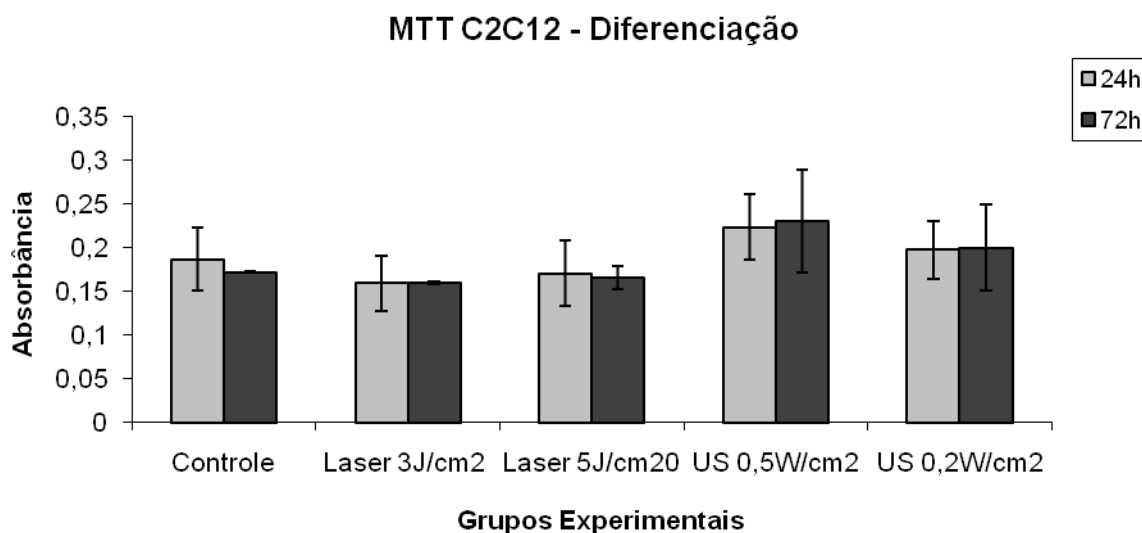


Figura 1. Avaliação da proliferação e viabilidade de células musculares cultivadas em meio regular (10% de SFB) por 24 e 72h, na ausência (controle) e presença de tratamento com US e Laser de baixa potência, não apresentando aumento significativo no número de células dentro dos períodos de 24 e 72h após tratamento, confirmando o processo de diferenciação celular.

Com relação a morfologia das células musculares também foi possível observar que os recursos terapêuticos utilizados não provocaram alterações evidentes, quando avaliada de maneira qualitativa por dois examinadores experiente de forma independente e cega. Como não existiram diferenças

apenas uma figura representativa de cada grupo experimental foi adicionada (figura 2).



Figura 2: Avaliação da morfologia das células musculares (A) Controle; (B) Tratadas com o US; (C) Tratadas com o LBP.

DISCUSSÃO

Segundo Johns²¹, a cultura celular é, por definição, um artefato; no entanto, permite que o investigador tenha um controle rigoroso sobre diversas variáveis do processo e possa fazer questionamentos de maneira mais sistemática. Portanto, estudos *in vitro* avaliando o potencial do US e Laser de baixa potência são importantes complementos dos estudos *in vivo*, e podem trazer maiores conhecimentos de forma a permitir a utilização desse recurso de forma mais eficaz e segura.

A linhagem celular C2C12 foi utilizada neste estudo, pois essas células são um subclone da linhagem de mioblastos C2, isoladas de células-satélites de ratos adultos⁵², que apresentam a maioria das características dos mioblastos normais e são comumente usadas como modelo para estudar a proliferação e a diferenciação de células musculares. O uso de linhagens celulares como modelo para a análise da proliferação celular elimina a possibilidade de o US e o Laser de baixa potência interferirem na produção de fatores de crescimento de células não-miogênicas contidas em culturas primárias, como fibroblastos e macrófagos^{50,53}.

O presente estudo avaliou os efeitos do US e LBP em células musculares após o processo de diferenciação celular com o intuito de acumular maior conhecimento acerca da utilização desses recursos para o reparo tecidual após lesões, distrofias e outras condições nas quais a proliferação de células musculares é requerida. No entanto, os resultados evidenciam que o tratamento dessas células com o US e o LBP em curto prazo não alterou a proliferação, quando comparadas às células que não receberam tratamento. É importante ressaltar que, as células expostas aos tratamentos e o grupo controle receberam estímulo para diferenciação com o soro de cavalo 96h antes da realização dos experimentos e a comparação da proliferação de 72h e 24h permitiu verificar que não houve alteração no número de células o que comprova a eficiência do protocolo de diferenciação utilizado.

Contudo, estudos *in vivo* demonstram efeitos do US sobre o tecido muscular como verificado por Maddi et al³¹ que utilizaram o US pulsado em modelo experimental de lesão contusa em músculo gastrocnêmio de rato e encontraram um aumento na proliferação de células satélites. Além disso,

em outros estudos verificaram que o tratamento com US melhora a extensibilidade muscular⁴³, a produção de força após lesão por contração³⁴ e pode aumentar a diferenciação das células musculares em modelo animal³⁸. Como o US acelera o processo de reparo em diversos estudos *in vivo*, é possível que esse efeito dependa da ação coordenada de diferentes tipos celulares presentes em tecidos adjacentes ao tecido muscular, como por exemplo o conjuntivo. Há a possibilidade de que o efeito do US e LBP no processo de reparo seja dependente da estimulação de outras células, que passariam a secretar fatores de crescimento envolvidos na proliferação e diferenciação das células musculares, em resposta aos recursos⁵⁴.

No entanto, outros autores que também utilizaram modelo experimental animal, foram igualmente incapazes de demonstrar aumento estatisticamente significativo na massa muscular ou na regeneração tecidual em lesões musculares tratadas com o US^{41,35}. Essa controvérsia apóia a falta de evidência científica sobre a eficácia do US na reparação muscular^{26,38,33}.

Outros estudos *in vitro* demonstraram que os efeitos do US foram dependentes dos parâmetros utilizados e do tipo celular, sendo capaz de promover a proliferação de osteoblastos, fibroblastos^{23,27,36,37}, células endoteliais³⁴ e condrócitos³⁸. No entanto, outros autores não demonstraram de forma significativa os efeitos aditivos do US sobre a proliferação de fibroblastos⁵⁵, de células provenientes de discos intervertebrais de bovinos³⁴, de células uro-epiteliais³⁷ ou até mesmo relatam diminuição no número de fibroblastos³⁵ após o tratamento com US.

Da mesma forma que o efeito de bioestimulação do LBP depende da combinação de parâmetros como comprimento de onda, potência, intensidade e também do tipo celular a ser avaliado^{43,48,41,47,40,44}.

Segundo Almeida-Lopes e Marques MM,^{42,43} o laser é capaz de influenciar a proliferação de fibroblastos, osteoblastos⁴⁴, e células epiteliais⁴⁵. Além disso, essa terapia também possui efeitos sobre o colágeno e a síntese de colágeno^{46,43}. Mais recentemente, um estudo analisou os efeitos do laser de AsGaAL nos parâmetros de 830 nm (0,3J/cm²), 685 nm (0,6J/cm²) e 670 nm (1,2J/cm²) sobre células precursoras miogênicas e concluiu que a taxa de

proliferação celular induzida por estas irradiações foi de 84,3%, 70,6% e 56,8% respectivamente⁴⁷.

O presente estudo permitiu concluir que o US e o LBP, nos parâmetros utilizados não foram capazes de alterar a proliferação das células musculares, em diferenciação, porém há necessidade da realização de estudos posteriores para o melhor entendimento de outros possíveis efeitos desses recursos sobre essas células como, por exemplo, a utilização desses recursos como meio de prevenção à lesão e posterior diferenciação, para o estabelecimento de protocolos adequados a serem utilizados para o reparo muscular e recuperação clínica em atletas e pacientes.

