

**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOFOTÔNICA APLICADA ÀS**  
**CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**TAINÁ CAROLINE DOS SANTOS**

**“EFEITO DA FOTOBIMODULAÇÃO SOBRE CÉLULAS MUSCULARES**  
**CULTIVADAS COM MEIO CONDICIONADO DE MACRÓFAGOS ATIVADOS**  
**PARA PERFIL M1”**

**São Paulo, SP**

**2019**

**TAINÁ CAROLINE DOS SANTOS**

**“EFEITO DA FOTOBIMODULAÇÃO SOBRE CÉLULAS MUSCULARES  
CULTIVADAS COM MEIO CONDICIONADO DE MACRÓFAGOS ATIVADOS  
PARA PERFIL M1”**

Dissertação apresentada à  
Universidade Nove de Julho para  
obtenção do título de mestre em  
Biofotônica Aplicada às Ciências da  
Saúde.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Raquel Agnelli Mesquita Ferrari

**São Paulo, SP**

**2019**

Santos, Tainá Caroline dos.

Efeito da fotobiomodulação sobre células musculares cultivadas com meio condicionado de macrófagos ativados para perfil M1. / Tainá Caroline dos Santos. 2019.

114 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2019.

Orientador (a): Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Raquel Agnelli Mesquita Ferrari.

1. Células satélites musculares. 2. Lesão muscular aguda. 3. Macrófagos. 4. Meio condicionado. 5. Fotobiomodulação.

I. Ferrari, Raquel Agnelli Mesquita. II. Título

CDU 615.831

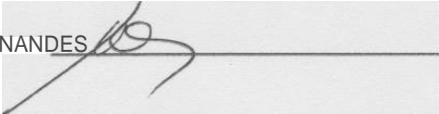
Sgc Paulo, as 02 de fevereiro de 2019

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno (a) Taina Caroiine dos Santos

Titulo da Dissertação Efeito da fotobiomodulação sobre células musculares cultivadas com meio condicionado de macrófagos ativados oara perfil M1\*

Presidente PROF<sup>a</sup> DR<sup>a</sup> RAQUEL AGNELLI MESQUITA FERRARI 

Membro PROF<sup>a</sup> DR<sup>a</sup> KRISTIANNE PORTA SANTOS FERNANDES 

MemDro PROF DR RICARDO SCARPARO NAVARRO 

## DEDICATÓRIA



*Aos meus pais, Vera e Claudio,  
por todo o amor ofertado com  
toda pureza e sinceridade.  
Por serem minhas referências  
de superação, força, fé e  
companheirismo.  
Meu eterno agradecimento e  
admiração!*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus**, por guiar em tudo que é necessário saber e mostrar a beleza do que é preciso para viver.

À minha irmã e cunhado, **Tamires** e **Rodrigo**, pelo encorajamento, apoio, amizade e amor. Amo vocês!

À minha melhor amiga, **Sabrina**, agradeço o privilégio em acompanhar, mesmo que de longe, o surgimento de uma família e do seu bem mais valioso que é o **Vicente**. Ao meu melhor amigo, **Nathan**, pela nossa longa amizade e irmandade. A minha eterna amiga **Jacqueline** (Tiny Dancer), pela mais sincera amizade. Agradeço a vocês pelos inúmeros momentos, repletos de sorrisos e as vezes algumas lágrimas! Por sempre me oferecerem apoio, força e me transmitirem felicidade, não importando como ou onde. Todo meu amor e gratidão!

A minha querida amiga **Kaline Souza**, sempre com seu jeito doce e humilde de ser e, a minha querida portuguesa **Mónica Garcia**. Obrigada por sempre estarem ao meu lado quando precisei, por todo o conhecimento repassado, por todo apoio necessário e o mais importante, por terem sido minhas amigas em todos os momentos. Do laboratório para a vida! Muito obrigada!

À minha orientadora Dr<sup>a</sup> **Raquel Agnelli Mesquita Ferrari**, pela escolha em me orientar, sempre demonstrando carinho, cuidado, paciência e compreensão e por todos os ensinamentos a quem devo minha trajetória até aqui. Agradeço a confiança depositada e o incentivo durante minha trajetória acadêmica, sempre colaborando no meu crescimento pessoal e profissional, a quem serei eternamente grata. Tenho muito orgulho em dizer que tive a oportunidade em ser orientada por alguém que tanto admiro. Muito obrigada!

A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> **Kristianne Porta Santos Fernandes**, por estar sempre presente e disposta a ajudar em todas as etapas deste trabalho, pela dedicação, paciência e carinho. Agradeço por todos os ensinamentos, conselhos, lições e confiança. Registro aqui toda meu carinho e admiração.

A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> **Maria Fernanda Setubal Destro Rodrigues**, por toda atenção, apoio, paciência, por toda a ajuda que foi fundamental e indispensável durante a execução desse trabalho, deixo registrada toda minha admiração e carinho.

A prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> **Sandra Kalil Bussadori**, por todo carinho, atenção, por toda a ajuda, pela paciência, pelos conselhos e ensinamentos. Deixo registrada toda minha admiração e carinho.

Aos **professores** dos cursos de pós graduação em Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde, Ciências da Reabilitação e Medicina da UNINOVE, pelo convívio, ensinamentos e colaboração profissional. Agradeço a **Prof<sup>a</sup> Christiane Pavani, Prof<sup>a</sup> Adriana Lino, Prof<sup>a</sup> Daniela Teixeira, Prof. Rodrigo Labat e Prof. Alessandro Deana**, os quais eu tive a oportunidade de dividir momentos durante nosso Módulo Internacional, na França, e que tanto me auxiliaram no Congresso WALT 2018 em Nice. Muito obrigada!

Aos meus amigos do laboratório de Pesquisa da UNINOVE, **Gabriela, Tamiris, Andreia, Renan, Solange, Talita, Tatiana, Luciana, Marcelo, Marlon, Leandro, Evaldo**, obrigada pela amizade construída e pelo maravilhoso convívio que sempre foi um ponto de incentivo para nossas rotinas por vezes cansativas. Obrigada **Lucas Andreo e Agnelo Alves**, pela amizade, por toda ajuda e ao apoio necessário durante a execução deste trabalho, deixo registrada toda minha admiração e carinho.

Aos alunos de iniciação científica, **Thamires, Saulo, Debora, Lorian, Danilo, Samara, Laiane, Matheus, Renato, Wallace, Jacqueline, Thayná e Marcia**, por toda a ajuda durante a realização dos experimentos, sempre dispostos e esforçados a aprender mais e mais. Se tornaram mais que alunos, são meus sinceros amigos!

As **amizades** que construí durante as **aulas** do programa e em nosso incrível Módulo Internacional com destino a França. Fizeram que se tornasse a melhor e mais divertida viagem da minha vida! Obrigada por todo o apoio antes, durante e após minha primeira apresentação em um congresso internacional. Vocês são incríveis!

Aos atuais **funcionários do laboratório de Pesquisa** da UNINOVE **Haryanne, Nubia, Caren**, e aos que fizeram parte da equipe, **Eduardo, Giovanni**, por todo auxílio, colaboração, convívio, paciência e amizade construída.

As funcionárias da secretaria dos cursos de Pós-Graduação em Ciências da Reabilitação, Biofotônica e Medicina da UNINOVE, **Priscila** (xêmea), **Camila, Jéssica, Juliana, Mosielle**, agradeço por todo suporte necessário.

À **UNINOVE** pela bolsa de estudos concedida e por todo suporte necessário, bem como a **CAPES** pela concessão de mestrado, assim viabilizando minha dedicação exclusiva para a execução deste trabalho.

Gostaria de agradecer também a toda minha **família** e **amigos** que não estão citados nominalmente, por todo apoio, paciência, compreensão, sempre com muito amor e carinho. Obrigada pelo incentivo em minha busca por conhecimentos!

*“O mais importante uso do conhecimento na educação é compreender a importância de se desenvolver um bom coração.”*

**Dalai Lama**

## RESUMO

Devido ao seu papel funcional, o músculo esquelético representa um dos órgãos mais lesionados do corpo. Contudo, este tecido possui alta capacidade adaptativa e regenerativa garantida pela presença das células satélites (CS) que, após a lesão, passam pelas fases de proliferação, diferenciação e fusão para recompor o músculo afetado. Os macrófagos desempenham papel crucial nesse processo, modulando por meio de seus produtos, as diferentes fases do reparo muscular. A fotobiomodulação (FBM) tem demonstrado, efeitos positivos sobre o reparo muscular atuando na migração e proliferação celular, assim como sobre a síntese de mediadores inflamatórios em diferentes linhagens celulares de macrófagos e de mioblastos. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da FBM sobre a viabilidade, proliferação e diferenciação e síntese de óxido nítrico (NO), IL-6 e TNF- $\alpha$  de células satélites musculares (C2C12) indiferenciadas e induzidas a diferenciação quando cultivadas na presença do meio condicionado de macrófagos J774, ativados para perfil M1 (LPS e IFN- $\gamma$ ) e irradiados com os mesmos parâmetros dosimétricos. Foram avaliados as seguintes situações experimentais: (A) mioblastos C2C12 em meio de proliferação (10% de soro fetal bovino - SFB): (1) C2C12 NI (não-irradiada) + meio de proliferação, (2) C2C12 NI + meio condicionado de macrófagos (MM) não ativado, (3) C2C12 NI + M1 MM não-irradiado, (4) C2C12-FBM + M1 MM não-irradiado, (5) C2C12 NI + M1 MM irradiado, (6) C2C12- FBM + M1 MM irradiado; e (B) mioblastos C2C12 induzidas a diferenciação (2% soro de cavalo - SC): (7) C2C12 NI + meio de diferenciação, (8) C2C12 NI + MM não ativado, (9) C2C12 NI + M1 MM não-irradiado, (10) C2C12-FBM + M1 MM não-irradiado, (11) C2C12 NI + M1 MM irradiado, (12) C2C12- FBM + M1 MM irradiado. As irradiações foram realizadas utilizando laser Arseneto de Gálio Alumínio (780 nm, 70 mW, 17,5 J/cm<sup>2</sup>, 1 J). Os mioblastos C2C12 indiferenciados (10% SFB) e induzidos a diferenciação (2% SC - 72h) foram irradiados, plaqueados e receberam o meio condicionado de macrófagos nas concentrações finais de 30 e 50% (v/v) e foram incubados em 37°C, 5% CO<sub>2</sub> por 24 e 48h. Foram avaliados a viabilidade, proliferação celular e a síntese de NO através a técnica de MTT, Cristal Violeta e Griess, respectivamente, a síntese de IL-6 e TNF- $\alpha$  foi avaliada pela técnica de ELISA. A diferenciação dos mioblastos foi avaliada por meio da

contagem de núcleos e índice de fusão usando os corantes May Grunwald e Giemsa. Foram realizados três experimentos independentes. Todos os resultados foram submetidos a análise estatística. Os resultados demonstraram que o tratamento com FBM pode gerar efeitos positivos no que se refere ao aumento da viabilidade e proliferação de CS na fase proliferativa após 48h cultivadas em maior concentração (50%) de meio condicionado M1 irradiado e aumento da viabilidade de CS em fase de diferenciação após 48h cultivadas em diferentes concentrações e aumento da proliferação (48h) cultivado em menor concentração (30%) de meio condicionado de macrófagos M1 irradiados. Promoveu redução de NO em CS irradiadas em suas diferentes fases em diferentes concentrações de meio condicionado de macrófagos M1 irradiados após 24 e 48h. Redução da síntese das citocinas pró-inflamatórias em ambas concentrações de meio condicionado de macrófagos M1 irradiado, como: redução IL-6 em CS irradiadas em fase de proliferação após 24 e 48h de cultivo e redução da síntese de TNF- $\alpha$  após 48h em CS irradiadas nas fases de proliferação e diferenciação. E no favorecimento do processo de diferenciação (índice de fusão) de CS indiferenciadas e irradiadas (24 e 48h) e diferenciadas e irradiadas (48h) cultivadas em diferentes concentrações de meio condicionado de macrófagos M1 também irradiados. Em conclusão, a FBM pode gerar efeitos positivos em células satélites musculares em suas diferentes fases, quando cultivadas em meio a diferentes concentrações de produtos de macrófagos de perfil pró-inflamatório (M1) também submetidos a irradiação nos mesmos parâmetros, no que se refere a redução da síntese de NO e citocinas inflamatórias e no favorecimento do processo de diferenciação das células satélites musculares (índice de fusão).

**Palavras-chave:** células satélites musculares, lesão muscular aguda, macrófagos, meio condicionado, fotobiomodulação.

## ABSTRACT

Due to their functional role, skeletal muscles represent the most common organ susceptible to injuries. However, this tissue has a high adaptive and regenerative capacity due to the presence of satellite muscle cells (SC) that, after an acute injury, are able to activate, proliferate, differentiate and fuse to reconstitute the area that is injured. Macrophages have a great influence and importance to the skeletal muscle regeneration process, since the products secreted by them can influence the different stages of muscle repair. Photobiomodulation (PBM) has been demonstrated in the literature, positive effects in the process of muscle repair in the modulation of migration and cell proliferation viability, such as the synthesis of inflammatory mediators in different cell lines of macrophages and myoblasts. In the present study, the aim was to evaluate the effects of PBM in cell viability, proliferation and differentiation and synthesis of nitric oxide (NO), IL-6 and TNF- $\alpha$  on satellite muscle cells (C2C12) in undifferentiated and differentiated stages cultivated in a presence of activated M1 (LPS and IFN- $\gamma$ ) J774 macrophages profile conditioned medium irradiated with same dosimetric parameters. The groups were evaluated under the experimental conditions: (A) proliferation C2C12 myoblasts condition (10% Fetal Bovine Serum - FBS): (1) C2C12 NI (non-irradiated) + proliferation medium, (2) C2C12 NI + non-activated macrophage conditioned medium (MM), (3) C2C12 NI + M1 MM non-irradiated, (4) C2C12- PBM+ M1 MM non-irradiated, (5) C2C12 NI + M1 MM irradiated, (6) C2C12-PBM + M1 MM irradiated; and (B) myoblasts C2C12 in differentiation condition (2% Horse Serum – HS): (7) C2C12 NI (non-irradiated) + differentiation medium, (8) C2C12 NI + non-activated MM, (9) C2C12 NI + M1 MM non-irradiated, (10) C2C12- PBM+ M1 MM non-irradiated, (11) C2C12 NI + M1 MM irradiated, (12) C2C12-PBM + M1 MM irradiated. ). The irradiation was performed once using an aluminum-gallium-arsenide (780 nm, 70 mW, 17,5 J/cm<sup>2</sup>, 1 J). Myoblasts C2C12 were cultivated in proliferation medium (10% FBS) and a differentiation medium process were induced by replacing the proliferation medium to differentiation medium (2% HS – 72h), they were irradiated, seeded in plates and received 30 and 50% (v/v) of macrophage conditioned-medium and cells were incubated at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> for 24 and 48h. At the end of this period the cell viability, proliferation and the NO synthesis were assessed using MTT,

Crystal Violet and Griess method respectively and IL-6 and TNF- $\alpha$  synthesis were assessed using ELISA. Myoblasts differentiation was evaluated by nuclear distribution and fusion index May-Grunwald and Giemsa staining. Three independent experiments were performed. All results were analyzed statistically. The cells treated with PBM showed positive effects as regards in enhance of cell viability and proliferation of undifferentiated SC after 48h cultivated in a higher concentration (50%) of M1 conditioned medium irradiated and enhance in C2C12 differentiated viability (48h) cultivated in both concentrations and enhance proliferation (48h) when cultivated in lower concentration (30%) of M1 macrophage conditioned medium irradiated. Decreased NO synthesis of irradiated SC in proliferation and differentiation stages when was cultivated in both concentrations of M1 macrophages conditioned medium after 24 and 48h. At protein level, showed a pro-inflammatory cytokines decreased when cultivated in both concentrations, such as: IL-6 decreased in undifferentiated SC treated with PBM after 24 and 48h and TNF- $\alpha$  decreased after 48h of undifferentiated and differentiated SC. And PBM showed an advantage of differentiation process (index fusion) of undifferentiated SC (24 and 48h) and differentiated SC (48h) when cultivated in both concentrations of M1 macrophages conditioned médium irradiated. In conclusion, the PBM can generate positive effects in satellite muscle cells cultivated in a microenvironmetal with differents concentrations of products secreted by pro-inflammatory (M1) macrophages also irradiated with same dosimetric parameters, in relation to decrease in NO syntesis and inflammatory citokines and in the advantage of differentiation process of satellite muscle cells (fusion index).