REFERÊNCIAS

1. Kumar A, Mohan S, Newton J, Rehage M, Tran K, Baylink DJ. Pregnancy-associated plasma protein-A regulates myoblast proliferation and differentiation through an insulin-like growth factor-dependent mechanism. *J Biol Chem*. 2005;280(45):37782-9.
2. Dogra C, Hall SL, Wedhas N, Linkhart TA, Kumar A. Fibroblast growth factor inducible-14 (Fn14) is required for the expression of myogenic regulatory factors and differentiation of myoblasts into myotubes: evidence for Tweak-independent functions of Fn14 during myogenesis. *J Biol Chem*. 2007;282(20):15000-10.
3. V. Horsley and G. K. Pavlath: Forming a multinucleated cell: molecules that regulate myoblast fusion. *Cells Tissues Organs*. 176(1-3), 67-78 (2004).
4. Chen Y, Zajac JD, MacLean HE. Androgen regulation of satellite cell function. *Journal of Endocrinology* 2005; 186, 21-31.
5. Jansen, K.M. and Pavlath, G.K. (2006) Mannose receptor regulates myoblast motility and muscle growth. *J Cell Biol*. 174(3):403-13.
6. Dogra C, Hall SL, Wedhas N, Linkhart TA, Kumar A. Fibroblast growth factor inducible-14 (Fn14) is required for the expression of myogenic regulatory factors and differentiation of myoblasts into myotubes: Evidence for TWEAK-independent functions of Fn14 during myogenesis. *J Biol Chem* 2007;282(20):15000-10.
7. Dominov, JÁ. Jonathan J. Dunn, and Jeffrey Boone Miller Bcl-2 Expression Identifies an Early Stage of Myogenesis and Promotes Clonal Expansion of Muscle Cells - *The Journal of Cell Biology*, Volume 142, Number 2, July 27, 1998 537–544.
8. Cabane C, W Englaro, K Yeow, M Ragno, B Derijard. Regulation of C2C12 myogenic terminal differentiation by MKK3/p38 pathway. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 284: C658-C666, 2003.
9. Tannu, NS. Vamshi K. Rao, Ritcha M. Chaudhary, Francesco Giorgianni Abdelwahab E. Saeed, Yong Gao, and Rajendra Raghov - Comparative Proteomes of the proliferating C2C12 Myoblasts and Fully Differentiated Myotubes Reveal the Complexity of the Skeletal Muscle Differentiation Program - 2004 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.
10. Schierholt A.S., I. Fonseca, P.V. Silva, S.R. Paiva, L.C.S. Chaves, P.S. Lopes.
11. Dominique Joulia, Henri Bernardi, Ve´ronique Garandel, Fanjaniriana Rabenoelina, Barbara Vernus, and Ge´rard Cabello Mechanisms involved in the inhibition of myoblast proliferation and differentiation by myostatin - *Experimental Cell Research* 286 (2003) 263–275
12. Rios. R, I. Carneiro, V.M. Arce, J. Devesa, Myostatin is an inhibitor of myogenic differentiation, *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 282 (2002) C993–999.
13. Langley B, M. Thomas, A. Bishop, M. Sharma, S. Gilmour, R. Kambadur, Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 49831–49840.
14. Shi X, Garry DJ. Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. *Genes Dev*. 2006;20:1692–708.
15. Chargè SBP, Rudnicki MA. Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration. *Physiol Rev* 2004; 84: 209–238.
16. Foschini, RMSA, Fernando Silva Ramalho Harley E. A. Bicas Myogenic satellite cells - *Arq Bras Oftalmol*. 2004;67(4):681-7
17. Holterman, C.E. & Rudnicki, M.A. Molecular regulation of satellite cell function. *Seminars in Cell & Dev. Biol.*, v. 16, p.575-584, 2005.
18. Huseyin Demir, MD,1* Pinar Menku, MD,2 Mehmet Kirnap, MD,1 Mustafa Calis, MD,1 and Ibrahim Ikizceli, MD Comparison of the Effects of Laser, Ultrasound, and Combined

- Laser/ultrasound Treatments in Experimental Tendon Healing - *Lasers in Surgery and Medicine* 35:84–89 (2004)
19. Galvão APL, Vanda Jorgetti, and Orivaldo Lopes da Silva Comparative Study of How Low-Level Laser Therapy and Low-Intensity Pulsed Ultrasound Affect Bone Repair in Rats - *Photomedicine and Laser Surgery* Volume 24, Number 6, 2006
 20. Costa L.O.P., Costa L.C.M, Mendes P. L, Cançado R.L, Lara K.L., Lima M.D. Pozzi G.C. Effects of Heating by Ultrasound and Aerobic Activity on Flexibility of the Human Triceps Surae – A Comparative Study - *Fisioterapia em Movimento*, Curitiba, v.19, n.2, p. 19-24, abr./jun., 2006.
 21. Johns LD. Nonthermal Effects of Therapeutic Ultrasound: The Frequency Resonance Hypothesis. *Journal of Athletic Training* 2002;37(3):293–299.
 22. Hsieh YL, PT, PhD, is Assistant Professor, Department of Physical Therapy, Hung-Kuang University, Taichung, 34, Chung-Chie Road, Sha Lu, Taichung 433, Taiwan, Republic of China (sherrie@ms1.tcol.com.tw). - *Physical Therapy* . Volume 86 . Number 1 . January 2006.
 23. Zhou S, Schmelz A, Seufferlein T, Li Y, Zhao J, Bachem MG. Molecular Mechanisms of Low Intensity Pulsed Ultrasound in Human Skin Fibroblasts, *The journal of biological chemistry* 2004, 279(52): 54463–54469.
 24. Vivino AA, Boraker DK, Miller D, Nyborg W. Stable cavitation at low ultrasonic intensities induces cell death and inhibits 3H-TdR incorporation by Con-A-stimulated murine lymphocytes in vitro. *Ultrasound Med Biol*. 1985;11:751-9.
 25. Ramirez A, Schwane JA, McFarland C, Starcher B. The effect of ultrasound on collagen synthesis and fibroblast proliferation in vitro. *Med Sci Sports Exerc* 1997;29:326-32.
 26. Fahnestock M, Rimer VG, Yamawaki PR, Edmonds PD. Effects of ultrasound exposure in vitro on neuroblastoma cell membranes. *Ultrasound Med Biol* 1989;15:133-144.
 27. De Deyne PG, Kirsch-Volders M. In vitro effects of therapeutic ultrasound on the nucleus of human fibroblast. *Phys Ther* 1995;75:629-634.
 28. Doan N, Reher P, Meghji S, Harris M. In vitro effects of therapeutic ultrasound on cell proliferation, protein synthesis and cytokine production by human fibroblasts, osteoblasts and monocytes. *J Oral Maxillofac Surg* 1999;57:409-19.
 29. Reher P, Doan N, Bradnock B, Meghji S, Harris M. Effect of ultrasound on the production of IL-8, basic FGF and VEGF. *Cytokine* 1999;11:416-23.
 30. Harle J, Mayia F, Olsen I, Salih V. Effects of ultrasound on transforming growth factor-B genes in bone cells. *Eur Cell Mater* 2005;10:70-7.
 31. Maddi A, Hai H, Ong ST, Sharp L, Harris M, Meghji S. Long wave ultrasound may enhance bone regeneration by altering OPG/RANKL ratio in human osteoblast-like cells. *Bone* 2006;39:283-8.
 32. Tang CH, Yang RS, Huang TH, Lu DY, Chuang WJ, Huang TF, et al. Ultrasound stimulates cyclooxygenase-2 expression and increases bone formation through integrin, focal adhesion kinase, phosphatidylinositol 3-kinase, and akt pathway in osteoblasts. *Mol Pharmacol* 2006;69(6):2047-57
 33. Park K, Hoffmeister B, Han DK, Hasty K. Therapeutic ultrasound effects on interleukin-1B stimulated cartilage construct *in vitro*. *Ultrasound Med Biol* 2007;33(2):286-95.
 34. Miyamoto K, An HS, Sah RL, Akeda K, Okuma M, Otten L, et al. Exposure to pulsed low intensity ultrasound stimulates extracellular matrix metabolism of bovine intervertebral disc cells cultured in alginate beads. *Spine* 2005;30(21):2398-405.

35. Mukai S, Ito H, Nakagawa Y, Akiyama H, Miyamoto M, Nakamura T. Transforming growth factor B1 mediates the effects of low-intensity pulsed ultrasound in chondrocytes. *Ultrasound Med Biol* 2005;31(12):1713-21.
36. Lai JY, Pittelkow MR. Physiological effect of ultrasound mist on fibroblasts. *Int J Dermatol.* 2007;46(6):587–593.
37. Hill GE, Fenwick S, Matthews BJ, Chivers RA, Southgate J. The effect of low-intensity pulsed ultrasound on repair of epithelial cell monolayers *in vitro*. *Ultrasound Med Biol* 2005;31(12):1701-6.
38. Mizrahi N, Seliktar D, Kimmel E. Ultrasound-induced angiogenic response in endothelial cells. *Ultrasound in Med & Biol* 2007; 33(11): 1818–1829.
39. Warden RKF, Kessler CK, Avin KG, Cardinal RE, Stewart RL. Ultrasound Produced by a Conventional Therapeutic Ultrasound Unit Accelerates Fracture Repair. *Physical Therapy* 2006; 86(8):1118-1127.
40. Fujihara NA. Estudo da adesão, proliferação e síntese de proteínas por osteoblastos cultivados e submetidos à ação do laser de baixa potência. [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da Universidade São Paulo; 2002.
41. 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; 36:8–12
42. 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* 2001; 29: 179–184
43. 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; 34:260–265.
44. Fujihara NA, Hiraki KR, Marques MM. Irradiation at 780 nm increases proliferation rate of osteoblasts independently of dexamethasone presence. *Lasers Surg Med* 2006 ;38(4):332-6.
45. Eduardo F P, Dolores U. Mehnert, Telma A. Monezi, Denise M. Zzell, Mark M. Schubert, Carlos P. Eduardo, and Ma´rcia M. Marques Cultured Epithelial Cells Response to Phototherapy With Low Intensity Laser - *Lasers in Surgery and Medicine* 39:365–372 (2007).
46. Pereira AN, Eduardo CP, Matson E, Marques MM. Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. *Lasers Surg Med* 2002; 31:263–267
47. Amaral AC. Influência da terapia laser de baixa intensidade em células precursoras miogênicas (*in vitro*) e durante a regeneração muscular (*in vivo*) [dissertação]. São Carlos (SP): Univ. Federal de São Carlos; 2004.
48. 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* 2006; 21: 86–89.
49. Kreisler M, Christoffers AB, Willerstaussen B, d’Hoedt B. Effect of low-level GaAlAs laser irradiation on the proliferation rate of human periodontal ligament fibroblasts: an *in vitro* study. *J Clin Periodontal* 2003; 30: 353–358.
50. Lee, M-H., Jang, M-H., Kim, E-K., Han, S-W., Cho, S-Y., and Kim, C.J. (2005). Nitric oxide induces apoptosis in mouse C2C12 myoblast cells. *J. Pharmacol. Sci.* 97, 369 - 376.
51. Löster K, Horstkorte R. Enzymatic quantification of cell-matrix and cell-cell adhesion. *Micron* 2000;31:41-53.

52. Yaffe D, Saxel D. Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature*. 1977;270:725-7.
53. Ferreira MPP, Ferrari RAM, Gravalos ED, Martins MD, Bussadori SK, Gonzalez DAB, Fernandes KPS Effect of low-energy GaAIs and InGaAlP laser irradiation on the viability of C2C12 myoblasts in a muscle injury model.
54. Artilheiro,PP Elisangela Nascimento Oliveira, Crislene Sampaio Viscardi, Manoela Domingues Martins, Sandra Kalil Bussadori, Kristianne Porta Santos Fernandes, Raquel Agnelli Mesquita-Ferrari , Efeitos do ultra-som terapêutico contínuo sobre a proliferação e viabilidade de células musculares C2C12.
55. Effects of continuous therapeutic ultrasound on the proliferation and viability of C2C12 muscle cells - *Fisioterapia e Pesquisa*, São Paulo, v.17, n.2, p. , abr/jun. 2010.
56. Oliveira RF, Oliveira DA, Monteiro W, Zangaro RA, Magini M, Soares CP. Comparison between the effect of low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasonic irradiation in vitro. *Photomed Laser Surg*. 2008;26(1):6-9.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo avaliou os efeitos do LBI e US sobre a proliferação e diferenciação de mioblastos C2C12, avaliando os efeitos destes recursos após e concomitante ao processo de diferenciação celular induzido pela adição de 2% de Soro de Cavalo em meio DMEM durante 96 horas.

Na condição de tratamento após a indução da diferenciação celular o LBI e US não foram capazes de alterar o número de células durante a avaliação do tratamento após a diferenciação celular entre os grupos controle e tratados com ambas modalidades terapêuticas.

Contudo, na situação de tratamento concomitante à indução da diferenciação celular o tratamento com LBI na densidade de energia de 5J/cm² provocou uma redução na proliferação após 96h e aumento de atividade de CK após 3 dias o que pode sugerir uma aceleração no processo diferenciação.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kumar A, Mohan S, Newton J, Rehage M, Tran K, Baylink DJ. Pregnancy-associated plasma protein-A regulates myoblast proliferation and differentiation through an insulin-like growth factor-dependent mechanism. *J Biol Chem.* 2005;280(45):37782-9.
2. Dogra C, Hall SL, Wedhas N, Linkhart TA, Kumar A. Fibroblast growth factor inducible-14 (Fn14) is required for the expression of myogenic regulatory factors and differentiation of myoblasts into myotubes: evidence for Tweak-independent functions of Fn14 during myogenesis. *J Biol Chem.* 2007;282(20):15000-10.
3. Shi X and Garry DJ Myogenic regulatory factors transactivate the Tceal7 gene and modulate muscle differentiation 2010; 428: 213–221.
4. Dominov, JÁ. Jonathan J. Dunn, and Jeffrey Boone Miller Bcl-2 Expression Identifies an Early Stage of Myogenesis and Promotes Clonal Expansion of Muscle Cells - *The Journal of Cell Biology*, Volume 142, Number 2, July 27, 1998 537–544.
5. Cabane C, W Englaro, K Yeow, M Ragno, B Derijard. Regulation of C2C12 myogenic terminal differentiation by MKK3/p38 pathway. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 284: C658-C666, 2003.
6. Tannu, NS. Vamshi K. Rao, Ritcha M. Chaudhary, Francesco Giorgianni Abdelwahab E. Saeed, Yong Gao, and Rajendra Raghov - Comparative Proteomes of the proliferating C2C12 Myoblasts and Fully Differentiated Myotubes Reveal the Complexity of the Skeletal Muscle Differentiation Program - 2004 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.
7. Shi X, Garry DJ. Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. *Genes Dev.* 2006;20:1692–708.
8. Chargè SBP, Rudnicki MA. Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration. *Physiol Rev* 2004; 84: 209–238.
9. Foschini, RMSA, Fernando Silva Ramalho Harley E. A. Bicas Myogenic satellite cells - *Arq Bras Oftalmol.* 2004;67(4):681-7
10. Holterman, C.E. & Rudnicki, M.A. Molecular regulation of satellite cell function. *Seminars in Cell & Dev. Biol.*, v. 16, p.575-584, 2005.
11. Huseyin Demir, MD, Pinar Menku, MD, Mehmet Kirnap, MD, Mustafa Calis, MD, and Ibrahim Ikizceli, MD Comparison of the Effects of Laser, Ultrasound, and Combined LaserpUltrasound Treatments in Experimental Tendon Healing - *Lasers in Surgery and Medicine* 35:84–89 (2004)
12. Galvão APL, Vanda Jorgetti, and Orivaldo Lopes da Silva Comparative Study of How Low-Level Laser Therapy and Low-Intensity Pulsed Ultrasound Affect Bone Repair in Rats - *Photomedicine and Laser Surgery* Volume 24, Number 6, 2006.
13. Costa L.O.P., Costa L.C.M, Mendes P. L, Cançado R.L, Lara K.L., Lima M.D. Pozzi G.C. Effects of Heating by Ultrasound and Aerobic Activity on Flexibility of the Humam Triceps Surae – A Comparative Study - *Fisioterapia em Movimento*, Curitiba, v.19, n.2, p. 19-24, abr./jun., 2006.

14. Artilheiro PP, Oliveira EN, Viscardi CS, Martins MD, Bussadori SK, Fernandes KPS, Mesquita-Ferrari RA Efeitos do ultra-som terapêutico contínuo sobre a proliferação e viabilidade de células musculares C2C12 Fisioterapia e Pesquisa 2010; (17) - 167-72.
15. Johns LD. Nonthermal Effects of Therapeutic Ultrasound: The Frequency Resonance Hypothesis. *Journal of Athletic Training* 2002;37(3):293–299.
16. Mendonça AC, Ferreira AS, Barbieri CH, Thomazine JA, Mazzer N. Efeitos do ultra-som pulsado de baixa intensidade sobre a cicatrização por segunda intenção de lesões cutâneas totais em ratos. *Acta Ortop Bras.* 2006;14(3):152-7.
17. Hsieh YL, PT, PhD, is Assistant Professor, Department of Physical Therapy, Hung-Kuang University, Taichung, 34, Chung-Chie Road, Sha Lu, Taichung 433, Taiwan, Republic of China (sherrie@ms1.tcol.com.tw). - *Physical Therapy* . Volume 86 . Number 1 . January 2006.
18. Zhou S, Schmelz A, Seufferlein T, Li Y, Zhao J, Bachem MG. Molecular Mechanisms of Low Intensity Pulsed Ultrasound in Human Skin Fibroblasts, *The journal of biological chemistry* 2004, 279(52): 54463–54469.
19. Vivino AA, Boraker DK, Miller D, Nyborg W. Stable cavitation at low ultrasonic intensities induces cell death and inhibits 3H-TdR incorporation by Con-A-stimulated murine lymphocytes in vitro. *Ultrasound Med Biol.* 1985;11:751-9.
20. Ramirez A, Schwane JA, McFarland C, Starcher B. The effect of ultrasound on collagen synthesis and fibroblast proliferation in vitro. *Med Sci Sports Exerc* 1997;29:326-32.
21. Fahnestock M, Rimer VG, Yamawaki PR, Edmonds PD. Effects of ultrasound exposure in vitro on neuroblastoma cell membranes. *Ultrasound Med Biol* 1989;15:133-144.
22. De Deyne PG, Kirsch-Volders M. In vitro effects of therapeutic ultrasound on the nucleus of human fibroblast. *Phys Ther* 1995;75:629-634.
23. Doan N, Reher P, Meghji S, Harris M. In vitro effects of therapeutic ultrasound on cell proliferation, protein synthesis and cytokine production by human fibroblasts, osteoblasts and monocytes. *J Oral Maxillofac Surg* 1999;57:409-19.
24. Reher P, Doan N, Bradnock B, Meghji S, Harris M. Effect of ultrasound on the productin of IL-8, basic FGF and VEGF. *Cytokine* 1999;11:416-23.
25. Harle J, Mayia F, Olsen I, Salih V. Effects of ultrasound on transforming growth factor-B genes in bone cells. *Eur Cell Mater* 2005;10:70-7.
26. Maddi A, Hai H, Ong ST, Sharp L, Harris M, Meghji S. Long wave ultrasound may enhance bone regeneration by altering OPG/RANKL ratio in human osteoblast-like cells. *Bone* 2006;39:283-8.
27. Tang CH, Yang RS, Huang TH, Lu DY, Chuang WJ, Huang TF, et al. Ultrasound stimulates cyclooxygenase-2 expression and increases bone formation through integrin, focal adhesion kinase, phosphatidylinositol 3-kinase, and akt pathway in osteoblasts. *Mol Pharmacol* 2006;69(6):2047-57