**Keywords:** satellite muscle cells, acute muscle injury, macrophages, conditioned medium, photobiomodulation.

## SUMÁRIO

<b>Lista de tabelas</b> .....	<b>16</b>
<b>Lista de figuras</b> .....	<b>17</b>
<b>Lista de abreviações</b> .....	<b>20</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>23</b>
1.1. Células satélites, processo inflamatório e papel dos macrófagos no reparo muscular.....	23
1.2. Fotobiomodulação (FBM) no processo inflamatório e reparo muscular.....	26
1.2.1 Efeitos da FBM sobre macrófagos e seus produtos.....	27
1.2.2 Efeitos da FBM sobre células precursoras miogênicas e células satélites.....	28
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>30</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>32</b>
3.1. Geral .....	32
3.2. Específicos.....	32
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	<b>33</b>
4.1. Culturas celulares .....	33
4.1.1. Indução a diferenciação celular de mioblastos C2C12.....	34
4.1.2. Diferenciação fenotípica (ativação) dos macrófagos J774 para perfil M1	34
4.2. Tratamento das células utilizando a FBM .....	34
4.3. Grupos experimentais .....	37
4.4. Condicionamento do meio DMEM a partir do cultivo de macrófagos ativados para perfil M1 .....	39
4.5. Definição da concentração de meio condicionado de macrófagos de perfil M1 para o cultivo das células C2C12 .....	39
4.6. Tratamento das células C2C12 com o meio condicionado por macrófagos .....	40
4.7. Ensaio de Viabilidade celular - MTT .....	41
4.8. Proliferação celular – Cristal Violeta .....	41
4.9. Análise da síntese de Óxido Nítrico .....	42
4.10. Dosagem proteica das citocinas IL-6 e TNF- $\alpha$ .....	43
4.10.1. Normalização das amostras de acordo com a proteína total.....	44

4.11. Coloração May-Grunwald e Giemsa.....	44
4.11.1. Cálculo da distribuição de núcleos .....	45
4.11.2. Cálculo do índice de fusão .....	45
4.1. Análise Estatística.....	45
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>46</b>
5.1. Definição da concentração dose-resposta para o cultivo das células C2C12 em meio condicionado de macrófagos de perfil M1 .....	46
5.2. Efeito da FBM sobre a viabilidade das células C2C12 cultivadas em meio condicionado de macrófagos perfil M1 .....	50
5.2.1. Viabilidade de mioblastos indiferenciados .....	50
5.2.2. Viabilidade de mioblastos após o processo de indução a diferenciação.....	53
5.3. Efeito da FBM sobre a proliferação das células C2C12 cultivadas em meio condicionado por macrófagos perfil M1 .....	55
5.3.1. Proliferação de mioblastos indiferenciados .....	55
5.3.2. Proliferação de mioblastos após o processo de indução a diferenciação.....	58
5.4. Efeito da FBM sobre a síntese de óxido nítrico .....	61
5.4.1. Síntese de NO por mioblastos indiferenciados .....	61
5.4.2. Síntese de NO por mioblastos após o processo de indução a diferenciação.....	64
5.5. Efeito da FBM sobre a produção de citocinas .....	67
5.5.1. Produção de IL-6 .....	67
5.5.1.1. Produção de IL-6 por mioblastos indiferenciados.....	67
5.5.1.2. Produção de IL-6 por mioblastos induzidos a diferenciação .....	70
5.5.2. Produção de TNF- $\alpha$ .....	73
5.5.2.1. Produção de TNF- $\alpha$ por mioblastos indiferenciados.....	73
5.5.2.2. Produção de TNF- $\alpha$ por mioblastos induzidos a diferenciação .....	77
5.6. Análise morfológica quantitativa e qualitativa por May-Grunwald e Giemsa .....	80
5.6.1. Análise de mioblastos indiferenciados .....	80
5.6.2. Análise de mioblastos induzidos a diferenciação.....	88
5.7. Tabelas resumo dos resultados dos experimentos.....	96
5.7.1. Tabela resumo dos resultados de mioblastos indiferenciados.....	96

5.7.2. Tabela resumo dos resultados de mioblastos induzidos a diferenciação .....	97
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>98</b>
<b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>107</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>109</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resumo dos estudos, parâmetros e resultados do tratamento utilizando a FBM em diferentes tipos de macrófagos.....	27
Tabela 2. Resumo dos estudos, parâmetros e resultados do tratamento utilizando a FBM em células da linhagem C2C12 .....	29
Tabela 3. Parâmetros dosimétricos utilizados para o tratamento da FBM .....	35
Tabela 4. Descrição dos grupos experimentais conforme as fases das células satélites musculares (linhagem C2C12), meio condicionado cultivadas e tratamentos com FBM .....	38
Tabela 5. Resumo dos resultados de experimentos com mioblastos indiferenciados cultivados em meio condicionado de macrófagos.....	96
Tabela 6. Resumo dos resultados de experimentos com mioblastos induzidos a diferenciação cultivados em meio condicionado de macrófagos.....	97

## LISTA DE FIGURAS

Fig 1. Concentração dose-resposta sobre a viabilidade e síntese de óxido nítrico para o cultivo das células C2C12 indiferenciadas e induzidas a diferenciação em meio condicionado de macrófagos ativado para perfil M1 .....	47
Fig 2. Efeito da FBM sobre a viabilidade de mioblastos C2C12 indiferenciados cultivados em 30% de meio condicionado de macrófagos ativado para perfil M1 também irradiados.....	50
Fig 3. . Efeito da FBM sobre a viabilidade de mioblastos C2C12 indiferenciados cultivados em 50% de meio condicionado de macrófagos ativado para perfil M1 também irradiados.....	51
Fig 4. Efeito da FBM sobre a viabilidade de mioblastos C2C12 induzidos a diferenciação cultivados em 30% de meio condicionado de macrófagos ativado para perfil M1 também irradiados. ....	53
Fig 5. Efeito da FBM sobre a viabilidade de mioblastos C2C12 induzidos a diferenciação cultivados em 50% de meio condicionado de macrófagos ativado para perfil M1 também irradiados. ....	54
Fig 6. Efeito da FBM sobre a proliferação de mioblastos C2C12 indiferenciados cultivados em 30% de meio condicionado de macrófagos ativado para perfil M1 também irradiados.....	56
Fig 7. Efeito da FBM sobre a proliferação de mioblastos C2C12 indiferenciados cultivados em 50% de meio condicionado de macrófagos ativado para perfil M1 também irradiados.....	57
Fig 8. Efeito da FBM sobre a proliferação de mioblastos C2C12 induzidos a diferenciação cultivados em 30% de meio condicionado de macrófagos ativado para perfil M1 também irradiados. ....	59
Fig 9. Efeito da FBM sobre a proliferação de mioblastos C2C12 induzidos a diferenciação cultivados em 50% de meio condicionado de macrófagos ativado para perfil M1 também irradiados. ....	60

Fig 10. Efeito da FBM sobre a síntese de óxido nítrico de mioblastos C2C12 indiferenciados cultivados em 30% de meio condicionado de macrófagos ativados para perfil M1 também irradiados .....	62
Fig 11. Efeito da FBM sobre a síntese de óxido nítrico de mioblastos C2C12 indiferenciados cultivados em 50% de meio condicionado de macrófagos ativados para perfil M1 também irradiados .....	63
Fig 12. Efeito da FBM sobre a síntese de óxido nítrico de mioblastos C2C12 induzidos a diferenciação cultivados em 30% de meio condicionado de macrófagos ativados para perfil M1 também irradiados .....	65
Fig 13. Efeito da FBM sobre a síntese de óxido nítrico de mioblastos C2C12 induzidos a diferenciação cultivados em 50% de meio condicionado de macrófagos ativados para perfil M1 também irradiados .....	66
Fig 14. Efeito da FBM a produção de IL-6 de mioblastos C2C12 indiferenciados cultivados em 30% de meio condicionado de macrófagos ativados para perfil M1 também irradiados.....	68
Fig 15. Efeito da FBM sobre a produção de IL-6 de mioblastos C2C12 indiferenciados cultivados em 50% de meio condicionado de macrófagos ativados para perfil M1 também irradiados. ....	69
Fig 16. Efeito da FBM sobre a produção de IL-6 de mioblastos C2C12 induzidos a diferenciação cultivados em 30% de meio condicionado de macrófagos ativados para perfil M1 também irradiados. ....	71
Fig 17. Efeito da FBM sobre a produção de IL-6 de mioblastos C2C12 induzidos a diferenciação cultivados em 50% de meio condicionado de macrófagos ativados para perfil M1 também irradiados. ....	72
Fig 18. Efeito da FBM sobre a produção de TNF- $\alpha$ de mioblastos C2C12 indiferenciados cultivados em 30% de meio condicionado de macrófagos ativados para perfil M1 também irradiados. ....	75
Fig 19. Efeito da FBM sobre a produção de TNF- $\alpha$ de mioblastos C2C12 indiferenciados cultivados em 50% de meio condicionado de macrófagos ativados para perfil M1 também irradiados. ....	76

Fig 20. Efeito da FBM sobre a produção de TNF- $\alpha$ de mioblastos C2C12 induzidos a diferenciação cultivados em 30% de meio condicionado de macrófagos ativados para perfil M1 também irradiados .....	78
Fig 21. Efeito da FBM sobre a produção de TNF- $\alpha$ de mioblastos C2C12 induzidos a diferenciação cultivados em 50% de meio condicionado de macrófagos ativados para perfil M1 também irradiados .....	79
Fig 22. Análise morfológica, distribuição de núcleos e índice de fusão dos mioblastos indiferenciados e tratados, cultivados por 24h em 30% de meio condicionado de macrófagos ativados para perfil M1 também irradiados	81
Fig 23. Análise morfológica, distribuição de núcleos e índice de fusão dos mioblastos indiferenciados e tratados, cultivados por 48h em 30% de meio condicionado de macrófagos ativados para perfil M1 também irradiados	83
Fig 24. Análise morfológica, distribuição de núcleos e índice de fusão dos mioblastos indiferenciados e tratados, cultivados por 24h em 50% de meio condicionado de macrófagos ativados para perfil M1 também irradiados	85
Fig 25. Análise morfológica, distribuição de núcleos e índice de fusão dos mioblastos indiferenciados e tratados, cultivados por 48h em 50% de meio condicionado de macrófagos ativados para perfil M1 também irradiados	87
Fig 26. Análise morfológica, distribuição de núcleos e índice de fusão dos mioblastos induzidos a diferenciação e tratados, cultivados por 24h em 30% de meio condicionado de macrófagos ativados para perfil M1 também irradiados	89
Fig 27. Análise morfológica, distribuição de núcleos e índice de fusão dos mioblastos induzidos a diferenciação e tratados, cultivados por 48h em 30% de meio condicionado de macrófagos ativados para perfil M1 também irradiados	91
Fig 28. Análise morfológica, distribuição de núcleos e índice de fusão dos mioblastos induzidos a diferenciação e tratados, cultivados por 24h em 50% de meio condicionado de macrófagos ativados para perfil M1 também irradiados	93
Fig 29. Análise morfológica, distribuição de núcleos e índice de fusão dos mioblastos induzidos a diferenciação e tratados, cultivados por 48h em 30% de meio condicionado de macrófagos ativados para perfil M1 também irradiados	95

## LISTA DE ABREVIÇÕES

ANOVA	Análise de variância
C2C12	Linhagem de células musculares derivadas de camundongos
CK	Creatino-quinase
cm <sup>2</sup>	centímetro quadrado
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
COX-2	Ciclooxigenase 2
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Meio Eagle Modificado por Dulbecco)
E. Coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FBM	Fotobiomodulação
GaAIs	Arseneto de Gálio-Alumínio
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IL-1 $\alpha$	Interleucina 1 alfa
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-12	Interleucina 12
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
J	Joule
J/cm <sup>2</sup>	Joules por centímetro quadrado
J774	Linhagem celular de macrófagos tumorais derivados de sarcoma de camundongos Balb/c
LBI	Laser em baixa intensidade
LPS	Lipopolissacarídeo
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
min	minuto
mW	miliwatts

mW/cm <sup>2</sup>	milliwatt por centímetro quadrado
M1	Macrófagos de fenótipo 1
M2	Macrófagos de fenótipo 2
MM	Meio condicionado de macrófagos
NF-K $\beta$	Fator nuclear kappa beta
nm	nanômetros
NO	Óxido nítrico
PBS	Phosphate-buffered saline (solução salina tamponada com fosfato)
pH	Potencial hidrogênico
rpm	Rotações por minuto
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SC	Soro de cavalo
SFB	Soro fetal bovino
Th1	Citocina pró-inflamatória do tipo 1
Th2	Citocina anti-inflamatória do tipo 2
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
$\mu$ L	microlitros
°C	graus Celsius

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Células satélites, processo inflamatório e papel dos macrófagos no reparo muscular

O músculo esquelético é composto, principalmente, pelas células musculares e por células nervosas com papel de inervar este tecido e garantir sua função contrátil, transformando a força em movimento. Devido ao seu papel funcional, o músculo esquelético representa um dos órgãos mais lesionados do corpo<sup>1,2</sup>. Contudo, este tecido possui alta capacidade adaptativa e regenerativa garantida pela presença de células mononucleadas progenitoras conhecidas como células satélites (CS), que tem a capacidade de proliferação e diferenciação e que podem fundir-se as regiões lesionadas em fibras musculares já existentes ou gerar novas fibras musculares<sup>1-5</sup>.

As CS estão localizadas na periferia do músculo esquelético maduro, entre a lâmina basal e o sarcolema e participam diretamente do processo de reparo tecidual uma vez que, após uma lesão muscular, juntamente com o processo inflamatório, elas serão ativadas e denominadas mioblastos<sup>6,7</sup>. Devido aos danos causados a membrana das células musculares e ativação das células satélites há a liberação de moléculas quimioatrativas, antes armazenadas, que medeiam o início da resposta inflamatória e induzem o intenso recrutamento das células de defesa para a área lesionada<sup>5,8</sup>.

Após a lesão muscular os neutrófilos são as primeiras células mieloides a invadir a área, atingindo concentração máxima em cerca de quatro a seis horas e apresentando declínio após esse período. Essa prévia invasão possibilita a mudança no microambiente da lesão direcionando outras células de defesa, como os macrófagos, para a região através de fatores quimioatrativos (como os debris das fibras lesionadas contendo componentes endógenos, extracelulares e fragmentos de DNA) que se ligam a receptores de membrana de macrófagos induzindo a população para o perfil pró-inflamatório ou M1. Assim, macrófagos com alta atividade fagocitária e capazes de sintetizar vários mediadores pró-inflamatórios invadem o local do músculo lesionado, alcançando elevadas concentrações após 24 horas e permanecem em elevada concentração por um período de cerca de dois dias.

Os macrófagos são considerados células-chave efetoras e moduladoras da resposta imune na geração e resolução do processo inflamatório e reparo tecidual, devido suas características de plasticidade e diversidade fenotípica. Suas funções são baseadas nos sinais do microambiente, composto por diversas citocinas, fatores de crescimento e padrões moleculares associados a patógenos e padrões moleculares associados a danos (PMAPs e DAMPs) durante as diferentes fases do processo inflamatório do tecido. Seus objetivos são defender, recuperar e manter a homeostase tecidual, através do remodelamento e reparo<sup>9,10</sup>.

A resposta inflamatória após a lesão apresenta predominante ativação do fenótipo pró-inflamatório M1, conhecida como ativação clássica. Suas funções são associadas a ativação de citocinas tipo T<sub>H</sub>1 na habilidade e representatividade em induzir a perpetuação da resposta inflamatória e seus marcadores característicos, possuindo ação pró-regenerativa durante a fagocitose das fibras musculares necrosadas, para regeneração destas ou formação de novas<sup>5</sup>.

Posteriormente, há o aumento de outra população de macrófagos, de característica reparadora (perfil M2), que atinge concentração pico em quatro dias pós-lesão e se mantém significativamente elevada por dias<sup>5,11</sup>.

A identificação dos macrófagos em diferentes fenótipos busca sua categorização de acordo com a extensa variedade de suas funções, onde a definição como M1 e M2 pode ser um modelo limitado devido a complexidade de suas características. Em qualquer momento avaliado após a lesão, o infiltrado inflamatório consiste em uma combinação dos macrófagos em diferentes estados de ativação, expressando marcadores associados ao fenótipo M1 e M2 simultaneamente, porém apresentam predominância tempo-dependente após a ocorrência da lesão<sup>9,12</sup>.

Dentre as citocinas envolvidas na fase aguda da inflamação, a IL-6 é considerada como citocina multifuncional, desenvolvendo importante papel na resposta imune inata e adquirida. Possui influência na miogênese, atuando como fator estimulador da proliferação de células precursoras miogênicas e, conseqüentemente, inibindo o processo de diferenciação<sup>8,13,14</sup>.