28. Park K, Hoffmeister B, Han DK, Hasty K. Therapeutic ultrasound effects on interleukin-1B stimulated cartilage construct *in vitro*. *Ultrasound Med Biol* 2007;33(2):286-95.
29. Miyamoto K, An HS, Sah RL, Akeda K, Okuma M, Otten L, et al. Exposure to pulsed low intensity ultrasound stimulates extracellular matrix metabolism of bovine intervertebral disc cells cultured in alginate beads. *Spine* 2005;30(21):2398-405.
30. Mukai S, Ito H, Nakagawa Y, Akiyama H, Miyamoto M, Nakamura T. Transforming growth factor B1 mediates the effects of low-intensity pulsed ultrasound in chondrocytes. *Ultrasound Med Biol* 2005;31(12):1713-21.
31. Lai JY, Pittelkow MR. Physiological effect of ultrasound mist on fibroblasts. *Int J Dermatol.* 2007;46(6):587–593.
32. Hill GE, Fenwick S, Matthews BJ, Chivers RA, Southgate J. The effect of low-intensity pulsed ultrasound on repair of epithelial cell monolayers *in vitro*. *Ultrasound Med Biol* 2005;31(12):1701-6.
33. Mizrahi N, Seliktar D, Kimmel E. Ultrasound-induced angiogenic response in endothelial cells. *Ultrasound in Med & Biol* 2007; 33(11): 1818–1829.
34. Piedade MCB, Galhardo MS, Battlehner CN, Ferreira MA, Caldini EG, Toledo OMS Effect of ultrasound therapy on the repair of Gastrocnemius muscle injury in rats 2008; (48): 403-411.
35. Ribeiro R Efeito do ultra-som terapêutico pulsado na proliferação e atividade gelatinolítica de células musculares. Dissertação Mestrado Universidade Nove de Julho, São Pulo, 2009.
36. Warden RKF, Kessler CK, Avin KG, Cardinal RE, Stewart RL. Ultrasound Produced by a Conventional Therapeutic Ultrasound Unit Accelerates Fracture Repair. *Physical Therapy* 2006; 86(8):1118-1127.
37. Fujihara NA. Estudo da adesão, proliferação e síntese de proteínas por osteoblastos cultivados e submetidos à ação do laser de baixa potência. [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da Universidade São Paulo; 2002.
38. 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; 36:8–12
39. 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* 2001; 29: 179–184
40. 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; 34:260–265.
41. Fujihara NA, Hiraki KR, Marques MM. Irradiation at 780 nm increases proliferation rate of osteoblasts independently of dexamethasone presence. *Lasers Surg Med* 2006 ;38(4):332-6.

42. Eduardo F P, Dolores U. Mehnert, Telma A. Monezi, Denise M. Zezell, Mark M. Schubert, Carlos P. Eduardo, and Márcia M. Marques Cultured Epithelial Cells Response to Phototherapy With Low Intensity Laser - *Lasers in Surgery and Medicine* 39:365–372 (2007).
43. Pereira AN, Eduardo CP, Matson E, Marques MM. Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. *Lasers Surg Med* 2002; 31:263–267
44. Amaral AC. Influência da terapia laser de baixa intensidade em células precursoras miogênicas (in vitro) e durante a regeneração muscular (in vivo) [dissertação]. São Carlos (SP): Univ. Federal de São Carlos; 2004.
45. Ferreira MPP, Ferrari RAM, Gravalos ED, Martins MD, Bussadori SK, Gonzalez DAB, Fernandes KPS Effect of low-energy GaAIs and InGaAlP laser irradiation on the viability of C2C12 myoblasts in a muscle injury model. *Photomed. Laser Surg.* 2009;27(6):901-6
46. 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 (49) 423-428.
47. 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* 2006; 21: 86–89.
48. Gustavo Tralli Nogueira; Raquel Agnelli Mesquita Ferrari; Manoela Domingues Martins Sandra Kalil Bussadori; Tatiana Dias Silva; Kristianne Porta Santos Fernandes. Efeito da laserterapia de baixa potência sobre o tecido ósseo – Revisão de literatura *ConScientiae Saúde*, 2009;8(4):671-676.
49. Lee, M-H., Jang, M-H., Kim, E-K., Han, S-W., Cho, S-Y., and Kim, C.J. (2005). Nitric oxide induces apoptosis in mouse C2C12 myoblast cells. *J. Pharmacol. Sci.* 97, 369 -376.
50. Amack JD, Mahadevan MS. The myotonic dystrophy expanded CUG repeat tract is necessary but not sufficient to disrupt C2C12 myoblast differentiation. *Hum Mol Genet* 2001;10 (8):1879-87.
51. Kreisler M, Christoffers AB, Willerstaufen B, d'Hoedt B. Effect of low-level GaAIAS laser irradiation on the proliferation rate of human periodontal ligament fibroblasts: an in vitro study. *J Clin Periodontal* 2003; 30: 353–358.
52. Craig McFarlane, Alex Hennebry, Mark Thomas, Erin Plummer, Nicholas Ling, Ridula Sharma, Ravi Kambadur Myostatin signals through Pax7 to regulate satellite cell self-renewal – *Experimental Cell Research* 2008; 317 – 329
53. Löster K, Horstkorte R. Enzymatic quantification of cell-matrix and cell-cell adhesion. *Micron* 2000;31:41-53.
54. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65(2): 55-63.
55. Woerdenbag HJ, Merfort I, Passreiter CM, Schmidt TJ, Willuhn G, Van Uden W, Pras N, Kampinga HH, Konings AW. Cytotoxicity of flavonoids and

- sesquiterpene lactones from Arnica species against the GLC4 and the COLO 320 cell lines. *Planta Méd* 1994; 60(5):434-437.
56. Jeffrey D. Amack and Mani S. Mahadevan. The myotonic dystrophy expanded CUG repeat tract is necessary but not sufficient to disrupt C2C12 myoblast differentiation. *Human molecular genetics* 2001; 10(18): 1879-1887.
57. Esther Ardite, Joan Albert Barbera, Josep Roca, and Jose C. Fernández-Checa. Glutathione Depletion Impairs Myogenic Differentiation of Murine Skeletal Muscle C2C12 Cells through Sustained NF- κ B Activation. *American Journal of Pathology*, 2004; 165(3).
58. Bing-Hua Jiang, Jenny Z. Zheng, and Peter K. Vogt An essential role of phosphatidylinositol 3-kinase in myogenic differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* . 1998; (95): 14179–14183.
59. C.D. Galvin, O. Hardiman, C.M. Nolan. IGF-1 receptor mediates differentiation of primary cultures of mouse skeletal myoblasts. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2003; (200): 19 – 29.
60. P Diel, D Baadners, K Schlu'pmann, M Velders and J P Schwarz C2C12 myoblastoma cell differentiation and proliferation is stimulated by androgens and associated with a modulation of myostatin and Pax7 expression. *Journal of Molecular Endocrinology* 2008; (40): 231–241.

Anexo I

Curitiba, 15 de junho de 2011.

Prezados (a) Senhores (a):

Informamos que seu artigo intitulado: "ANÁLISE COMPARATIVA DOS EFEITOS DO ULTRASSOM TERAPÊUTICO E LASER DE BAIXA POTÊNCIA SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS MUSCULARES DURANTE A DIFERENCIAÇÃO CELULAR" foi aceito para publicação com previsão no exemplar volume 21 número 1 outubro/dezembro 2012 da "Revista Fisioterapia em Movimento".

O Conselho Editorial vem mais uma vez agradecer a sua participação no engrandecimento desta edição.

Queremos reafirmar que este veículo científico continua aberto aos novos trabalhos desenvolvidos por V.S.

Sem mais apresentamos nossos protestos de estima e consideração.

Atenciosamente,

Leticia Vieira da Rosa

Revista Fisioterapia em Movimento

Anexoll

Artigo 2

Fisioterapia e Pesquisa, São Paulo, v.17, n.2, p. , abr/jun. 2010

ISSN 1809-2950

art 12

Efeitos do ultra-som terapêutico contínuo sobre a proliferação e viabilidade de células musculares C2C12

Effects of continuous therapeutic ultrasound on the proliferation and viability of C2C12 muscle cells

Título condensado: Ultra-som contínuo em células musculares

Paola Pelegrineli Artilheiro¹, Elisângela Nascimento Oliveira², Crislene Sampaio Viscardi¹, Manoela Domingues Martins³, Sandra Kalil Bussadori³, Kristianne Porta Santos Fernandes³, Raquel Agnelli Mesquita-Ferrari³

Estudo desenvolvido no Mestrado em Ciências da Reabilitação, Laboratório de Pesquisa da Unidade Vergueiro da Uninove – Universidade Nove de Julho, São Paulo, SP, Brasil

¹ Mestranda no Programa de Mestrado em Ciências da Reabilitação da Uninove

² Fisioterapeuta Ms.

³ Profas. Dras do Programa de Mestrado em Ciências da Reabilitação da Uninove

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Raquel A. Mesquita-Ferrari
Pós-Graduação em Ciências da Reabilitação / Uninove
Av. Francisco Matarazzo 612 Água Branca
05001-100 São Paulo SP
e-mail: raquel.mesquita@gmail.com

APRESENTAÇÃO
dez. 2009

ACEITO PARA PUBLICAÇÃO
abr. 2010

O estudo recebeu financiamento da Fapesp – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – e da Uninove.

RESUMO: O ultra-som terapêutico (US) é um recurso bioestimulante utilizado para propiciar reparo muscular de melhor qualidade e menor duração, mas o potencial terapêutico do US contínuo não está totalmente estabelecido. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do US contínuo sobre a proliferação e viabilidade de células musculares precursoras (mioblastos C2C12). Mioblastos C2C12 foram cultivados em meio de cultura contendo 10% de soro fetal bovino e irradiados com US contínuo nas frequências de 1 e 3 MHz nas intensidades de 0,2 e 0,5 W/cm², durante 2 e 5 minutos. A viabilidade e proliferação celular foram avaliadas após 24, 48 e 72 h de incubação. Grupos não-irradiados serviram como controle. Foram realizados experimentos independentes em cada condição acima, e os dados obtidos submetidos à análise estatística. Os resultados mostram que não houve diferença estatisticamente significativa na proliferação e viabilidade celular entre os mioblastos tratados com US e as culturas controles após os diferentes períodos de incubação, em todos os parâmetros avaliados. Conclui-se que o US contínuo, nos parâmetros avaliados, não foi capaz de alterar a proliferação e viabilidade dos mioblastos.

Descritores: Células musculares/ultrassonografia; Mioblastos; Proliferação de células; Terapia por ultrassom

ABSTRACT: Therapeutic ultrasound (US) is a biophysical stimulation resource widely used in order to promote better, faster muscle repair, but the effectiveness of continuous US in treating injuries is not fully established. The aim of the present *in vitro* study was to assess the effects of continuous ultrasound on viability and proliferation of skeletal muscle precursor cells (C2C12 myoblasts). C2C12 myoblasts were cultured in a medium containing 10% foetal bovine serum and irradiated with continuous ultrasound at 1 and 3 MHz frequencies, at intensities of 0.2 and 0.5 W/cm² for 2 and 5 minutes. Cell viability and proliferation were assessed after different incubation periods (24, 48 and 72 h). Non-irradiated groups served as control and data were statistically analysed. Results showed that no significant differences in cell viability or proliferation could be found between ultrasound-treated myoblasts and control cultures under all test parameters and durations. Hence continuous ultrasound, at the used parameters, was unable to alter myoblast proliferation and viability.

Keywords: Cell proliferation; Muscle cells/ultrasonography; Myoblasts; Ultrasonic therapy

3.3. Introdução

O músculo esquelético é um tecido dinâmico com alta capacidade de adaptação frente a estímulos fisiológicos como, por exemplo, treinamento físico ou lesões severas. As lesões musculares são muito freqüentes na prática desportiva, podendo ocorrer por diversos mecanismos, abrangendo desde trauma direto como lacerações e contusões, até trauma indireto como distensão, isquemia e disfunção neurológica^{1,2}.

A formação do músculo esquelético ou 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 que, finalmente, se desenvolvem para se tornar miofibrilas do músculo esquelético maduro^{3,4}. Quando um músculo sofre uma lesão, tem a habilidade de iniciar um processo de reparo altamente organizado de forma a prevenir a perda de massa muscular. Esse processo é semelhante à miogênese, porém as células que participam desse processo são as células satélites^{2,5}.

Há grande interesse no estabelecimento de recursos e terapias a serem utilizados para tentar proporcionar um processo de reparo muscular de melhor qualidade e menor duração. O US terapêutico (US) é um desses recursos, que vem sendo cada vez mais utilizado para o tratamento de condições clínicas como lesões ligamentares, tendinites e lesões tendinosas, lacerações ou outros tipos de lesão tecidual, cicatrizes, úlceras varicosas, neuromas, processos inflamatórios articulares, fasceíte e, mais recentemente, no reparo de fraturas ósseas^{6,7}, lesões musculares e trombose⁸⁻¹¹.

Segundo Mendonça *et al.*¹², há um consenso de que o US promove efeito benéfico sobre diversos tecidos, destacando-se dentre outros o aumento da angiogênese, do tecido de granulação, do número de fibroblastos e da síntese de colágeno, e a diminuição de leucócitos e macrófagos, nos quais já foi demonstrado o aumento da velocidade de cicatrização, a diminuição do número de células inflamatórias e a melhora da qualidade do tecido neoformado. Entretanto, ainda são escassas, e por vezes contraditórias, as evidências científicas que determinem com segurança os parâmetros dosimétricos e metodológicos necessários à aquisição desses objetivos por esse recurso^{11,13-18}.

Estudos *in vitro* demonstraram que os efeitos do US parecem depender do tipo celular: promoveriam a síntese de DNA em osteoblastos humanos, fibroblastos de gengiva e pele, células de periósteo, mas não em condrócitos⁶. Quanto ao efeito do US sobre a proliferação celular, foi verificado inicialmente por Johns *et al.*¹⁹ que o US contínuo e pulsado, em intensidades de 0,1 a 0,7W/cm², foi capaz de diminuir a taxa de crescimento celular; porém, em estudos posteriores, evidenciou-se que o US nas freqüências de 1 e 3 MHz em intensidades variadas promovia aumento da proliferação de fibroblastos e osteoblastos²⁰⁻²². Os estudos mais recentes que avaliaram o potencial terapêutico do US foram realizados em osteoblastos^{23,24}, condrócitos²⁵⁻²⁷, fibroblastos²⁸, células epiteliais²⁹ e células endoteliais³⁰. Um estudo prévio (não publicado) destes autores evidenciou que o US pulsado não interferiu na proliferação e viabilidade de células musculares.

O objetivo deste estudo foi verificar os efeitos do US contínuo nas frequências de 1 e 3 Mhz, nas intensidades de 0,2 e 0,5W/cm², durante 2 e 5 minutos, sobre a viabilidade e proliferação de mioblastos após diferentes períodos de incubação (24, 48 e 72 h). Com esse propósito, foram utilizados mioblastos C2C12 que derivam de músculo esquelético de camundongos e exibem a maioria das características dos mioblastos normais (diferenciam-se em cultura), propiciando um bom modelo para estudar a regeneração muscular^{3,31-33}.

3.3. METODOLOGIA

A linhagem celular C2C12 aqui utilizada é um subclone da linhagem celular de mioblastos C2, células derivadas de células-satélite de ratos adultos^{28,29}. Essas células foram cultivadas no meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Cultilab, Campinas, SP, BR) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB – Cultilab) e 1% antibiótico solução antimicótica (Cultilab) e mantidas em estufa 37°C, numa atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. O monitoramento do crescimento celular foi feito a cada 24 horas e, quando a monocamada celular se tornava subconflente para a perpetuação da linhagem celular, foi realizado o subcultivo com lavagem tampão PBS1X (NaCl 140 mM; KCl 2,5 mM; Na₂HPO₄ 8 mM; KH₂PO 1,4 mM; pH 7,4) e solução de tripsina. As células foram centrifugadas a 1200 rpm e posteriormente ressuspensas em 1 ml de meio DMEM. A viabilidade das células foi avaliada por contagem com corante vital azul de trypan (0,4%) e foram utilizadas nos experimentos as células com viabilidade maior que 95%.

Procedimentos

O equipamento de US utilizado foi o Sonomaster Microcontrolled Communicator (KW, Amparo, SP, BR) e os parâmetros de tratamento selecionados foram as intensidades de 0,2 e 0,5 W/cm², frequências de 1 e 3 MHz e modo contínuo de aplicação. A irradiação com US foi realizada conforme o modelo proposto por Mukai *et al.*²⁷: as células, suspensas em meio de cultura num tubo cônico estéril de 50 ml foram centrifugadas a 1200 rpm (Centrífuga Excelsa4 modelo 280R – Fanem, São Paulo, SP, BR) para obtenção do precipitado celular. Em seguida, esse tubo foi submerso em água deionizada em temperatura de 37°C, mantida constante com o auxílio de Banho-maria (Nova Técnica NT271, Piracicaba, SP, BR). A cabeça do transdutor foi posicionada perpendicularmente ao tubo de cultivo celular e fixada na armação, permanecendo a 3 cm da cultura celular. O tanque de água com dimensão interna de 16 x 30 x 49 cm foi revestido por placas de borracha com o intuito de eliminar reflexos múltiplos (Figura 1). O grupo controle sofreu a mesma manipulação, mas as células não foram irradiadas. A técnica subaquática foi utilizada, pois a água destilada ou desgaseificada permite melhor transferência da onda ultra-sônica, em termos de propriedade de impedância acústica²⁷.

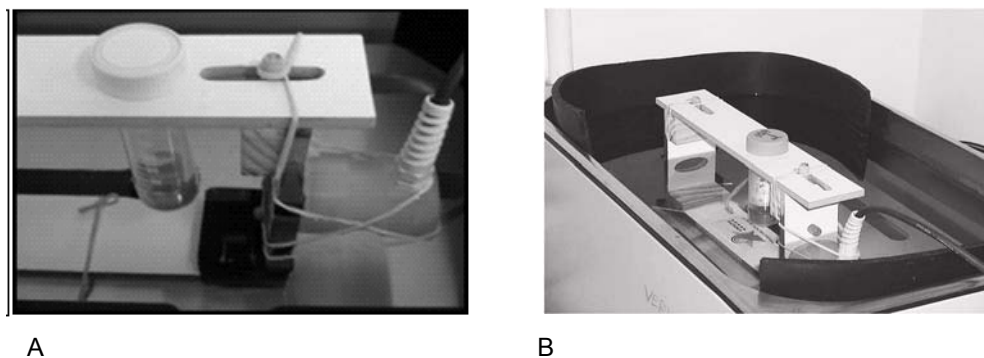


Figura 1 Ilustração: equipamento para irradiação dos mioblastos com US
 (A) Aparato confeccionado com base no modelo proposto por Mukai *et al.*³¹
 (B) Irradiação das células por US de forma subaquática

As células foram divididas em nove grupos experimentais, sendo um controle (sem tratamento) e oito grupos tratados com o US utilizando diferentes parâmetros, como sintetizado no Quadro 1.