O TNF- $\alpha$  é outro mediador da resposta inflamatória primariamente sintetizado por macrófagos e age diretamente como um indutor da expressão e

síntese de citocinas de caráter inflamatório atuando, como a IL-6, na amplificação do processo inflamatório<sup>13</sup>. Foi evidenciado que os mioblastos também expressam essa citocina constitutivamente. Ambas as citocinas IL-6 e TNF- $\alpha$  atuam induzindo a proliferação e migração de mioblastos, a quimioatração de células mieloides, e em altas concentrações inibem a fase de fusão dos mioblastos e afetam sua diferenciação inicial em miotubos<sup>5,15,16</sup>.

Os macrófagos de fenótipo M1 geram uma intensa conversão de L-arginina em L-citrulina, que é um potente produtor de moléculas efetoras como espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO)<sup>5,6</sup>.

O NO é uma espécie reativa de nitrogênio produzida enzimaticamente pela óxido nítrico sintase (NOS). No músculo esquelético, as isoformas (iNOS, nNOS e eNOS) a partir da conversão de L-arginina em L-citrulina<sup>17</sup>. Na condição fisiológica o músculo esquelético sintetiza esta molécula em baixas concentrações, porém a inflamação gera incremento da produção de NO dado o aumento da expressão de iNOS<sup>17-19</sup>.

O NO é capaz de favorecer a ativação e proliferação das CS imediatamente após a lesão, dada sua característica de vasodilatação local, para a manutenção do pool de reserva celular em seu estado quiescente, assim prevenindo o esgotamento das mesmas em casos de lesões musculares severas<sup>1,20</sup>. A literatura também evidencia que o NO é um ativador primário das CS, sendo importante molécula capaz de transformar os estímulos mecânicos em sinais moleculares<sup>21</sup>.

As concentrações adequadas deste mediador também são necessárias para que durante o processo de reparo muscular, envolvendo a fase de fusão dos mioblastos a miotubos, estudo<sup>21</sup> demonstrou que a inibição farmacológica da NOS mantém as células em processo de proliferação e o tratamento de mioblastos C2C12 com um fármaco doador de óxido nítrico demonstrou relação dose-dependente na significativa redução da viabilidade celular<sup>22</sup>. A concentração baixa a moderada de NO é capaz de exercer efeito contra o estresse oxidativo, dano e morte celular, porém a produção exacerbada no músculo esquelético induz um ambiente de caráter oxidativo, sendo que a produção de altos níveis destes produtos podem promover dano ao tecido muscular<sup>5,6,19</sup>.

A mudança no fenótipo dos macrófagos M1 para M2 possui importante impacto no microambiente do tecido muscular, onde previamente realizada a remoção de resíduos celulares e ativação das células satélites que iniciam o estágio de divisão celular visando a reposição das células satélites quiescentes e, posteriormente ocorre a expansão simétrica dos mioblastos, essa transição é capaz de promover a diferenciação e crescimento das fibras musculares visando a recuperação tecidual<sup>4,5</sup>. No estágio seguinte, a diferenciação inicial promove o alinhamento das células precursoras miogênicas para se fundir, na fase terminal do reparo muscular, em miotubos<sup>4,23</sup>. A inibição do recrutamento do fenótipo pró-inflamatório (M1) ao local da lesão causa o prolongamento do estado necrótico das fibras musculares, bem como a depleção do fenótipo anti-inflamatório (M2) no processo de reparo muscular é capaz de reduzir o diâmetro de fibras musculares imaturas. Assim, indicando o papel indispensável dos macrófagos no processo de reparo muscular<sup>15</sup>.

## **1.2. Fotobiomodulação (FBM) no processo inflamatório e reparo muscular**

Buscando alternativas que favoreçam a modulação do processo de reparo muscular, a FBM utilizando laser em baixa intensidade (LBI) se destaca demonstrando efeitos positivos sobre suas diferentes fases, inclusive no que se refere à modulação das CS e de macrófagos.

A FBM interage com diferentes cromóforos na célula e em especial com a enzima terminal da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, citocromo c oxidase (CCO), induzindo um aumento na produção de ATP através da enzima ATP sintase. A citocromo C oxidase é o fotorreceptor primário por conter cromóforos que absorvem a luz monocromática tanto no espectro vermelho quanto infravermelho do laser, sendo responsável pela transdução de sinais iniciais em células e tecidos<sup>24-26</sup>. Recente estudo de Karu (2014)<sup>24</sup>, sugere a também a influência da irradiação sobre canais iônicos presentes na membrana de células excitáveis e não excitáveis. Esses canais, são proteínas que formam poros através da bicamada lipídica de células eucariontes e permitem a passagem de ions entre os meios intra e extra celulares.

Estudos *in vitro* demonstraram que a FBM apresentou resultados positivos tanto no que se refere a modulação de células musculares quanto de células inflamatórias, e em especial os macrófagos<sup>27-30</sup>.

### 1.2.1 Efeitos da FBM sobre macrófagos e seus produtos

Estudo utilizando a linhagem de macrófagos J774 cultivada com LPS e IFN- $\gamma$  para mimetizar o processo inflamatório e essas células irradiadas com laser em 660 nm (15 mW, 7,5 J/cm<sup>2</sup>) e 780 nm (70 mW, 3 J/cm<sup>2</sup>), onde ambos os grupos ativados e irradiados com esses diferentes parâmetros apresentaram resultados semelhantes no que se referem a atividade mitocondrial<sup>27</sup>.

Fernandes *et al.*<sup>28</sup> demonstraram, a partir da ativação para fenótipo M1 dos macrófagos de linhagem J774, que o laser no comprimento de onda 780 nm (70mW, 1750 mW/cm<sup>2</sup>, 2,6 J/cm<sup>2</sup>, 0,08 J) proporcionou redução mais acentuada na expressão de TNF- $\alpha$ , iNOS, e na síntese proteica de TNF- $\alpha$  e COX-2. Por outro lado, a irradiação com 660 nm, (15 mW, 375 mW/cm<sup>2</sup>, 7,5 J/cm<sup>2</sup>, 0,22 J) foi capaz de reduzir a expressão e síntese de IL-6.

Outros estudos<sup>29,30</sup>, *in vitro*, mostraram os efeitos do laser sobre a polarização de macrófagos J774 ativados para perfil M1, onde a irradiação no espectro infravermelho (780 nm, 17,5 J/cm<sup>2</sup>, 70 mW, 1 J) foi capaz de reduzir significativamente a expressão e síntese de citocinas de caráter pró-inflamatório IL-6 e TNF- $\alpha$ <sup>29</sup>.

Gavish *et al.* (2008)<sup>31</sup> evidenciaram, em células de linhagem RAW 264.7 ativados com LPS que a irradiação com laser infravermelho (780 nm, 2 mW/cm<sup>2</sup>, 2,2 J/cm<sup>2</sup>) gerou a redução da expressão de MCP-1 e das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , IL-10, IL-6, porém apresentou aumento da síntese de NO 12 horas após o tratamento.

Na tabela a seguir estão aglutinados os estudos *in vitro* que avaliaram o efeito do laser infravermelho (780 nm) em diferentes linhagens e culturas primárias de macrófagos, assim como os que utilizaram a linhagem J774 que já foram descritos.

Tabela 1. Resumo dos estudos, parâmetros e resultados do tratamento *in vitro* utilizando a FBM em diferentes tipos de macrófagos.

Artigo	Comprimento de onda (nm)	Potência (mW)	Densidade de potência (mW/cm <sup>2</sup> )	Energia (J)	Densidade de energia (J/cm <sup>2</sup> )	Células	Efeitos observados (↑=aumento; ↓=redução)
GAVISH et al. (2008) <sup>31</sup>	780	–	2	–	2,2	Linhagem RAW 264.7	↓ expressão gênica de MCP-1, IL-1β, IL-1α, IL-10, IL-6. ↑ secreção de NO após 12h.
SOUSA et al. (2009) <sup>32</sup>	780	70	1750	0,21	3	Cultura primária de macrófagos - lavado peritoneal ativado com LPS	↓ síntese proteica de TNF-α
SOUZA et al. (2014) <sup>27</sup>	780	70	1750	0,08	3	Macrófagos J774 ativados com LPS e INFγ	↓ AM após 1 dia e ↑ AM após 3 dias de ativação
FERNANDES et al. (2015) <sup>28</sup>	780	70	1750	0,08	2,6	Macrófagos J774 ativados com LPS e INFγ	↓ expressão gênica de TNF-α e iNOS e redução na síntese de TNF-α e COX-2 e IL-6

### 1.2.2 Efeitos da FBM sobre células precursoras miogênicas e células satélites

Mesquita-Ferrari *et al.*<sup>33</sup> evidenciaram que a FBM utilizando o laser infravermelho (780 nm, 10 mW e 5 J/cm<sup>2</sup>) promoveu um aumento da viabilidade de mioblastos C2C12 induzidos a diferenciação após 24, 48 e 72 horas do tratamento. E avaliada também, nesse estudo, a atividade de CK apresentou aumento após 72 horas quando comparada ao grupo controle.

Outro estudo *in vitro* evidenciou que o laser AsGaAl nos parâmetros de 830nm (37 mW, 0,3 J/cm<sup>2</sup>), 685nm (36,2 mW, 0,6 J/cm<sup>2</sup>) e 670nm (1,2 J/cm<sup>2</sup>) induziu aumento na taxa de proliferação de células precursoras miogênicas de

cultura primária de 84,3%, 70,6% e 56,8%, respectivamente<sup>34</sup>. Entretanto, Ferreira *et al.* (2009)<sup>35</sup> e Mesquita-Ferrari *et al.* (2011)<sup>36</sup> avaliaram o efeito do tratamento com laser ,utilizando diversos parâmetros, nos comprimentos de onda de 660 nm (15 mW, 37,5 mW/cm<sup>2</sup> e 3,8 J/cm<sup>2</sup>; 25 mW, 62,5 mW/cm<sup>2</sup> e 6,3 J/cm<sup>2</sup>; 40 mW, 100 mW/cm<sup>2</sup> e 10 J/cm<sup>2</sup>) e 780 nm (15 mW, 37,5 mW/cm<sup>2</sup> e 3,8 J/cm<sup>2</sup>; 40 mW, 100 mW/cm<sup>2</sup> e 10 J/cm<sup>2</sup>; 70 mW, 175 mW/cm<sup>2</sup> e 17,5 J/cm<sup>2</sup>) e não evidenciaram alteração da proliferação de mioblastos da linhagem C2C12, cultivados sem a indução de diferenciação.

Estudo avaliando os efeitos do tratamento com laser dual infravermelho (808~980 nm, 3 W, 22,8 J/cm<sup>2</sup>, 53 s) em células C2C12 induzidas a diferenciação apresentou, no que se refere a sinalização mitocondrial, aumento da atividade da enzima AMPK e de p38 MAPK<sup>37</sup>.

Por outro lado, quando avaliado o cultivo de mioblastos C2C12 indiferenciados em meio condicionado de macrófagos J774 ativados para perfil M1 e posteriormente irradiado (660 e 780 nm, em 20, 40 e 70 mW), não apresentaram diferenças na análise da diferenciação em relação as células que foram ativadas e não tratadas<sup>30</sup>.

Na tabela a seguir estão demonstrados estudos *in vitro*, previamente descritos, os parâmetros utilizados e resumo dos resultados observados utilizando laser infravermelho para tratamento de células da linhagem C2C12.

Tabela 2. Resumo dos estudos, parâmetros e resultados do tratamento *in vitro* utilizando a FBM em células da linhagem C2C12.

Artigo	Comprimento de onda (nm)	Potência (mW)	Densidade de potência (mW/cm <sup>2</sup> )	Energia (J)	Densidade de energia (J/cm <sup>2</sup> )	Efeitos observados (↑=aumento; ↓=redução)
FERREIRA et al, 2009 <sup>35</sup>	780	15	37,5	—	3,8	Sem diferenças significativas na viabilidade celular após 24h em todos os grupos.
		40	100		10	
		70	175		17,5	
MESQUITA-FERRARI et al, 2011 <sup>36</sup>	780	15	37,5	—	3,8	Sem diferenças significativas na proliferação celular para todos os parâmetros e períodos de incubação.
		40	100		10	
		70	175		17,5	
MESQUITA-FERRARI et al, 2015 <sup>33</sup>	780	10	0,25	0,2	5	↑ viabilidade celular. ↑ atividade de CK (72h).
NGUYEN et al., 2014 <sup>37</sup>	~808-980	3000	—	—	22,8	↑ sinalização mitocondrial: AMPK, p38 MAPK

Os resultados apresentados mostram a capacidade instituída da FBM e seu desempenho sobre os macrófagos ativados para fenótipo pró-inflamatório e sobre mioblastos C2C12, porém não há estudos que apresentem os efeitos dessa ferramenta terapêutica sobre os produtos de macrófagos ativados para o perfil M1 e o que é gerado em células C2C12 também irradiadas quando são cultivadas nesse microambiente, no que se se refere a viabilidade e proliferação celular, os efeitos das citocinas e óxido nítrico produzidos sobre a diferenciação dos mioblastos. Assim, no âmbito de atuação da FBM na regeneração muscular durante o processo inflamatório, estudos se fazem necessários<sup>25,38</sup>.

## 2. JUSTIFICATIVA

Os macrófagos são apontados como importantes células durante o reparo muscular, por coordenarem as fases inflamatória, proliferativa e de remodelamento tecidual após a lesão. Já as células precursoras miogênicas são responsáveis pela recomposição da área lesionada e regeneração, levando a recomposição do tecido muscular. A FBM tem demonstrado papel relevante com efeitos positivos na modulação do reparo muscular de forma segura e eficaz<sup>32,33,35,39,40</sup>. Porém, poucos estudos exploraram seus efeitos sobre macrófagos e sobre a relação destas células com as células precursoras miogênicas.

Essa dissertação visou mimetizar *in vitro* a condição que acontece *in vivo* quando o tratamento com a FBM é aplicada no tecido muscular para a recuperação das lesões agudas, uma vez que esta terapia modularia tanto a células musculares quanto as células inflamatórias.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Geral

Avaliar, *in vitro*, os efeitos da FBM sobre células satélites musculares indiferenciadas e induzidas a diferenciação quando cultivadas na presença de meio condicionado de macrófagos, ativados para perfil M1 e irradiados com os mesmos parâmetros dosimétricos.

#### 3.2 Específicos

Avaliar os efeitos da FBM em mioblastos C2C12 indiferenciados e induzidos a diferenciação cultivados em meio condicionado de macrófagos J774 ativados para perfil M1 e irradiados com os mesmos parâmetros dosimétricos, no que se refere a:

- Síntese de óxido nítrico (NO);
- Viabilidade celular;
- Proliferação celular;
- Síntese proteica de citocinas: Interleucina-6 (IL-6) e Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ );
- Índice de fusão;
- Avaliação qualitativa da morfologia celular e análise inferencial da distribuição de núcleos de mioblastos C2C12, através de: células mononucleadas, binucleadas e multinucleadas.

## 4. METODOLOGIA

Este estudo foi realizado no laboratório de Pesquisa do Programa de Mestrado e Doutorado em Biofotônica aplicada às Ciências da Saúde da Universidade Nove de Julho – UNINOVE, Campus Vergueiro, São Paulo-SP.

### 4.1. Culturas celulares

Foi utilizada a linhagem de células precursoras miogênicas C2C12 (derivada de camundongos) doada pelo Prof. Dr. Ernesto Belizário ambos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP) e a linhagem de macrófagos J774 (derivada de camundongos BALB/c) que foi doada pelo Prof. Dr. Carlos Pelleschi Taborda.

As células foram cultivadas no meio de cultura de *Eagle* modificado por *Dulbecco* (DMEM, Vitrocell, Campinas, SP, Brasil), pH 7,4 contendo 10% de soro fetal bovino (Vitrocell, Campinas, SP, Brasil) para ambas as linhagens (C2C12 e J774).

As culturas foram mantidas em estufa (HEPA class 3110, Thermo Electron Corporation, OH, EUA) a 37°C, numa atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. A monitorização do crescimento celular foi realizada a cada 24 horas, utilizando-se microscópio invertido de fase (Eclipse TE 2000U, Nikon, Melville, NY, EUA).

O subcultivo foi realizado em fluxo laminar (Linha 400, Pachane, Piracicaba/SP, Brasil) sempre que a monocamada celular atingir o ponto de subconfluência para a perpetuação da linhagem. Para tanto, o sobrenadante foi removido, as células lavadas com tampão PBS 1X (NaCl 140mM; KCl 2,5mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,4mM; pH 7.4). Os mioblastos C2C12 foram tratados com solução de tripsina 0,1%/EDTA durante 5 minutos a 37°C e após incubação realizada nova lavagem com meio. Os macrófagos J774 foram desaderidos em PBS 1X utilizando o *scraper cell* (TPP, Suíça). Em seguida ambas as culturas foram centrifugadas a 1200 rpm a 10°C por 5 minutos (Centrífuga Excelsa 4-280R, Fanem, São Paulo, SP, Brasil) e posteriormente ressuspensas em 1mL de meio DMEM.

A viabilidade celular, bem como a contagem do número de células durante o subcultivo e anteriormente aos ensaios, foi avaliada em câmara de Neubauer corando as células com Azul de Trypan (0,4%). Foram utilizadas nos ensaios somente as culturas com viabilidade superior a 95%.

#### **4.1.1 Indução a diferenciação celular de mioblastos C2C12**

As células C2C12, após sua expansão também foram cultivadas em meio de diferenciação, composto por DMEM (Vitrocell, Campinas, SP, Brasil) com a adição de 2% (v/v) de soro de cavalo (SC) durante o período de 72 horas em estufa a 37°C. A troca do SFB por SC, quando cultivadas pelo período descrito, é capaz de induzir a diferenciação das células C2C12 através saída do ciclo celular e por sua mudança morfológica na formação de miotubos (células multinucleadas)<sup>41-43</sup>.

#### **4.1.2 Diferenciação fenotípica (ativação) dos macrófagos J774 para perfil M1**

Para induzir a diferenciação para o fenótipo M1, a cultura de macrófagos J774 foi tratada com solução de DMEM contendo LPS de *Escherichia coli* O26:B6 (Sigma, St Louis, MO) a 1,0µg/mL<sup>31,43</sup> e Interferon-gama (IFN- $\gamma$  - Sigma, St Louis, MO) a 0,2µg/mL<sup>33,34,45</sup>. O meio DMEM foi suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) e a cultura permaneceu nesta condição por 2 horas (período de ativação)<sup>31</sup>. Para isso os macrófagos foram divididos em três grupos em placas de Petri de 60mm, sendo: controle (não-ativado e não-irradiado), M1 (ativado e não-irradiado) e M1+ FBM (ativado e irradiados).

#### **4.2. Tratamento das células utilizando a FBM**

As culturas de macrófagos J774 dos grupos experimentais foram irradiadas 2 horas<sup>32</sup> após o início da sua ativação utilizando o aparelho Twin-laser (MM Optics, São Carlos, SP, Brasil). As células da cultura C2C12 indiferenciadas foram irradiadas após demonstrar viabilidade adequada conforme métodos descritos no item 4.1. E as células C2C12 submetidas a

indução a diferenciação foram irradiadas 72 horas após a incubação meio contendo soro de cavalo (2% v/v).

Devido a ampla variedade da escolha dos parâmetros dosimétricos (comprimento de onda, potência, irradiância, exposição irradiante, energia, entre outros), a literatura se mostra incipiente em relação aos efeitos da FBM sobre macrófagos, células satélites musculares e outros tipos celulares, e apresentam efeitos diversos e por vezes antagônicos<sup>44,45</sup>.

Assim, nesse contexto as escolhas paramétricas foram baseadas em estudos *in vivo* de reparo muscular de lesões agudas de Guimarães et al. (2016)<sup>40</sup>, Souza et al. (2018)<sup>46</sup> e Andreo et al. (2018)<sup>47</sup>, considerando os notáveis efeitos obtidos na utilização do laser no espectro infravermelho (780 nm). Em relação a utilização da FBM em modelos *in vitro* de macrófagos J774 e células satélites musculares C2C12, foram utilizados os mesmos parâmetros (780 nm) dos estudos de Mesquita-Ferrari et al. (2015)<sup>33</sup>, (70 mW, 17,5 J/cm<sup>2</sup>) Mesquita-Ferrari et al. (2011)<sup>36</sup>, Fernandes et al. (2015)<sup>28</sup> e (15 s, 1 J) estudos ainda não publicados.

Tabela 3. Parâmetros dosimétricos utilizados para o tratamento da FBM.

<b>Comprimento de onda (nm)</b>	780
<b>Largura espectral (nm)</b>	10
<b>Modo de funcionamento</b>	Contínuo
<b>Potência (mW)</b>	70
<b>Polarização</b>	Random
<b>Diâmetro de abertura (cm)</b>	0,23
<b>Irradiância na abertura (mW/cm<sup>2</sup>)</b>	1750
<b>Área do feixe (cm<sup>2</sup>)</b>	0.04
<b>Tempo (s)</b>	15
<b>Exposição radiante (J/cm<sup>2</sup>)</b>	17,5
<b>Número de pontos irradiados</b>	1
<b>Área irradiada (cm<sup>2</sup>)</b>	0,04
<b>Técnica de aplicação</b>	Contato
<b>Número de sessões e frequência</b>	1
<b>Energia total (J)</b>	1

As irradiações foram realizadas apenas uma vez em tubos de centrifugação contendo o precipitado celular posicionando a ponteira do equipamento laser perpendicular à base do tubo, de modo que a luz atingisse diretamente o pellet de células antes que ultrapassasse o meio de cultura<sup>28,33,35,36</sup>.

Todos os experimentos foram realizados em ambiente de penumbra para não sofrer interferência da luz externa. As células dos grupos não tratados sofreram a mesma manipulação, mas não foram irradiadas com laser.

As culturas de C2C12, acrescida ou não do meio condicionado de macrófagos foram cultivadas conforme métodos descritos nos itens 4.4 e 4.6.

### **4.3. Grupos experimentais**

Os grupos experimentais para a avaliação do efeito da FBM sobre a cultura de células precursoras miogênicas cultivadas em meio condicionado de macrófagos ativados para perfil M1 foram descritos abaixo e representados de forma direta na tabela 4.

#### **(A) Células C2C12 cultivadas em meio de proliferação:**

**1 – C2C12 não irradiada (NI) em meio de proliferação:** Mioblastos C2C12 indiferenciados e não-tratados, que receberam meio DMEM suplementado com 10% SFB.

**2 – C2C12 NI em meio condicionado de macrófagos (MM) não-ativado:** Mioblastos C2C12 indiferenciados e não-tratados, que receberam 30 e 50% de sobrenadante de macrófagos J774 não ativados.

**3 – C2C12 NI em MM M1 não-irradiado:** Mioblastos C2C12 indiferenciados e não-tratados, que receberam 30 e 50% de sobrenadante de macrófagos J774 ativados para perfil M1 não-irradiados.

**4 – C2C12-FBM em MM M1 não-irradiado:** Mioblastos C2C12 indiferenciados e tratados com a FBM, que receberam 30 e 50% de sobrenadante de macrófagos J774 ativados para perfil M1 não-irradiados.

**5 – C2C12 NI em MM M1 irradiado:** Mioblastos C2C12 indiferenciados e não-tratados que receberam 30 e 50% de sobrenadante de macrófagos J774 ativados para perfil M1 e irradiados.

**6 – C2C12-FBM em MM M1 irradiado:** Mioblastos C2C12 indiferenciados e tratados com a FBM, que receberam 30 e 50% de sobrenadante de macrófagos J774 ativados para perfil M1 e irradiados nos mesmos parâmetros.

#### **(B) Células C2C12 previamente induzidas a diferenciação:**

**7 – C2C12 NI em meio de diferenciação:** Células C2C12 induzidas à diferenciação, não-tratadas, que receberam meio DMEM suplementado com 2% SC.

**8 – C2C12 NI em MM não-ativado:** Células C2C12 induzidas à diferenciação, não-tratadas, que receberam 30 e 50% de sobrenadante de macrófagos J774 não ativados.

**9 – C2C12 NI em MM M1 não-irradiado:** Células C2C12 induzidas à diferenciação, não-tratadas, que receberam 30 e 50% de sobrenadante de macrófagos J774 ativados para perfil M1 não-irradiados.

**10 – C2C12-FBM em MM M1 não-irradiado:** Células C2C12 induzidas à diferenciação e tratadas com a FBM que receberam 30 e 50% de sobrenadante de macrófagos J774 ativados para perfil M1 não-irradiados.

**11 – C2C12 NI em MM M1 irradiado:** Células C2C12 induzidas à diferenciação, não-tratadas, que receberam 30 e 50% de sobrenadante de macrófagos J774 ativados para perfil M1 e irradiados.

**12 – C2C12-FBM em MM M1 irradiado:** Células C2C12 induzidas à diferenciação e tratadas com a FBM que receberam 30 e 50% de sobrenadante de macrófagos J774 ativados para perfil M1 e irradiados nos mesmos parâmetros.

Tabela 4. Descrição dos grupos experimentais conforme as fases das células satélites musculares (linhagem C2C12), meio condicionado cultivadas e tratamentos com FBM.

Grupos	C2C12 indiferenciada	C2C12 com diferenciação induzida	Meio condicionado de macrófagos não ativados	Meio condicionado de macrófagos M1
A-1	+	-	-	-
A-2	+	-	+	-
A-3	+	-	-	-
A-4	+ FBM	-	+	-
A-5	+	-	-	+ FBM
A-6	+ FBM	-	-	+ FBM
B-7	-	+	-	-
B-8	-	+	+	-
B-9	-	+	-	-
B-10	-	+ FBM	-	-
B-11	-	+	-	+ FBM
B-12	-	+ FBM	-	+ FBM

#### 4.4. Condicionamento do meio DMEM a partir do cultivo de macrófagos ativados para perfil M1

As culturas de macrófagos foram ativadas por 2 horas conforme descrito anteriormente, após este período foram lavadas (4 vezes) com meio sem soro fetal bovino, irradiadas (conforme grupo experimental) e, em seguida, foram incubadas por 24 horas em meio contendo 5% de SFB. O meio de cultivo das diferentes placas então foi recolhido, após o período de incubação, e denominado meio condicionado<sup>41,42</sup>.

#### 4.5. Definição da concentração de meio condicionado de macrófagos de perfil M1 para o cultivo das células C2C12

Os efeitos dos macrófagos, bem como dos produtos por eles secretados, podem ser considerados benéficos ou deletérios dependendo da fase do processo inflamatório, da quantidade presente dessas células de defesa e o tipo de tecido acometido. Estudo<sup>41</sup> sugere ainda que esses efeitos podem ser mensurados, em estudos *in vitro*, e possuem resposta dependente da

concentração do sobrenadante de macrófagos na qual as células de interesse forem cultivadas.

Para isso, foi realizada a ativação apenas do grupo M1 (ativados e não-irradiados) e após a coleta do meio condicionado, como descrito em 4.1.2 e 4.4. Assim, foi empregado nas células C2C12 indiferenciadas e induzidas a diferenciação, previamente semeadas ( $1 \times 10^4$  por poço) em placas de 96 poços de fundo chato (TPP, Trasadingen, Schaffhausen, Suíça) o meio condicionado nas seguintes concentrações finais (v/v): 100%, 70%, 50%, 30% e 20%<sup>42,43,48,49</sup>, sendo o meio complementar composto pelo meio de cultivo das células C2C12 nas diferentes condições (10% SFB para células C2C12 indiferenciadas ou 2% SC para células C2C12 previamente induzidas a diferenciação). As células foram então incubadas pelos períodos de 24 e 48 horas em estufa a 37°C. Após esse período, o sobrenadante contido nos poços foi coletado e realizada a remoção das células mortas com lavagem utilizando PBS pH 7,4.

Para a dosagem da síntese de óxido nítrico das amostras, foi utilizado o método de Griess, conforme descrito no item 4.8. Para a avaliação da viabilidade celular das células C2C12 de todos os grupos foi realizado o ensaio utilizando a técnica de MTT (conforme descrito em 4.6).

#### **4.6. Tratamento das células C2C12 com o meio condicionado por macrófagos**

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<sup>43</sup>.

As células C2C12, previamente cultivadas em meio DMEM com 10% de soro fetal bovino (indiferenciadas) e com 2% de soro de cavalo por 72 horas (indução de diferenciação) e irradiadas (conforme grupo experimental) foram semeadas ( $1 \times 10^4$  por poço) em placas de 96 poços de fundo chato (TPP, Trasadingen, Schaffhausen, Suíça).

Foram adicionados 30 e 50% dos devidos meio condicionado por macrófagos (como descrito no item 5.1), tratados ou não com laser, conforme

tabela 4, e cultivadas por 24 e 48 horas em estufa a 37°C<sup>41</sup>. A escolha das concentrações de meio condicionado por macrófagos foi baseada na viabilidade, bem como da síntese de óxido nítrico das células C2C12 indiferenciadas e induzidas a diferenciação quando estas foram incubadas em M1 MM.

#### **4.7. Ensaio de Viabilidade celular - MTT**

Para determinar a viabilidade celular foi utilizada a técnica de MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide – CAS 57360-69-7 – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)<sup>44,45</sup>. O MTT é reduzido pela enzima succinato desidrogenase à cristais de *formazan* na mitocôndria como, também, no nucléolo, lisossomos e complexo de Golgi podendo relacionar diretamente seu teor dada a análise colorimétrica com a viabilidade celular.

As células ( $1 \times 10^4$  por poço), de todos os grupos experimentais previamente incubadas em placas de 96 poços de fundo chato (TPP, Trasadingen, Schaffhausen, Suíça) mantidas em seus devidos meios condicionados, conforme tabela 4, analisados após 24 e 48 horas de incubação. Cada grupo foi analisado em quadruplicata e os testes realizados 3 vezes de forma independente.

Transcorrido o tempo experimental, o sobrenadante contido nos poços foi armazenado e a remoção das células mortas se deu com lavagem utilizando PBS pH 7,4. A cada poço foi adicionado 50µL da solução de MTT 0,5% (p/v) e incubado por 3h em estufa (HEPA class 3110, Thermo Electron Corporation) a 37°C, fluxo de 5% de CO<sub>2</sub> e atmosfera úmida. Transcorrido o tempo, o conteúdo de cada poço foi lisado com 100µL de Isopropanol (Synth, Diadema, SP, Brasil) para solubilização dos cristais. Por fim, a leitura da densidade óptica (620nm) foi realizada em Leitor de Microplacas (Anthos2020<sup>®</sup>, Anthos Labtec Instruments, Wals, Austria).

#### **4.8. Proliferação celular – Cristal Violeta**

As células ( $1 \times 10^4$  por poço), de todos os grupos experimentais previamente incubadas em placas de 96 poços de fundo chato (TPP,

Trasadingen, Schaffhausen, Suíça) mantidas em seus devidos meios condicionados, conforme tabela 4, analisados após 24 e 48 horas de incubação. Cada grupo foi analisado em quadruplicata e os testes foram realizados três vezes de forma independente.

Transcorrido o tempo experimental, o sobrenadante contido nos poços foi coletado, armazenado e a remoção das células mortas foi dada com lavagem utilizando PBS pH 7,4. A cada poço foi adicionado 40µL da solução do corante Cristal Violeta na concentração de 5% (p/v) em 20% de metanol (v/v) e incubado por 15 minutos em temperatura ambiente. Passado o tempo, os poços foram lavados duas vezes com água destilada para a retirada do excesso de corante. As células foram lisadas e o conteúdo solubilizado acrescentando 100µL de Metanol (Synth, Diadema, SP, Brasil) em cada poço. Após homogeneização, foi determinada a densidade óptica (620nm) em Leitor de Microplacas (Anthos2020®, Anthos Labtec Instruments, Wals, Austria).

#### **4.9. Análise da síntese de Óxido Nítrico**

Para avaliar a produção de óxido nítrico pelas células C2C12 indiferenciadas e induzidas a diferenciação de todos os grupos experimentais, foi utilizado o método de Griess. Esta técnica permite detectar e quantificar, por espectrofotometria, nitrito orgânico em amostras a partir da cor vermelho-intenso (composto *díazo*) formado após a reação do Nitrito com Sulfonilamida em meio ácido (reação de Griess).

As células ( $1 \times 10^4$  por poço), de todos os grupos experimentais previamente incubadas em placas de 96 poços de fundo chato (TPP, Trasadingen, Schaffhausen, Suíça) mantidas em seus devidos meios condicionados, conforme tabela 4, analisados após 24 e 48 horas de incubação.

Transcorrido o tempo de incubação, 50µL do sobrenadante foi coletado e transferido rapidamente, num ambiente de penumbra, para uma nova placa de 96 poços (TPP), totalizando quatro poços por grupo experimental. A curva padrão de Nitrito foi composta de soluções DMEM suplementado com 10% SFB ou 2% SC + Nitrito nas concentrações de 0, 5, 10, 20, 40, 80 e 160 µM, partindo

de uma solução estoque concentrada de 10mM de Nitrito. Em seguida, 50µL de reagente de Griess foi adicionado por poço. Após 10 minutos em obscuridade, foi determinada a absorbância (492nm) em leitor de microplacas (Anthos2020). Foram realizados 3 experimentos independentes com a quadruplicata de cada grupo experimental.