Quadro 1 Grupos experimentais e parâmetros dosimétricos usados para a irradiação com US

Grupo	Frequência (MHz)	T irradiação (minutos)	Intensidade (W/cm ²)
C	-	Só imersão	-
	1	2	0,2
	1	2	0,5
	1	5	0,2
	1	5	0,5
	3	2	0,2
	3	2	0,5
	3	5	0,2
	3	5	0,5

C = Controle; T = tempo; Intensidade = intensidade

A viabilidade (proliferação) celular foi avaliada após 24, 48 e 72 h do procedimento de irradiação com US. A metodologia utilizada baseia-se na habilidade da enzima mitocondrial desidrogenase, encontrada somente em células viáveis, em clivar os anéis de tetrazólio do MTT – 3-[4,5-dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; thiazolyl blue (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) – formando cristais azul-escuros de formazana, que são impermeáveis às membranas celulares, ficando então retidos no interior das células viáveis³⁴. A posterior lise celular faz com que esses sais de formazana sejam liberados. O número de células viáveis é diretamente proporcional ao nível de cristais de azul de formazana formados.

Após a irradiação com US, 1×10^3 células/poço, mantidas em DMEM contendo

10% SFB, foram adicionadas a placas de cultura de fundo chato de 96 poços estéreis (Costar) e incubadas a 37°C e 5% CO₂ durante os diferentes períodos avaliados, ou seja, 24, 48 e 72 horas. Ao término do período de incubação, foi feita a lavagem dos poços com PBS1X (NaCl 140 mM; KCl 2,5 mM; Na₂HPO₄ 8 mM; KH₂PO 1,4 mM; pH 7,4) para remoção das células mortas e adicionado o MTT (0,5 mg/ml); as células foram então incubadas por 4 h a 37°C e 5%CO₂. Em seguida, foi adicionado isopropanol para solubilizar os cristais formados. Por fim, foi realizada a leitura da absorbância a 620 nm com auxílio de um leitor de placas (Anthos2020, Anthos Labtec Instruments, Wals, Áustria)^{35,36}. Todos os experimentos foram repetidos três vezes, de forma independente, e cada amostra foi analisada em quadruplicata.

Análise estatística

As comparações entre os grupos foram feitas utilizando análise de variância Anova. O teste de Dunnett foi utilizado para determinar diferenças significativas entre os grupos experimentais e o grupo controle. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Os dados foram analisados por meio do programa GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

3.3. Resultados

Quanto ao efeito do ultra-som contínuo sobre a viabilidade e proliferação celular, os resultados mostram que não houve diferença significativa na viabilidade e proliferação celular, avaliadas pelo método MTT, entre as culturas celulares tratadas com US (todos os parâmetros testados) e as culturas controle, após os diferentes períodos de incubação avaliados, conforme ilustrado na Figura 2. Além disso, foi possível verificar que houve um aumento do número de células com o aumento do período de incubação, tanto no grupo controle quanto nos tratados, conforme esperado (Figura 2).

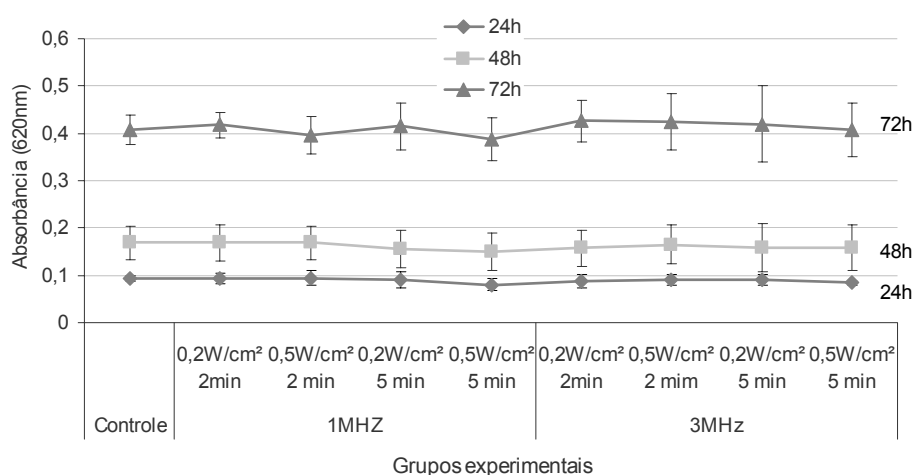


Figura 2 Proliferação e viabilidade de mioblastos na ausência (controle) e presença de tratamento com US contínuo utilizando diferentes parâmetros dosimétricos

3.3. Discussão e Conclusão

Segundo Johns¹⁹, a cultura celular é, por definição, um artefato; no entanto, permite que o investigador tenha um controle rigoroso sobre diversas variáveis do processo e possa fazer questionamentos de maneira mais sistemática. Portanto, estudos *in vitro* avaliando o potencial do US são importantes complementos dos estudos *in vivo*, e podem trazer maiores conhecimentos de forma a permitir a utilização desse recurso de forma mais eficaz e segura.

A linhagem celular C2C12 foi escolhida neste experimento porque essas células são um subclone da linhagem de mioblastos C2, isoladas de células-satélites de ratos adultos³⁷, que apresentam a maioria das características dos mioblastos normais e são comumente usadas como modelo para estudar a proliferação e a diferenciação de células musculares. O uso de linhagens celulares como modelos para a análise da proliferação celular elimina a possibilidade de o US interferir na produção de fatores de crescimento de células não-miogênicas contidas em culturas primárias, como fibroblastos e macrófagos^{31,38,39}.

O presente estudo avaliou os efeitos do US contínuo em células musculares com o intuito de acumular maior conhecimento acerca da utilização desse recurso para o reparo tecidual após lesões, distrofias e outras condições nas quais a proliferação de células musculares é requerida. No entanto, os resultados evidenciam que o tratamento dessas células com o US não alterou sua proliferação, quando comparadas às células que não receberam tratamento.

É importante ressaltar que, apesar de o US não ter induzido aumento de proliferação, tampouco causou sua inibição, o que garante a utilização desse recurso no tratamento das lesões musculares com segurança.

Foi demonstrado que o US pulsado aumenta a proliferação de células satélites e de fibroblastos em modelo experimental de lesão contusa em músculo gastrocnêmio de rato⁴⁰. Além disso, em outro estudo verificou-se que o tratamento com US melhora a extensibilidade muscular⁴¹, a produção de força após lesão por contração⁴² e pode aumentar a diferenciação das células musculares em modelo animal⁴³. Visto que o US acelera o processo de reparo em diversos estudos *in vivo*, é possível que esse efeito dependa da ação coordenada de diferentes tipos celulares presentes em tecidos adjacentes ao tecido muscular, como por exemplo o conjuntivo. No presente estudo, pela escolha da utilização da linhagem celular, foi verificado somente o efeito do US sobre as células musculares. Assim, há a possibilidade de que o efeito do US no processo de reparo seja dependente da estimulação de outras células, que passariam a secretar fatores de crescimento envolvidos na proliferação e diferenciação das células musculares, em resposta a irradiação com US.

No entanto, outros autores que também utilizaram modelo experimental animal, foram igualmente incapazes de demonstrar aumento estatisticamente significativo na massa muscular ou na regeneração tecidual em lesões musculares tratadas com o US⁴⁴⁻⁴⁶. Essa controvérsia apóia a falta de evidência científica sobre a eficácia do US na reparação muscular^{19,43,47}.

Embora o US contínuo não tenha alterado a proliferação celular, o tratamento com esse recurso pode ter provocado uma modificação na síntese de fatores de crescimento e citocinas responsáveis pela diferenciação dessas células. Esta hipótese é respaldada pelo fato de que em experimentos *in vivo* o US aumentou a

diferenciação das células musculares^{40,42}. Dessa forma, estudos futuros, utilizando técnicas adequadas, serão realizados na tentativa de responder essa questão.

Ikeda *et al.*⁴⁸ avaliaram o efeito do US também sobre culturas de mioblastos C2C12, porém os parâmetros dosimétricos utilizados foram diferentes, dificultando a comparação com os presentes achados: foi utilizado o US pulsado e as células C2C12 foram cultivadas já em meio de diferenciação. Os autores verificaram que existe uma diferenciação das células musculares em osteoblastos e condroblastos em resposta ao tratamento com o US, nos parâmetros de 1,5 MHz a uma intensidade de 70 mW/cm² por 20 min.

Outros estudos *in vitro* demonstraram que os efeitos do US foram dependentes dos parâmetros utilizados e do tipo celular, sendo capaz de promover a proliferação de osteoblastos, fibroblastos^{6,20,28,49}, células endoteliais³⁰ e condrócitos²⁶. No entanto, outros autores não demonstraram de forma significativa os efeitos aditivos do US sobre a proliferação de fibroblastos⁵⁰, de células provenientes de discos intervertebrais de bovinos²⁶, de células uro-epiteliais²⁹ ou de condrócitos^{51,52} ou até mesmo relatam diminuição no número de fibroblastos²⁰ após o tratamento com US. Esse fato pode vir a reafirmar a possibilidade de que o US pode acelerar o processo de reparo muscular não diretamente pelo aumento na proliferação das células musculares e sim por estimular outros tipos celulares envolvidos no processo.