#### **4.10. Dosagem proteica das citocinas IL-6 e TNF-α**

A citocinas Interleucina-6 e Fator de Necrose Tumoral-α são proteínas pró-inflamatória com papel de quimioatração de células mieloides e satélites e aumentar a proliferação de mioblastos<sup>35</sup>. Entretanto, segundo Tidball<sup>5</sup>, sua presença pode inibir tanto a progressão das células satélites no estágio inicial da diferenciação quanto a fusão dos mioblastos em miotubos<sup>46,47,48</sup>.

A partir dos sobrenadantes das células C2C12 indiferenciadas e induzidas a diferenciação, dos diferentes grupos experimentais, a dosagem proteica foi realizada por meio da técnica de imunoenensaio – ELISA, utilizando o kit comercial (Biolegend®, San Diego, USA).

Para esta análise as células C2C12 ( $1 \times 10^4$ ) indiferenciadas e induzidas à diferenciação foram previamente incubadas em placas de 96 poços de fundo chato (TPP, Trasadingen, Schaffhausen, Suíça) e mantidas em seus devidos meios condicionados, conforme tabela 4.

Após 24 e 48 horas de cultivo das células C2C12 em contato com o meio condicionado por macrófagos dos diferentes grupos experimentais, o sobrenadante de cada grupo foi empregado na quantificação proteica de IL-6 e TNF-α. Para a técnica de ELISA sanduíche, foram utilizados os kits comerciais para IL-6 (Biolegend mouse IL-6-ELISA MAX™ Standard Sets-431301, Pacific Heights Blvd., San Diego, CA 92121), TNF-α (Biolegend mouse TNF-α - ELISA MAX™ Standard Sets -430901, Pacific Heights Blvd., San Diego, CA 92121) seguindo os protocolos descritos pelo fabricante. Foram realizados três experimentos independentes.

#### 4.10.1 Normalização das amostras de acordo com a proteína total

Para a correção das variações das análises, a proteína total foi quantificada em um NanoDrop 2000 (ThermoScientific) a partir de uma amostra do sobrenadante de todos os grupos experimentais, nos diferentes períodos de avaliação (24 e 48h). A dosagem de proteína total (mg/mL), de cada grupo, foi então utilizada como proporção para a os valores de absorbância obtidos a partir da dosagem proteica de IL-6 e TNF- $\alpha$ .

#### 4.11. Coloração May-Grunwald e Giemsa

Para verificar a morfologia após os procedimentos experimentais, foi realizada a coloração das células através da técnica de coloração utilizando os corantes May-Grunwald e Giemsa. Esse método possibilita evidenciar os núcleos e a estrutura dos mioblastos e miotubos, assim como calcular os índices de fusão devido o processo de diferenciação celular e a proporção da distribuição de núcleos de acordo com a fase de proliferação ou diferenciação das CS <sup>50</sup>.

Para isso, as células C2C12 ( $1 \times 10^4$  por poço) indiferenciadas e induzidas a diferenciação foram incubadas em placas de 96 poços nas diferentes condições experimentais, conforme tabela 4, pelos períodos de 24 e 48 horas. Cada grupo foi analisado em quadruplicata e os testes foram realizados três vezes de forma independente.

Após os períodos de incubação, o sobrenadante contido nos poços foi coletado e as células foram lavadas com PBS gelado. As células foram fixadas adicionando em cada poço 40  $\mu$ L de álcool metílico (Synth, Diadema, SP, Brasil) por 5 minutos e as placas foram secas durante 10 minutos em fluxo laminar. Em seguida adicionado 40 $\mu$ L do corante May-Grunwald (Renylab, Barbacena, MG, Brasil) diluído 1:3 em solução tampão sódio-fosfato (1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 1mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 5,8) por 5 minutos, os poços foram lavados duas vezes com água destilada e, na sequência, incubados em 40 $\mu$ L do corante Giemsa (Renylab, Barbacena, MG, Brasil) diluído 1:20 em solução tampão sódio-fosfato durante 10 minutos. Posteriormente, os poços foram lavados 2x com PBS e as placas foram secas em temperatura ambiente para posterior observação.

As imagens foram obtidas de cinco campos aleatórios dos poços dos diferentes grupos experimentais utilizando-se o microscópio invertido de fase (Eclipse TE), com magnificação 40X<sup>51</sup>.

#### **4.11.1 Cálculo da distribuição de núcleos**

Com o auxílio do plugin Cell Counter do software Image J (National Institute of Health - NIH, EUA), através das imagens obtidas, foi realizada a contagem da quantidade total de núcleos presentes em cada um dos campos fotografados.

Os núcleos contidos nas imagens foram subdivididos em três classes: mioblastos mononucleados, mioblastos binucleados (fusão de dois núcleos) e miotubos multinucleados (>2 núcleos). A distribuição de núcleos (%) por campo foi calculada:  $([\text{número de núcleos compondo os mioblastos ou miotubos por campo}] / [\text{total de núcleos presente por campo}] \times 100)^{51,52}$ . Posteriormente a média dos cinco campos foi calculada.

#### **4.11.2 Cálculo do índice de fusão**

Para o cálculo do índice de fusão foram considerados os valores (%) obtidos nas classes dos mioblastos binucleados e miotubos multinucleados por campo (descrito no item 4.11.1.), esses valores foram então somados e posteriormente calculada a média.

### **4.1. Análise Estatística**

A distribuição da normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Todos os valores foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão e a comparação entre os tratamentos foi verificada utilizando o teste de Variância de uma via (*one-way analyses of variance*, ANOVA). A significância estatística entre os grupos experimentais foi verificada pelo teste de Tukey com nível de aceitação igual ou superior a 95%. Os dados foram analisados utilizando-se o *software* GraphPad Prism 5.01.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Definição da concentração dose-resposta para o cultivo das células C2C12 em meio condicionado de macrófagos de perfil M1

Na avaliação da viabilidade das células C2C12 indiferenciadas cultivadas em meio condicionado de macrófagos J774 ativados para o perfil M1 após 24h de incubação (Figura 1A), o grupo das células indiferenciadas apresentou redução na viabilidade ( $p < 0,001$ ) quando são cultivadas em uma concentração de 100% de M1 MM comparado ao grupo cultivado em meio de proliferação (controle). O mesmo grupo, 100% M1 MM, também apresentou redução significativa na viabilidade em relação aos demais grupos cultivados em menores concentrações de meio condicionado M1 ( $p < 0,001$ ). Entre os demais grupos experimentais não houve diferenças estatísticas.

Após 48h de incubação (Figura 1B), as células C2C12 continuaram a apresentar redução da viabilidade quando cultivadas em 100% M1 MM em comparação ao grupo somente em meio de proliferação ( $p < 0,001$ ). Foi possível observar um aumento crescente da viabilidade dos grupos que receberam menores concentrações de M1 MM ( $p < 0,001$ ). Já quando os demais grupos são comparados ao grupo que recebeu o meio de proliferação (controle) houve uma redução significativa na viabilidade nos grupos 70 ( $p < 0,01$ ), 50 ( $p < 0,05$ ) e 20% ( $p < 0,05$ ) e valores próximos ao grupo proliferação no que foi usado 70% e 30% M1 MM ( $p < 0,01$ ).

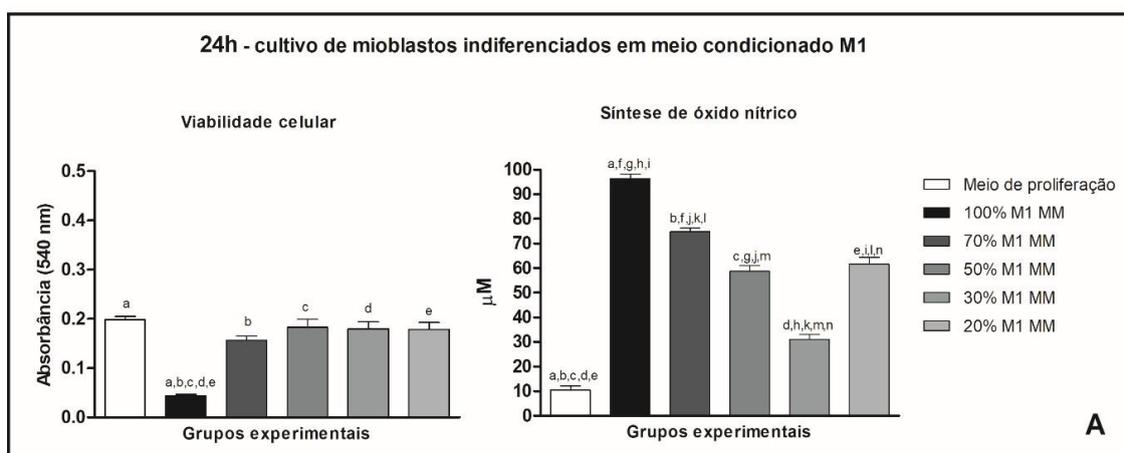
Em relação ao NO, após 24 e 48h houve um aumento da síntese nos grupos que receberam M1 MM em relação ao grupo cultivado apenas na presença de meio de proliferação, sendo esse mais pronunciado nos grupos que receberam maiores concentrações de M1 MM (Figura 1A e 1B). Em 48h o grupo que recebeu 20% M1 MM apresentou valores semelhantes ao grupo que não recebeu M1 MM. Os grupos em todas as concentrações foram capazes de apresentar diferença estatística em relação aos grupos que receberam 100 e 70% M1 MM ( $p < 0,001$ ). O grupo que recebeu 30% M1 MM apresentou redução na síntese de óxido nítrico em comparação ao grupo que recebeu 50% M1 MM

( $p < 0,01$ ). Por outro lado, o grupo que recebeu 20% M1 MM apresentou aumento da síntese de óxido nítrico em relação ao grupo 30% M1 MM ( $p < 0,01$ ).

O tratamento com meio condicionado de macrófagos ativados para perfil M1 de mioblastos que foram previamente induzidos à diferenciação (72h em 2% SC) não apresentou diferenças estatísticas entre os grupos em 24h de cultivo (Figura 1C). Porém após 48h (Figura 1D) foi possível observar aumento crescente da viabilidade dos grupos que receberem menores concentrações em relação ao grupo 100% M1 MM ( $p < 0,001$ ). O grupo 70% M1 MM também apresentou redução na viabilidade comparado ao grupo 20% M1 MM ( $p < 0,01$ ). Não houve diferenças estatísticas entre os demais grupos.

Referente a síntese de NO após 24h de cultivo, as células C2C12 induzidas a diferenciação cultivadas nas diferentes concentrações de M1 MM apresentaram aumento da produção em relação ao grupo em meio de diferenciação ( $p < 0,01$ ) e valores semelhantes ao grupo 30% M1 MM ( $p < 0,05$ ). As células cultivadas em 30% M1 MM apresentaram menor síntese de NO em relação aos grupos em maiores e menor concentrações ( $p < 0,01$ ).

Após 48h de incubação, os grupos em maiores concentrações (100 e 70% M1 MM) apresentaram aumento da síntese de NO em relação ao grupo cultivado apenas em meio de diferenciação ( $p < 0,01$ ). Já os grupos que receberam 50% ( $p < 0,01$ ), 30 e 20% ( $p < 0,001$ ) apresentaram decrescente redução em relação a 100% de M1 MM.



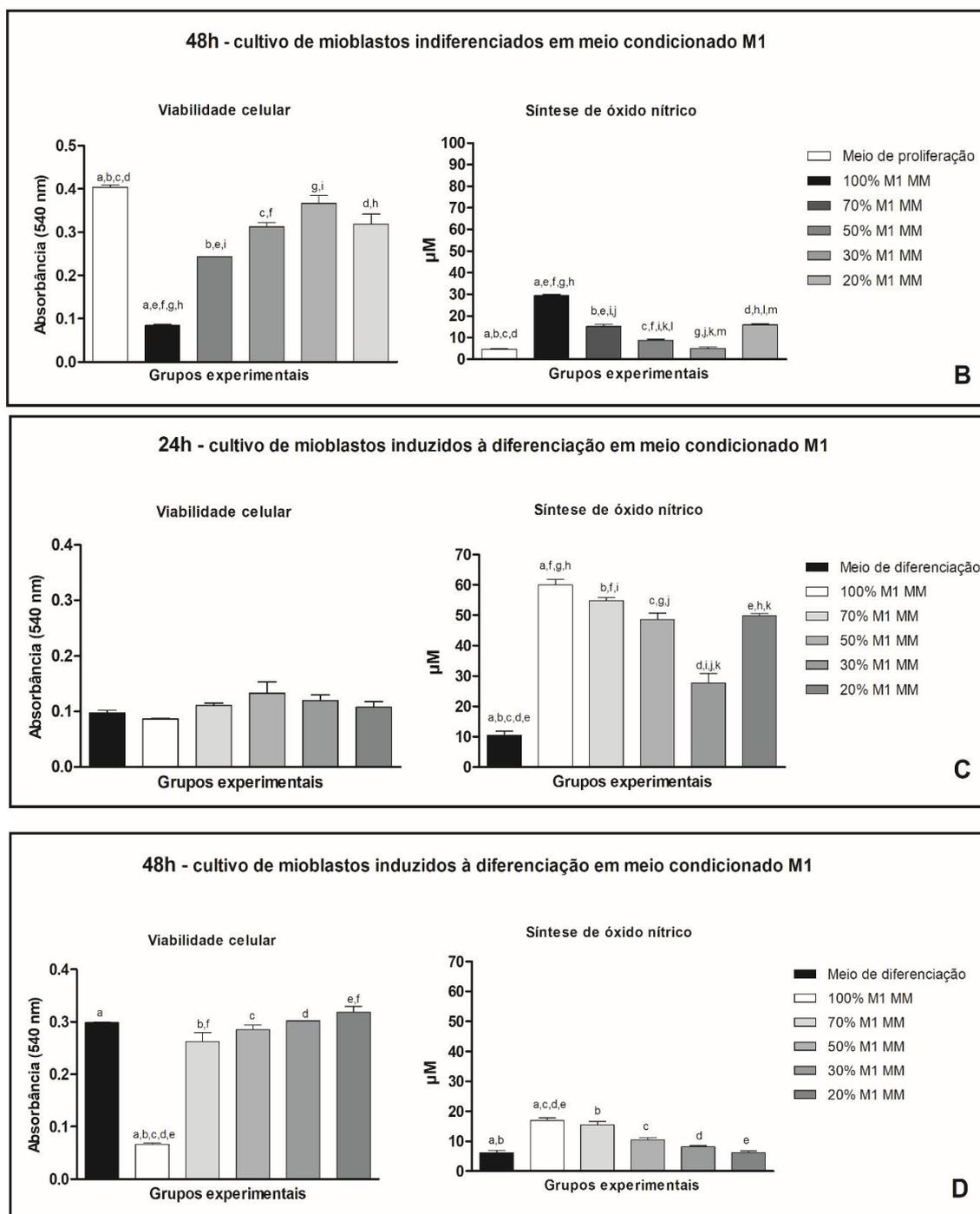


Fig 1. Concentração dose-resposta sobre a viabilidade e síntese de óxido nítrico para o cultivo das células C2C12 indiferenciadas e induzidas a diferenciação em meio condicionado de macrófagos ativados para perfil M1. Viabilidade celular e síntese de óxido nítrico de mioblastos C2C12 ( $1 \times 10^4$  célula/poço) indiferenciados (A e B) e dos grupos C2C12 previamente induzidas a diferenciação (C e D) quando cultivados em 100, 70, 50, 30 e 20% de meio condicionado de macrófagos J774 ativados para perfil M1 (LPS +IFN- $\gamma$  por 2h), com meios complementares de proliferação e diferenciação - avaliação após 24 e 48h após a adição do meio condicionado. Viabilidade celular avaliada pelo método de MTT. Síntese de óxido nítrico avaliada pelo método de Griess. Barras representam médias e erro padrão. (ANOVA/Tukey). Abreviações: MM, meio condicionado de macrófagos.

Para a escolha da concentração de meio condicionado de macrófagos ativado para perfil M1 empregados no cultivo de células satélites musculares, foi empregado como critério a resposta a viabilidade celular e síntese de óxido nítrico. Segundo Kravchenko *et al.*<sup>43</sup> os macrófagos ativados predominantemente para a via clássica (M1) possui efeitos citotóxicos sobre mioblastos e miotubos principalmente devido a intensa síntese de óxido nítrico e ativação da subclasse da enzima NO-sintase induzida, causando assim o agravamento do dano ao tecido muscular.

Considerando que os grupos que receberam 100% M1 MM demonstraram brusca redução da viabilidade celular de mioblastos indiferenciados e induzidos a diferenciação, assim como altos níveis de síntese de óxido nítrico, esta não foi considerada uma concentração ideal para demais experimentos. Já a concentração de 70% M1 MM no que se refere ao óxido nítrico, apresentou níveis de sua síntese ainda elevados, bem como a redução da viabilidade celular em relação as menores concentrações de M1 MM avaliadas, levando em consideração as células em suas diferentes situações de cultivo. Bem como a concentração de 20% M1 MM apresentou diversas variações tempo-dependentes na síntese de óxido nítrico e viabilidade celular e demonstrou instabilidade em seus resultados, não podendo ser considerada ideal para a utilização nesse estudo.

Assim, de acordo com Saclier *et al.*<sup>41</sup>, considerando que as respostas das células são dependentes da concentração do meio condicionado de macrófagos, foram avaliadas as concentrações de 50 e 30% M1 MM, demonstrando que estas foram capazes de apresentar viabilidade ideais, assim como os níveis de síntese de óxido nítrico das células C2C12 após os períodos avaliados.

## **5.2. Efeito da FBM sobre a viabilidade das células C2C12 cultivadas em meio condicionado de macrófagos perfil M1**

### **5.2.1 Viabilidade de mioblastos indiferenciados**

As células C2C12 indiferenciadas quando cultivadas em 30% de meio condicionado de macrófagos (Figura 2), por um período de 24h, de todos os grupos experimentais avaliados demonstraram redução na viabilidade celular quando comparados ao grupo C2C12 NI que recebeu o meio de proliferação ( $p < 0,001$ ). O grupo C2C12 NI que recebeu MM não ativado também apresentou maior viabilidade celular em comparação ao grupo C2C12 NI que recebeu M1 MM irradiado ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença estatística entre os demais grupos C2C12 que foram tratados ou não com FBM e que receberam os diferentes meios condicionados ativados para perfil M1 também irradiados.

Já nas culturas incubadas por 48h (Figura 2) todos os grupos, em exceção ao grupo C2C12-FBM que recebeu M1 MM não-irradiado, demonstraram redução na viabilidade dos mioblastos C2C12 em relação ao grupo C1C12 NI que recebeu o meio de proliferação. Não houve diferença estatística entre os demais grupos.

Quando os mioblastos C2C12 indiferenciados foram cultivados em 50% de meio condicionado de macrófagos (Figura 3), na avaliação após 24h do período de incubação, o grupo C2C12-FBM que recebeu M1 MM não-irradiado apresentou aumento na viabilidade relação as células dos grupos: C2C12 NI que recebeu MM não ativado ( $p < 0,05$ ), C2C12 NI que recebeu M1 MM não irradiado ( $p < 0,01$ ) e ao grupo C2C12 NI que foi empregado o M1 MM irradiado ( $p < 0,01$ ).

Após 48h de incubação o grupo C2C12 NI que recebeu MM não ativado apresentou redução na viabilidade dos mioblastos quando comparado ao grupo C2C12 NI que recebeu o meio de proliferação ( $p < 0,05$ ). Já o efeito da FBM foi capaz de causar aumento da viabilidade celular em ambos os grupos C2C12 NI que recebeu o M1 MM irradiado ( $p < 0,05$ ) e o grupo C2C12-FBM que recebeu o M1 MM irradiado ( $p < 0,001$ ) em relação aos grupos C2C12 NI que receberam MM não ativado e M1 MM não irradiado. Quando ambas as células foram

irradiadas, como o grupo C2C12-FBM que recebeu M1 MM irradiado foi capaz de apresentar aumento na viabilidade celular em relação aos grupos em que apenas uma das linhagens celulares receberam o tratamento, porém este aumento não foi estatisticamente significativo.

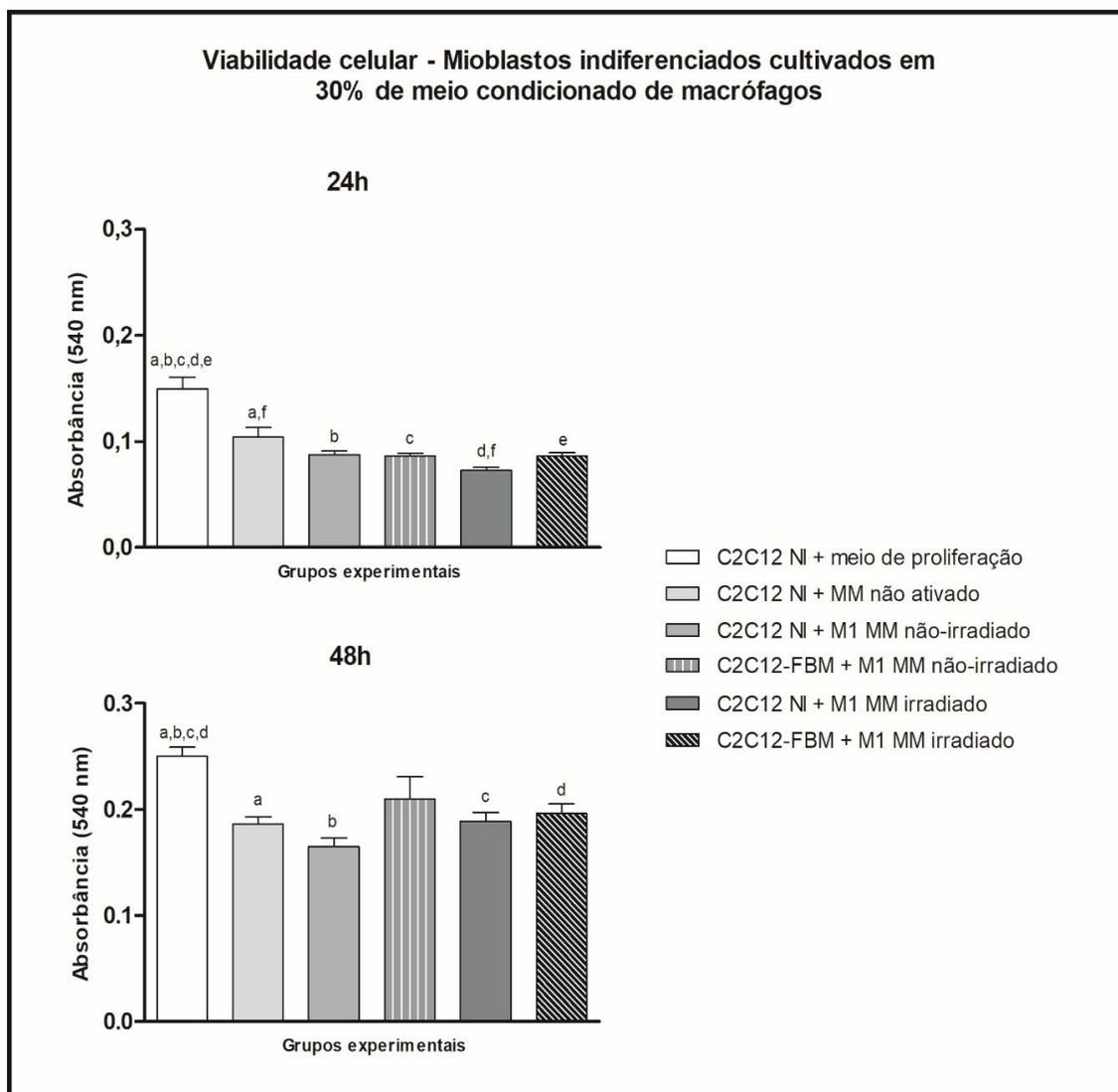


Fig 2. Efeito da fotobiomodulação (FBM) sobre a viabilidade de mioblastos C2C12 indiferenciados cultivados em 30% de meio condicionado de macrófagos ativado para perfil M1 também irradiados. Ensaio MTT de mioblastos C2C12 ( $1 \times 10^4$  célula/poço) tratados com FBM (de acordo com grupos experimentais) com adição dos meios condicionados de macrófagos J774 ativados com LPS +IFN- $\gamma$  por 2 horas (M1) e irradiados com laser nos mesmos parâmetros (conforme grupo experimental) - avaliação com 24 e 48h de incubação após irradiações de mioblastos e plaqueamento com devidos meio condicionado. As mesmas letras representam diferença significativa entre grupos. Barras representam médias e desvio padrão. Abreviações: FBM, fotobiomodulação; MM, meio condicionado de macrófagos.

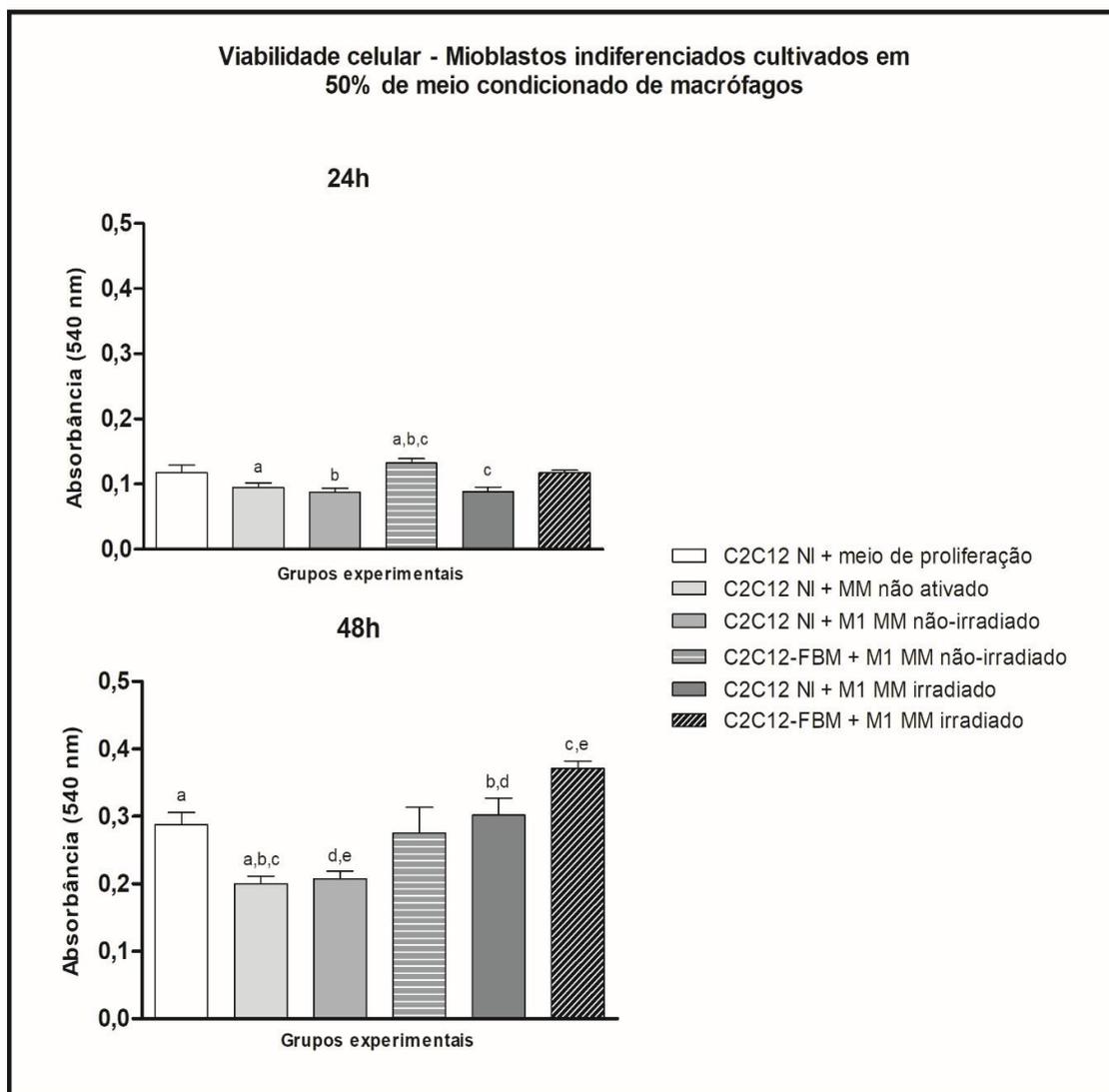


Fig 3. Efeito da FBM sobre a viabilidade de mioblastos C2C12 indiferenciados cultivados em 50% de meio condicionado de macrófagos ativados para perfil M1 também irradiados. Ensaio MTT de mioblastos C2C12 ( $1 \times 10^4$  célula/poço) tratados com FBM (de acordo com grupos experimentais) com adição dos meios condicionados de macrófagos J774 ativados com LPS +IFN- $\gamma$  por 2 horas (M1) e irradiados com laser nos mesmos parâmetros (conforme grupo experimental) - avaliação com 24 e 48h de incubação após irradiações de mioblastos e plaqueamento com devidos meio condicionado. As mesmas letras representam diferença significativa entre grupos. Barras representam médias e desvio padrão. Abreviações: FBM, fotobiomodulação; MM, meio condicionado de macrófagos.

### 5.2.2 Viabilidade de mioblastos após o processo de indução a diferenciação

Os mioblastos previamente induzidos a diferenciação em 2% de SC por 72h que foram cultivados em 30% de meio condicionado de macrófagos (Figura 4), quando avaliados após o período de 24h de incubação os grupos C2C12 NI que receberam ambos M1 MM não irradiado e irradiado apresentaram redução da viabilidade celular em relação ao grupo C2C12 NI que recebeu o meio de diferenciação ( $p < 0,01$ ). Os grupos C2C12-FBM, mantiveram a viabilidade celular independente do meio condicionado que receberam, não apresentando diferenças estatísticas em relação ao grupo que recebeu o meio de diferenciação (controle).

Após 48h de incubação o grupo C2C12-FBM cultivado em M1 MM irradiado apresentou aumento na viabilidade celular em comparação a todos grupos experimentais ( $p < 0,001$ ). Houve também aumento da viabilidade das células do grupo C2C12 NI cultivadas em M1 MM irradiado comparado ao grupo C2C12 NI que recebeu M1 MM não-irradiado ( $p < 0,01$ ).

Quando os mioblastos C2C12 foram cultivados em 50% de meio condicionado de macrófagos (Figura 5), após 24h de incubação foi possível observar uma tendência ao aumento da viabilidade dos grupos que receberam tratamento com FBM, porém esses aumentos não foram estatisticamente significantes. Não houve diferença estatística entre os demais grupos experimentais.

Após 48h de incubação o grupo C2C12-FBM cultivado em M1 MM também irradiado apresentou aumento na viabilidade das células quando comparado aos grupos: C2C12 NI que recebeu MM não ativado ( $p < 0,05$ ), C2C12 NI cultivado em M1 MM não-irradiado ( $p < 0,001$ ) e C2C12 NI que recebeu M1 MM irradiado ( $p < 0,01$ ). Não houve diferença estatística entre os demais grupos.