Com base no exposto, fica evidente que o enorme potencial terapêutico do US está longe de ser estabelecido em virtude de novas aplicações serem adicionadas regularmente ao seu repertório⁷. O presente estudo permitiu concluir que o US contínuo nos parâmetros utilizados não foi capaz de alterar a proliferação das células musculares, porém há necessidade da realização de estudos posteriores para o melhor entendimento de outros possíveis efeitos do US sobre essas células como, por exemplo, no processo de diferenciação, para o estabelecimento de protocolos adequados a serem utilizados para o reparo muscular e recuperação clínica dos pacientes.

3.3. Referências

- 1 Crisco JJ, Jokl P, Heinen GT, Connell MD, Panjabi MM. A muscle contusion injury model: biomechanics, physiology, and histology. *Am J Sports Med.* 1994;22(5):702-10.
- 2 Shi X, Garry DJ. Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. *Genes Dev.* 2006;20:1692-708.
- 3 Kumar A, Mohan S, Newton J, Rehage M, Tran K, Baylink DJ. Pregnancy-associated plasma protein-A regulates myoblast proliferation and differentiation through an insulin-like growth factor-dependent mechanism. *J Biol Chem.* 2005;280(45):37782-9.
- 4 Dogra C, Hall SL, Wedhas N, Linkhart TA, Kumar A. Fibroblast growth factor inducible-14 (Fn14) is required for the expression of myogenic regulatory factors and differentiation of myoblasts into myotubes: evidence for Tweak-independent functions of Fn14 during myogenesis. *J Biol Chem.* 2007;282(20):15000-10.
- 5 Chargé SBP, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev.* 2004;84:209-38.
- 6 Zhou S, Schmelz A, Seufferlein T, Li Y, Zhao J, Bachem MG. Molecular mechanisms of low-intensity pulsed ultrasound in human skin fibroblasts. *J Biol Chem.* 2004;279(52):54463-9.
- 7 Warden RKF, Kessler CK, Avin KG, Cardinal RE, Stewart RL. Ultrasound produced by a conventional therapeutic ultrasound unit accelerates fracture repair. *Phys Ther.* 2006;86(8):1118-27.

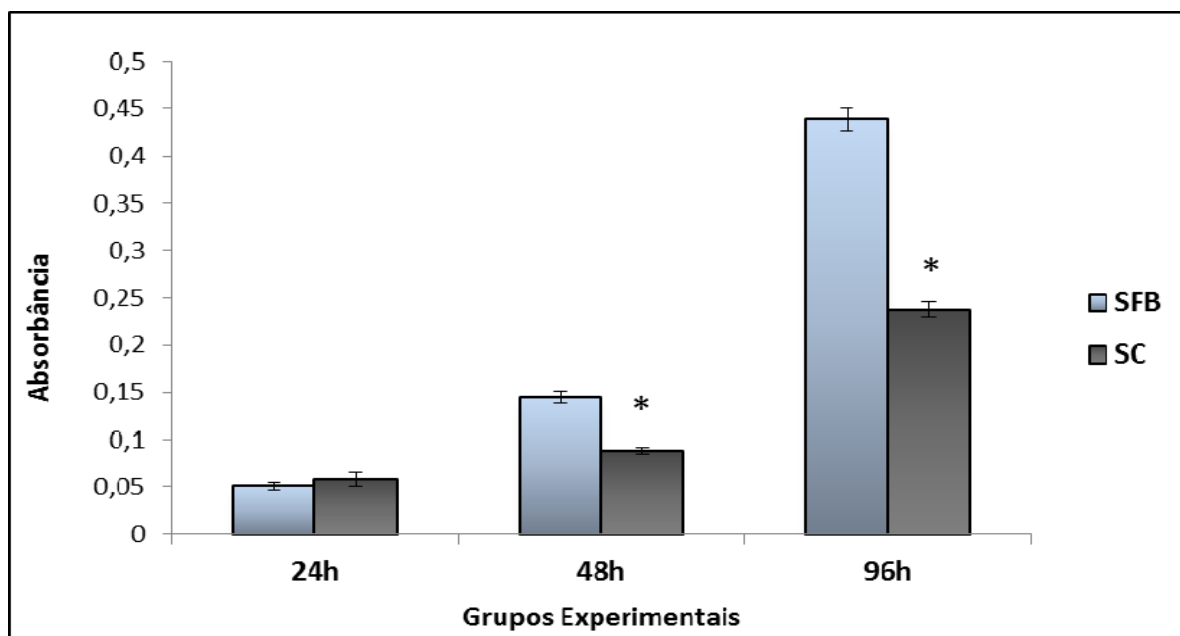
- 8 Hsieh YL. Effects of ultrasound and diclofenac phonophoresis on inflammatory painrelief: suppression of inducible nitric oxide synthase in arthritic rats. *Phys Ther.* 2006;86(1):39-49.
- 9 Azuma Y, Ito M, Harada Y, Takagi H, Ohta T, Jinguishi S. Low-intensity pulsed ultrasound accelerates rat femoral fracture healing by acting on the various cellular reactions in the fracture callus. *J Bone Miner Res.* 2001;16:671-80.
- 10 Rubin C, Bolander M, Ryaby JP, Hadjiargyrou M. The use of low-intensity ultrasound to accelerate the healing of fractures. *J Bone Joint Surg.* 2001;83(A):259-70.
- 11 Franco AD, Pereira LE, Groschitz M, Aimbire F, Martins RABL, Carvalho RA. Análise do efeito do ultra-som no edema inflamatório agudo: estudo experimental. *Fisioter Mov.* 2005;18(2):19-24.
- 12 Mendonça AC, Ferreira AS, Barbieri CH, Thomazine JA, Mazzer N. Efeitos do ultra-som pulsado de baixa intensidade sobre a cicatrização por segunda intenção de lesões cutâneas totais em ratos. *Acta Ortop Bras.* 2006;14(3):152-7.
- 13 Ferrari RJ, Picchi LD, Botelho AP, Minamoto V. Processo de regeneração na lesão muscular: uma revisão. *Fisioter Mov.* 2005;18(2):63-71.
- 14 Speed CA. Therapeutic ultrasound in soft tissue lesions. *Rheumatology (Oxford).* 2001;40:1331-6.
- 15 Mitragotri S. Healing sound: the use of ultrasound in drug delivery and other therapeutic applications. *Nat Rev Drug Discov.* 2005;4:255-60.
- 16 Sundaram J, Mellein BR, Mitragotri S. An experimental and theoretical analysis of ultrasound-induced permeabilization of cell membranes. *Biophys J.* 2003;84(5):3087-101.
- 17 Baker KG, Robertson VJ, Duck FA. A review of therapeutic ultrasound: biophysical effects. *Phys Ther.* 2001;81(7):1351-8.
- 18 Blume K, Matsuo E, Lopes MS, Lopes LG. Dosimetria proposta para o tratamento por ultra-som: uma revisão de literatura. *Fisioter Mov.* 2005;18(3):55-64.
- 19 Johns LD. Nonthermal effects of therapeutic ultrasound: the frequency resonance hypothesis. *J Athl Train.* 2002;37(3):293-9.
- 20 De Deyne PG, Kirsch-Volders M. In vitro effects of therapeutic ultrasound on the nucleus of human fibroblast. *Phys Ther.* 1995;75:629-34.
- 21 Doan N, Reher P, Meghji S, Harris M. In vitro effects of therapeutic ultrasound on cell proliferation, protein synthesis and cytokine production by human fibroblasts, osteoblasts and monocytes. *J Oral Maxillofac Surg.* 1999;57:409-19.
- 22 Reher P, Doan N, Bradnock B, Meghji S, Harris M. Effect of ultrasound on the productin of IL-8, basic FGF and VEGF. *Cytokine.* 1999;11:416-23.
- 23 Maddi A, Hai H, Ong ST, Sharp L, Harris M, Meghji S. Long-wave ultrasound may enhance bone regeneration by altering OPG/RANKL ratio in human osteoblast-like cells. *Bone.* 2006;39:283-8.
- 24 Tang CH, Yang RS, Huang TH, Lu DY, Chuang WJ, Huang TF, et al. Ultrasound stimulates cyclooxygenase-2 expression and increases bone formation through integrin, focal adhesion kinase, phosphatidylinositol 3-kinase, and akt pathway in osteoblasts. *Mol Pharmacol.* 2006;69(6):2047-57.
- 25 Park K, Hoffmeister B, Han DK, Hasty K. Therapeutic ultrasound effects on interleukin-1B stimulated cartilage construct in vitro. *Ultrasound Med Biol.* 2007;33(2):286-95.
- 26 Miyamoto K, An HS, Sah RL, Akeda K, Okuma M, Otten L, et al. Exposure to pulsed low-intensity ultrasound stimulates extracellular matrix metabolism of bovine intervertebral disc cells cultured in alginate beads. *Spine.* 2005;30(21):2398-405.
- 27 Mukai S, Ito H, Nakagawa Y, Akiyama H, Miyamoto M, Nakamura T. Transforming growth factor B1 mediates the effects of low-intensity pulsed ultrasound in chondrocytes. *Ultrasound Med Biol.* 2005;31(12):1713-21.
- 28 Lai J, Pittelkow MR. Physiological effects of ultrasound mist on fibroblast. *Int J Dermatol.* 2007;46(6):587-93.
- 29 Hill GE, Fenwick S, Matthews BJ, Chivers RA, Southgate J. The effect of low-intensity pulsed ultrasound on repair of epithelial cell monolayers in vitro. *Ultrasound Med Biol.* 2005;31(12):1701-6.
- 30 Mizrahi N, Seliktar D, Kimmel E. Ultrasound-induced angiogenic response in endothelial cells. *Ultrasound Med Biol.* 2007;33(11):1818-29.
- 31 Lee MH, Jang MH, Kim EK, Han SW, Cho SY. Nitric oxide induces apoptosis in mouse C2C12 myoblast cells. *J Pharmacol Sci.* 2005;97:369-76.