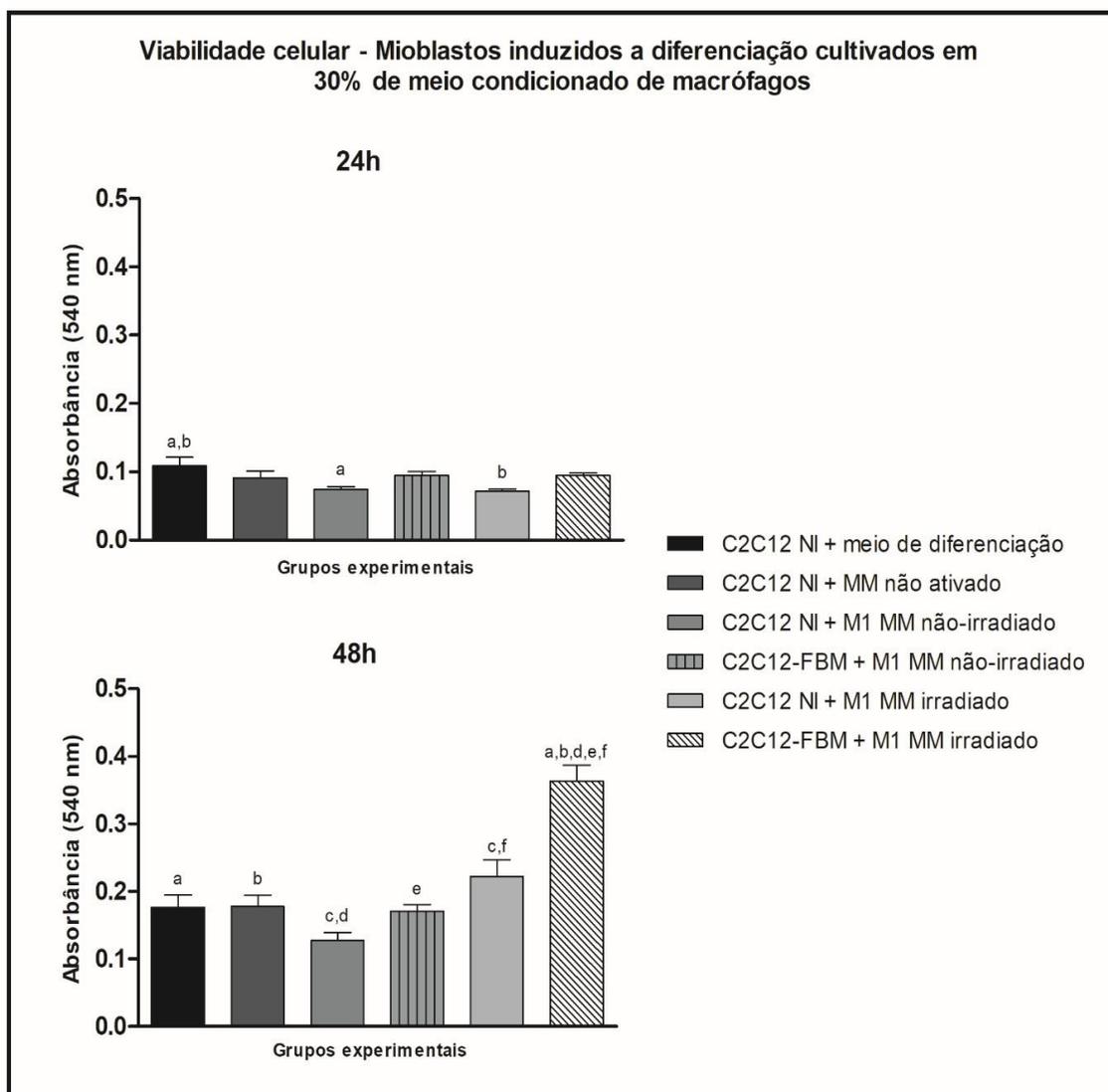


Fig 4. Efeito da FBM sobre a viabilidade de mioblastos C2C12 induzidos a diferenciação cultivados em 30% de meio condicionado de macrófagos ativados para perfil M1 também irradiados. Ensaio MTT de mioblastos C2C12 induzidos a diferenciação em 2% SC por 72h ( $1 \times 10^4$  célula/poço) tratados com FBM (de acordo com grupos experimentais) com adição dos meios condicionados de macrófagos J774 ativados com LPS +IFN- $\gamma$  por 2 horas (M1) e irradiados com laser nos mesmos parâmetros (conforme grupo experimental) - avaliação com 24 e 48h de incubação após irradiações de mioblastos e plaqueamento com devidos meio condicionado. As mesmas letras representam diferença significativa entre grupos. Barras representam médias e desvio padrão. Abreviações: FBM, fotobiomodulação; MM, meio condicionado de macrófagos.

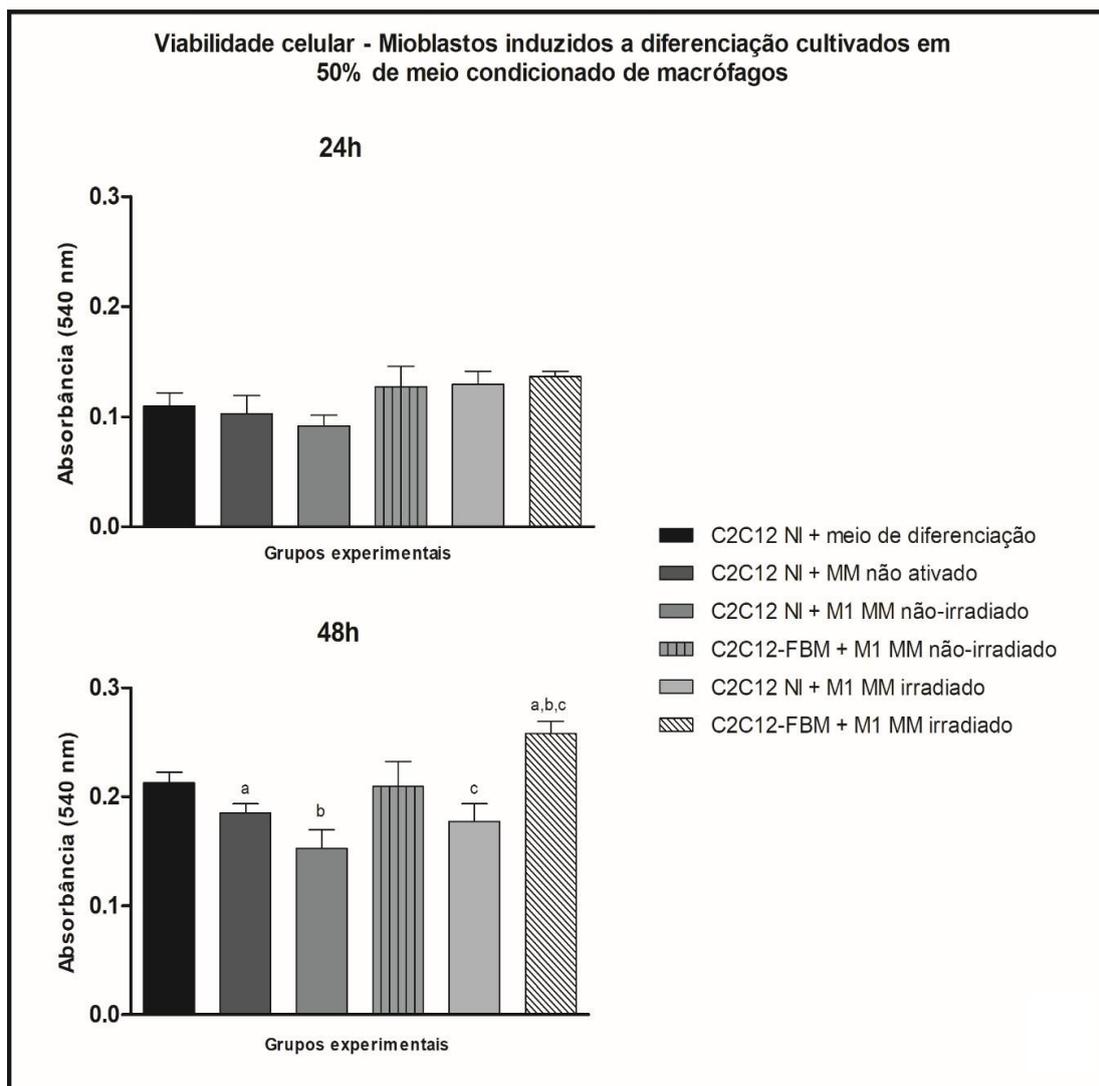


Fig 5. Efeito da FBM sobre a viabilidade de mioblastos C2C12 induzidos a diferenciação cultivados em 50% de meio condicionado de macrófagos ativados para perfil M1 também irradiados. Ensaio MTT de mioblastos C2C12 induzidos a diferenciação em 2% SC por 72h ( $1 \times 10^4$  célula/poço) tratados com FBM (de acordo com grupos experimentais) com adição dos meios condicionados de macrófagos J774 ativados com LPS +IFN- $\gamma$  por 2 horas (M1) e irradiados com laser nos mesmos parâmetros (conforme grupo experimental) - avaliação com 24 e 48h de incubação após irradiações de mioblastos e plaqueamento com devidos meio condicionado. As mesmas letras representam diferença significativa entre grupos. Barras representam médias e desvio padrão. Abreviações: FBM, fotobiomodulação; MM, meio condicionado de macrófagos.

### **5.3. Efeito da FBM sobre a proliferação das células C2C12 cultivadas em meio condicionado por macrófagos perfil M1**

#### **5.3.1 Proliferação de mioblastos indiferenciados**

As células C2C12 indiferenciadas quando cultivadas em 30% de meio condicionado de macrófagos (Figura 6), na avaliação de 24h de incubação, apresentam redução na proliferação celular de todos os grupos experimentais quando comparados ao grupo C2C12 NI que recebeu o meio de proliferação.

Após 48h de incubação o grupo C2C12 NI que foi cultivado em meio de proliferação ainda demonstrou maior proliferação comparado aos demais grupos experimentais ( $p < 0,001$ ). O grupo C2C12-FBM que foi cultivado em M1 MM não-irradiado apresentou maior proliferação celular comparado ao grupo C2C12 NI que recebeu M1 MM não-irradiado ( $p < 0,01$ ). Não houve diferença estatística entre os demais grupos.

Quando os mioblastos C2C12 foram cultivados em 50% de meio condicionado de macrófagos (Figura 7) após 24h de incubação, o grupo C2C12 NI que recebeu meio de proliferação aumento significativo em relação aos grupos C2C12 NI que recebeu M1 MM não-irradiado e o grupo C2C12 NI cultivado em M1 MM irradiado ( $p < 0,05$ ). O grupo C2C12-FBM que foi cultivado em M1 MM não-irradiado apresentou maior proliferação celular em comparação aos grupos C2C12 NI que recebeu M1 MM não-irradiado e o grupo C2C12 NI que recebeu M1 MM irradiado ( $p < 0,05$ ).

Já nas culturas incubadas por 48h o grupo C2C12 NI que recebeu meio de proliferação apresentou maior proliferação que os demais grupos ( $p < 0,001$ ) em exceção ao grupo C2C12-FBM cultivado em M1 MM também irradiado, este que também apresentou maior proliferação celular quando comparado a todos os demais grupos experimentais ( $p < 0,001$ ). Além do mais o grupo C2C12 NI que foi cultivado M1 MM não-irradiado apresentou menor taxa de proliferação quando comparado aos grupos que receberam em alguma das células o tratamento com laser, como em C2C12-FBM que recebeu M1 MM não-irradiado e C2C12 NI que recebeu M1 MM irradiado ( $p < 0,05$ ).

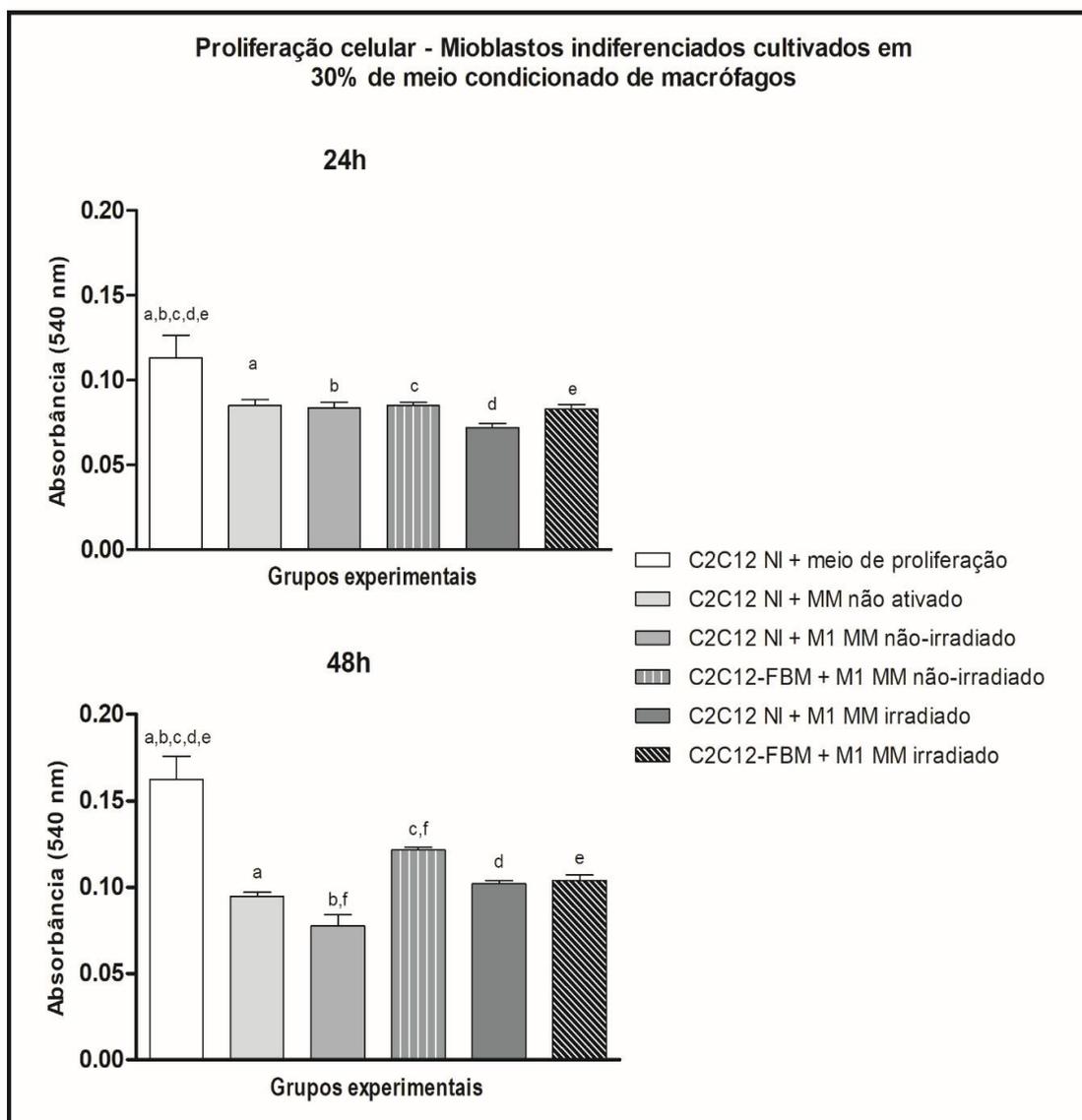


Fig 6. Efeito da FBM sobre a proliferação de mioblastos C2C12 indiferenciados cultivados em 30% de meio condicionado de macrófagos ativados para perfil M1 também irradiados. Ensaio Cristal Violeta de mioblastos C2C12 ( $1 \times 10^4$  célula/poço) tratados com FBM (de acordo com grupos experimentais) com adição dos meios condicionados de macrófagos J774 ativados com LPS +IFN- $\gamma$  por 2 horas (M1) e irradiados com laser nos mesmos parâmetros (conforme grupo experimental) - avaliação com 24 e 48h de incubação após irradiações de mioblastos e plaqueamento com devidos meio condicionado. As mesmas letras representam diferença significante entre grupos. Barras representam médias e desvio padrão. Abreviações: FBM, fotobiomodulação; MM, meio condicionado de macrófagos.

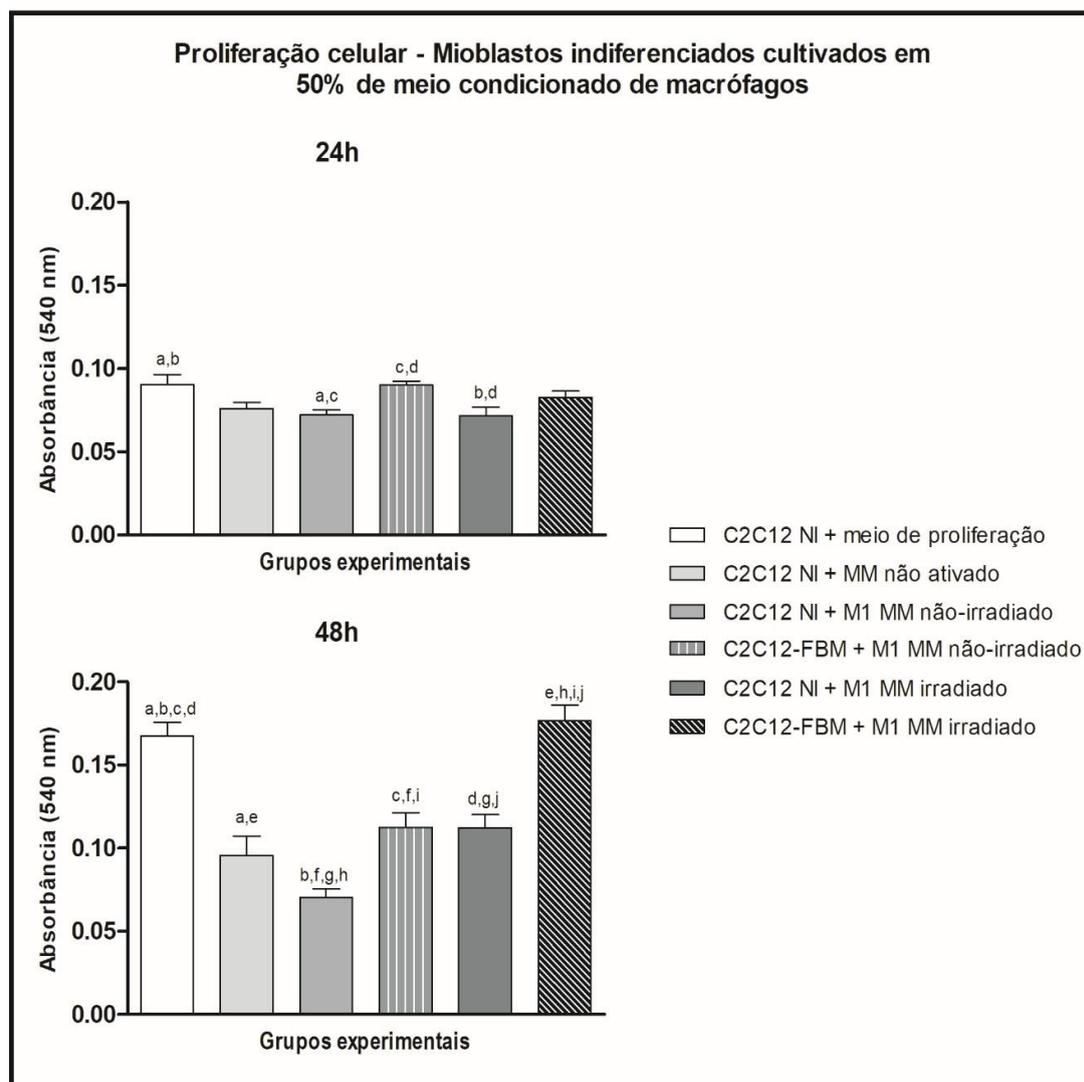


Fig 7. Efeito da FBM sobre a proliferação de mioblastos C2C12 indiferenciados cultivados em 50% de meio condicionado de macrófagos ativados para perfil M1 também irradiados. Ensaio Cristal Violeta de mioblastos C2C12 ( $1 \times 10^4$  célula/poço) tratados com FBM (de acordo com grupos experimentais) com adição dos meios condicionados de macrófagos J774 ativados com LPS +IFN- $\gamma$  por 2 horas (M1) e irradiados com laser nos mesmos parâmetros (conforme grupo experimental) - avaliação com 24 e 48h de incubação após irradiações de mioblastos e plaqueamento com devidos meio condicionado. As mesmas letras representam diferença significativa entre grupos. Barras representam médias e desvio padrão. Abreviações: FBM, fotobiomodulação; MM, meio condicionado de macrófagos.