- 32 Amaral AC. Influência da terapia a *laser* de baixa intensidade em células precursoras miogênicas (*in vitro*) e durante a regeneração muscular (*in vivo*) [dissertação]. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos; 2004.
- 33 Amack JD, Mahadevan MS. The myotonic dystrophy expanded CUG repeat tract is necessary but not sufficient to disrupt C2C12 myoblast differentiation. *Hum Mol Genet.* 2001;10(8):1879-87.
- 34 Löster K, Horstkorte R. Enzymatic quantification of cell-matrix and cell-cell adhesion. *Micron.* 2000;31(1):41-53.
- 35 Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65(2):55-63.
- 36 Woerdenbag HJ, Merfort I, Passreiter CM, Schmidt TJ, Willuhn G, Van Uden W, et al. Cytotoxicity of flavonoids and sesquiterpene lactones from *Arnica* species against the GLC4 and the COLO 320 cell lines. *Planta Med.* 60(5):434-7.
- 37 Yaffe D, Saxel D. Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature.* 1977;270:725-7.
- 38 Chandran R, Knobloch TJ, Anghelina M, Agarwal S. Biomechanical signals upregulate myogenic gene induction in the presence or absence of inflammation. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007;293:C267-76.
- 39 Ferreira MPP, Ferrari RAM, Gravalos ED, Martins MD, Bussadori SK, Gonzales DAB, et al. Effect of low-energy GaAlAs and InGaAlP laser irradiation on the viability of C2C12 myoblasts in a muscle injury model. *Photomed Laser Surg.* 2009;27(6):901-6.
- 40 Rantanen J, Thorsson O, Wollmer P, Hurme T, Kalimo H. Effects of therapeutic ultrasound on the regeneration of skeletal myofibers after experimental muscle injury. *Am J Sports Med.* 1999;27(1):54-9.
- 41 Wessling KC, DeVane DA, Hylton CR. Effects of static stretch versus static stretch and ultrasound combined on triceps surae muscle extensibility in healthy women. *Phys Ther.* 1987;67:674-9.
- 42 Karnes JL, Burton HW. Continuous therapeutic ultrasound accelerates repair of contraction-induced skeletal muscle damage in rats. *Arch Phys Med Rehabil.* 2002;83:1-4.
- 43 Piedade MCB, Galhardo MS, Battlehner CN, Ferreira MA, Caldini EG, Toledo OMS. Effect of ultrasound therapy on the repair of gastrocnemius muscle injury in rats. *Ultrasonics.* 2008;48:403-11.
- 44 Wilkin LD, Merrick MA, Kirby TE, Devor ST. Influence of therapeutic ultrasound on skeletal muscle regeneration following blunt contusion. *Int J Sports Med.* 2004;25:73-7.
- 45 McBrier NM, Lekan JM, Druhan LJ, Devor ST, Merrick MA. Therapeutic ultrasound decreases mechano-growth factor messenger ribonucleic acid expression after muscle contusion injury. *Arch Phys Med Rehabil.* 2007;88:936-40.
- 46 Markert CD, Merrick MA, Kirby TE, Devor ST. Nonthermal ultrasound and exercise in skeletal muscle regeneration. *Arch Phys Med Rehabil.* 2005;86:1304-10.
- 47 Järvinen TA, Järvinen TLN, Järvinen M, Kääriäinen M, Kalimo H, Järvinen M. Muscle injuries: biology and treatment. *Am J Sports Med.* 2005;33:745-64.
- 48 Ikeda K, Takayama T, Suzuki N, Shimada K, Otsuka K, Ito K. Effects of low-intensity pulsed ultrasound on the differentiation of C2C12 cells. *Life Sci.* 2006;79(20):1936-43.
- 49 Chen YJ, Wang CJ, Yang KD, Chang PR, Huang HC, Huang YT, et al. Pertussis toxin-sensitive GKi protein and ERK-dependent pathways mediate ultrasound promotion of osteogenic transcription in human osteoblasts. *FEBS Lett.* 2003;554(1):154-8.
- 50 Oliveira RF, Oliveira DA, Monteiro W, Zangaro RA, Magini M, Soares CP. Comparison between the effect of low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasonic irradiation *in vitro*. *Photomed Laser Surg.* 2008;26(1):6-9.
- 51 Parvizi J, Wu CC, Lewallen DG, Greenleaf JF, Bolander ME. Low-intensity ultrasound stimulates proteoglycan synthesis in rat chondrocytes by increasing aggrecan gene expression. *J Orthop Res.* 1999;17(4):488-94.
- 52 Zhang ZJ, Huckle J, Francomano CA, Spencer RGS. The effects of pulsed low-intensity ultrasound on chondrocyte viability, proliferation, gene expression and matrix production. *Ultrasound Med Biol.* 2003;29(11):1645-51.

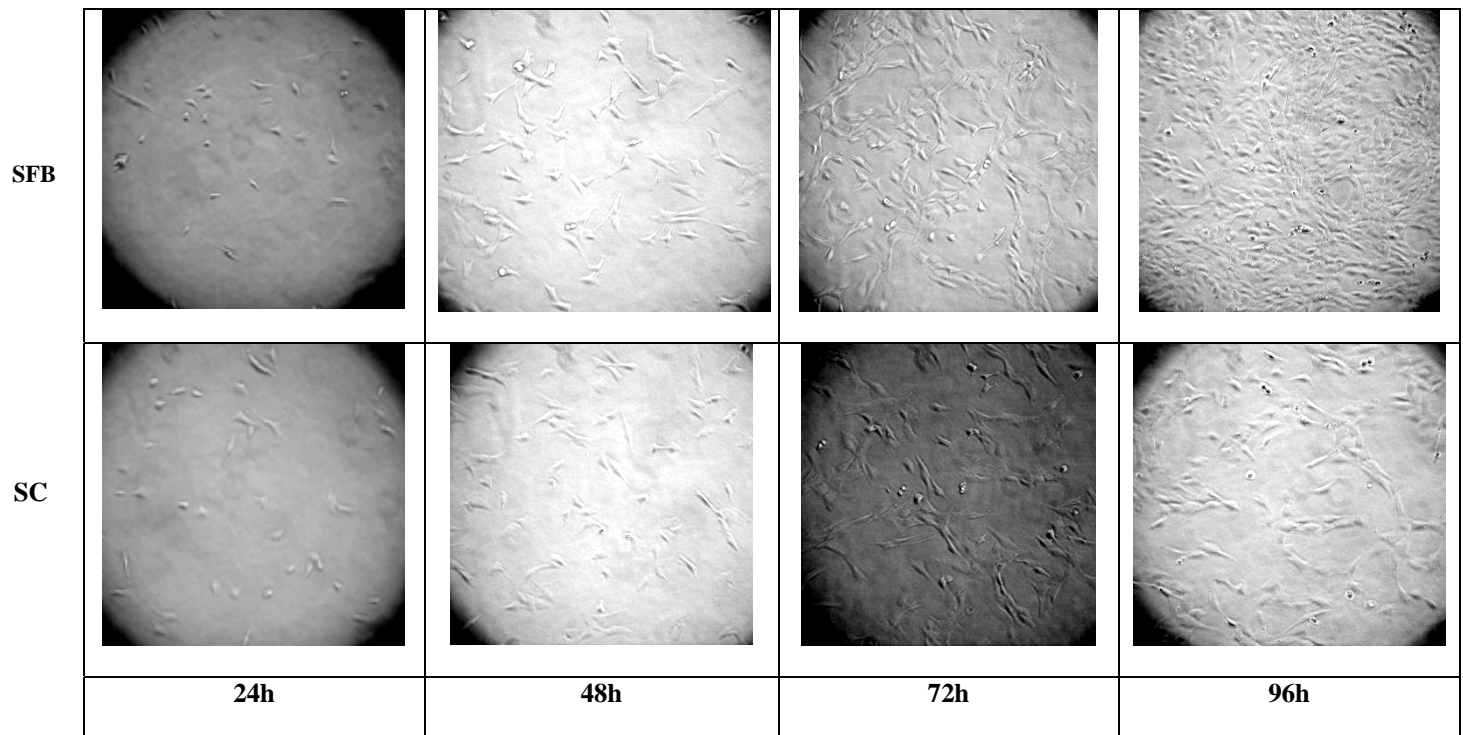
Anexo III

Avaliação da proliferação e morfologia celular em meio suplementado com SFB e SC

Os resultados permitiram verificar houve diferença significativa na proliferação celular, avaliada pelo método MTT entre as células musculares submetidas à diferenciação e as células controle a partir de 48 horas. Sendo possível verificar uma estabilização quanto ao aumento do número de células de acordo com o aumento do período de incubação nas células submetidas à diferenciação, confirmando o processo de diferenciação celular, conforme esperado.



Avaliação da proliferação celular em meio suplementado com SFB e SC.



Avaliação morfológica entre as células musculares submetidas à diferenciação e as células controle em diferentes períodos de incubação. Note uma redução do número de células na presença de SC em relação ao SFB ao longo do tempo, confirmando o processo de diferenciação, como esperado.