### 5.3.2 Proliferação de mioblastos após o processo de indução a diferenciação

Os mioblastos previamente induzidos a diferenciação em 2% de SC por 72h que foram cultivados em 30% de meio condicionado de macrófagos (Figura 8), quando avaliados após 24h de incubação, o grupo C2C12 NI cultivada em meio de diferenciação apresentou maior taxa de proliferação quando comparado aos grupos C2C12 NI que recebeu M1 MM não-irradiado ( $p < 0,01$ ) e C2C12 NI que recebeu M1 MM irradiado ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença estatística entre os demais grupos nesse período.

Após 48h de incubação, o grupo C2C12 NI incubado em M1 MM não-irradiado apresentou redução na proliferação celular quando comparado aos demais grupos experimentais. O grupo C2C12-FBM que recebeu M1 MM irradiado demonstrou que quando ambas as células são tratadas apresentam maior proliferação comparada aos grupos C2C12 NI cultivada em MM não ativado e C2C12 NI que recebeu M1 MM não-irradiado ( $p < 0,001$ ) e quando comparado aos grupos em que apenas uma das linhagens foi irradiada como em: C2C12-FBM que recebeu M1 MM não-irradiado ( $p < 0,01$ ) e C2C12 NI cultivado em M1 MM irradiado ( $p < 0,05$ ).

A proliferação celular avaliada em mioblastos induzidos a diferenciação (2% SC – 72h) cultivados em 50% de meio condicionado de macrófagos (Figura 9), não apresentam diferença estatística entre os grupos experimentais quando avaliados após 24h de incubação.

No entanto, após 48h, as células do grupo C2C12 NI cultivadas em meio de diferenciação apresentaram maior taxa de proliferação quando comparadas aos grupos: C2C12 NI cultivada em MM não ativado ( $p < 0,01$ ), C2C12 NI cultivada em M1 MM não-irradiado ( $p < 0,001$ ), C2C12-FBM cultivada em M1 MM não-irradiado ( $p < 0,05$ ) e C2C12 NI cultivada em M1 MM não-irradiada ( $p < 0,01$ ).

Já o grupo C2C12-FBM que recebeu M1 MM também irradiado apresentou maior taxa de proliferação quando comparado ao grupo C2C12 NI cultivada em M1 MM não-irradiado, ou seja, em que nenhuma das células foram irradiadas ( $p < 0,05$ ). Este grupo também não demonstrou diferença estatística quando comparado ao grupo C2C12 NI que recebeu meio de diferenciação.

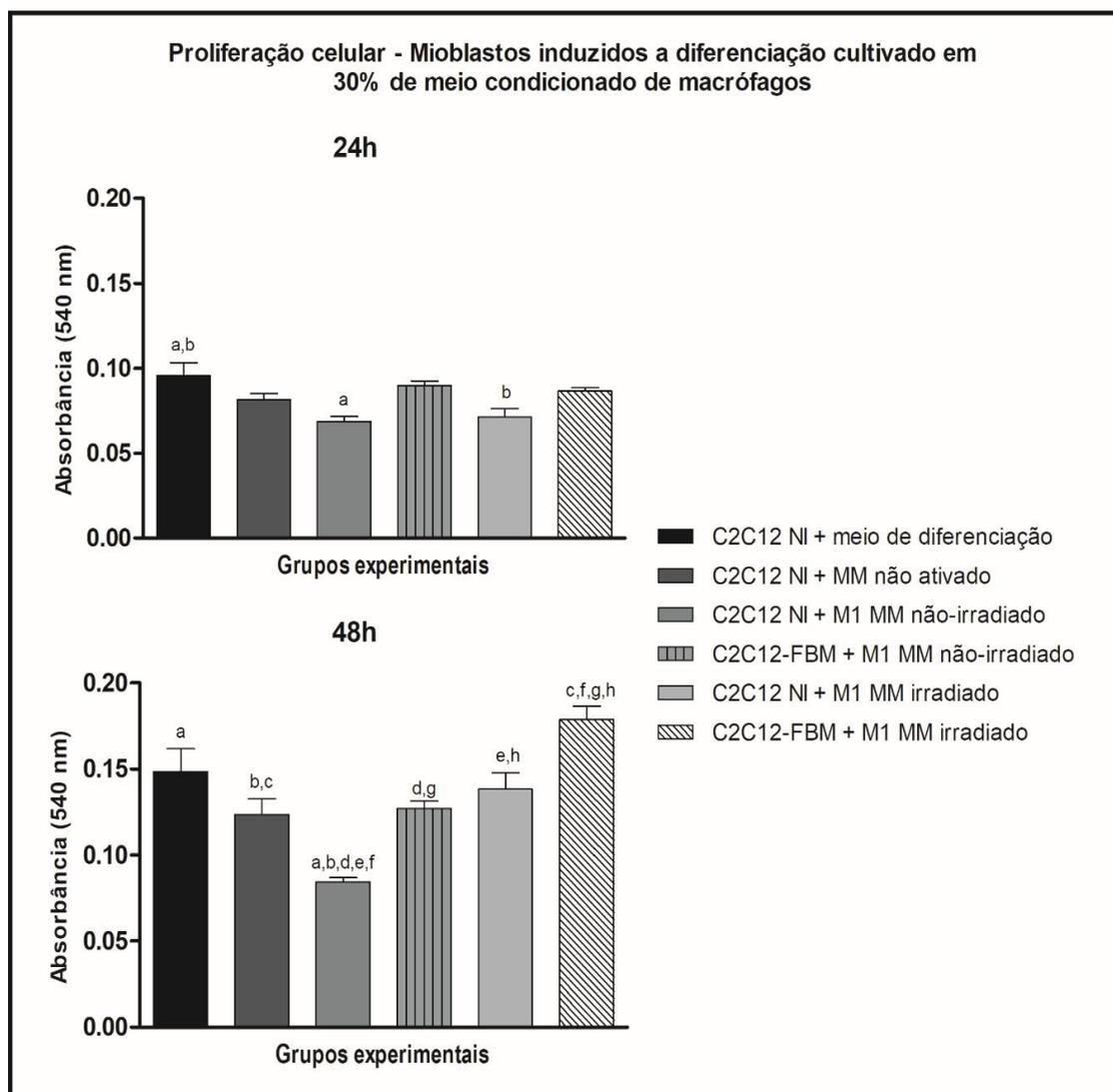


Fig 8. Efeito da FBM sobre a viabilidade de mioblastos C2C12 induzidos a diferenciação cultivados em 30% (A) e 50% (B) de meio condicionado de macrófagos ativados para perfil M1 também irradiados. Ensaio MTT de mioblastos C2C12 induzidos a diferenciação em 2% SC por 72h ( $1 \times 10^4$  célula/poço) tratados com FBM (de acordo com grupos experimentais) com adição dos meios condicionados de macrófagos J774 ativados com LPS +IFN- $\gamma$  por 2 horas (M1) e irradiados com laser nos mesmos parâmetros (conforme grupo experimental) - avaliação com 24 e 48h de incubação após irradiações de mioblastos e plaqueamento com devidos meio condicionado. As mesmas letras representam diferença significativa entre grupos. Barras representam médias e desvio padrão. Abreviações: FBM, fotobiomodulação; MM, meio condicionado de macrófagos.

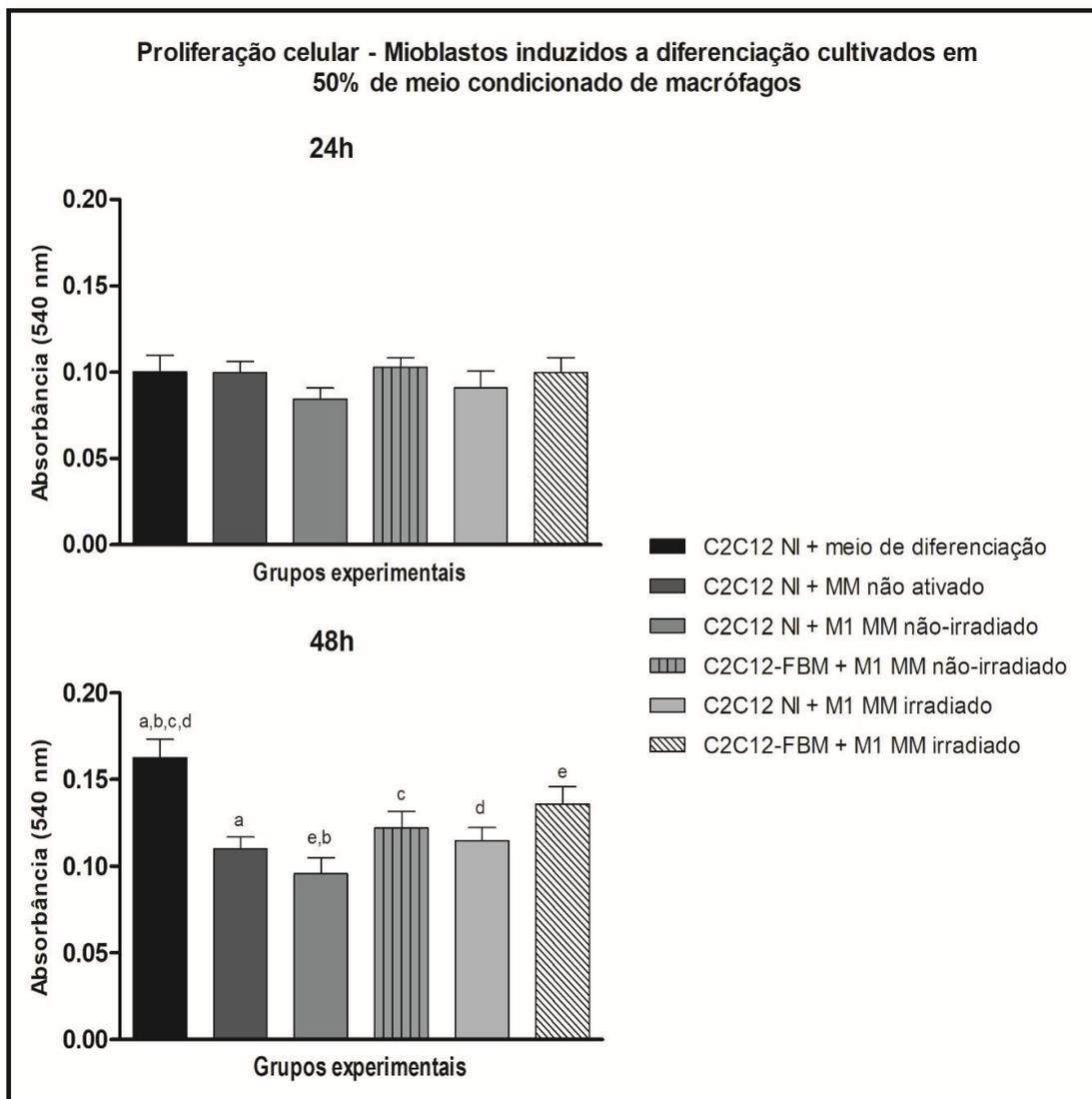


Fig 9. Efeito da FBM sobre a viabilidade de mioblastos C2C12 induzidos a diferenciação cultivados em 30% (A) e 50% (B) de meio condicionado de macrófagos ativados para perfil M1 também irradiados. Ensaio MTT de mioblastos C2C12 induzidos a diferenciação em 2% SC por 72h ( $1 \times 10^4$  célula/poço) tratados com FBM (de acordo com grupos experimentais) com adição dos meios condicionados de macrófagos J774 ativados com LPS +IFN- $\gamma$  por 2 horas (M1) e irradiados com laser nos mesmos parâmetros (conforme grupo experimental) - avaliação com 24 e 48h de incubação após irradiações de mioblastos e plaqueamento com devidos meio condicionado. As mesmas letras representam diferença significativa entre grupos. Barras representam médias e desvio padrão. Abreviações: FBM, fotobiomodulação; MM, meio condicionado de macrófagos.

## 5.4 Efeito da FBM sobre a síntese de óxido nítrico

### 5.4.1 Síntese de NO por mioblastos indiferenciados

Os mioblastos indiferenciados quando cultivados em 30% de meio condicionado de macrófagos (Figura 10), após 24h de incubação o grupo C2C12 NI que recebeu o meio de proliferação demonstrou baixa produção da síntese de NO e redução significativa quando comparado aos demais grupos experimentais. Quando há ativação dos macrófagos para o perfil M1 e nenhum tratamento com FBM, observado no grupo C2C12 NI cultivado em M1 MM não-irradiado, há aumento acentuado da síntese de NO quando comparado a todos os grupos experimentais ( $p < 0,001$ ). Ainda o grupo C2C12-PBM que recebeu M1 MM também irradiado apresentou maior produção de óxido nítrico em comparação ao grupo C2C12 NI cultivado em M1 MM não ativado.

Após 48h de incubação o grupo C2C12 NI que recebeu M1 MM não-irradiado ainda demonstrou maior produção de NO em relação aos demais grupos ( $p < 0,01$ ) em exceção ao grupo C2C12 NI que recebeu M1 MM irradiado. Já o grupo C2C12-FBM que recebeu o M1 MM não-irradiado teve redução na síntese de NO quando comparado ao grupo C2C12 NI cultivado em M1 MM irradiado ( $p < 0,001$ ). Quando uma ou ambas as células foram irradiadas apresentaram valores semelhantes ao grupo C2C12 NI em meio de proliferação, não apresentando diferença estatística entre os grupos.

A síntese de NO dos grupos de mioblastos indiferenciados que foram cultivados em 50% de meio condicionado de macrófagos (Figura 11), após 24h de incubação, o grupo C2C12 NI cultivado em meio de proliferação apresentou menor produção de NO em comparação aos demais grupos experimentais ( $p > 0,001$ ) com exceção quando comparado ao grupo C2C12 NI que recebeu MM não ativado. O grupo C2C12 NI cultivado em M1 MM não-irradiado apresentou produção aumentada de NO em comparação a todos os grupos experimentais ( $p < 0,001$ ). Já o grupo C2C12-FBM que recebeu M1 MM não-irradiado apresentou maior produção de NO quando comparado ao grupo C2C12 NI cultivado em MM não ativado ( $p < 0,01$ ) e ao grupo C2C12-FBM cultivado em M1 MM também irradiado ( $p < 0,05$ ).

Após 48h de incubação, o grupo C2C12 NI cultivado e meio de proliferação apresentou menor produção de NO quando comparado aos grupos: C2C12 NI que recebeu MM não ativado ( $p < 0,01$ ), C2C12 NI que recebeu M1 MM não-irradiado ( $p < 0,001$ ) e C2C12 NI que recebeu M1 MM não-irradiado ( $p < 0,01$ ). O grupo C2C12 NI cultivado em M1 MM não-irradiado ainda apresentou maior produção de NO quando comparado aos demais grupos experimentais. Houve redução na síntese de NO quando ambas as células são tratadas com o laser, como o grupo C2C12-FBM cultivado em M1 MM também irradiado em comparação ao grupo C2C12-FBM que recebeu em M1 MM não-irradiado

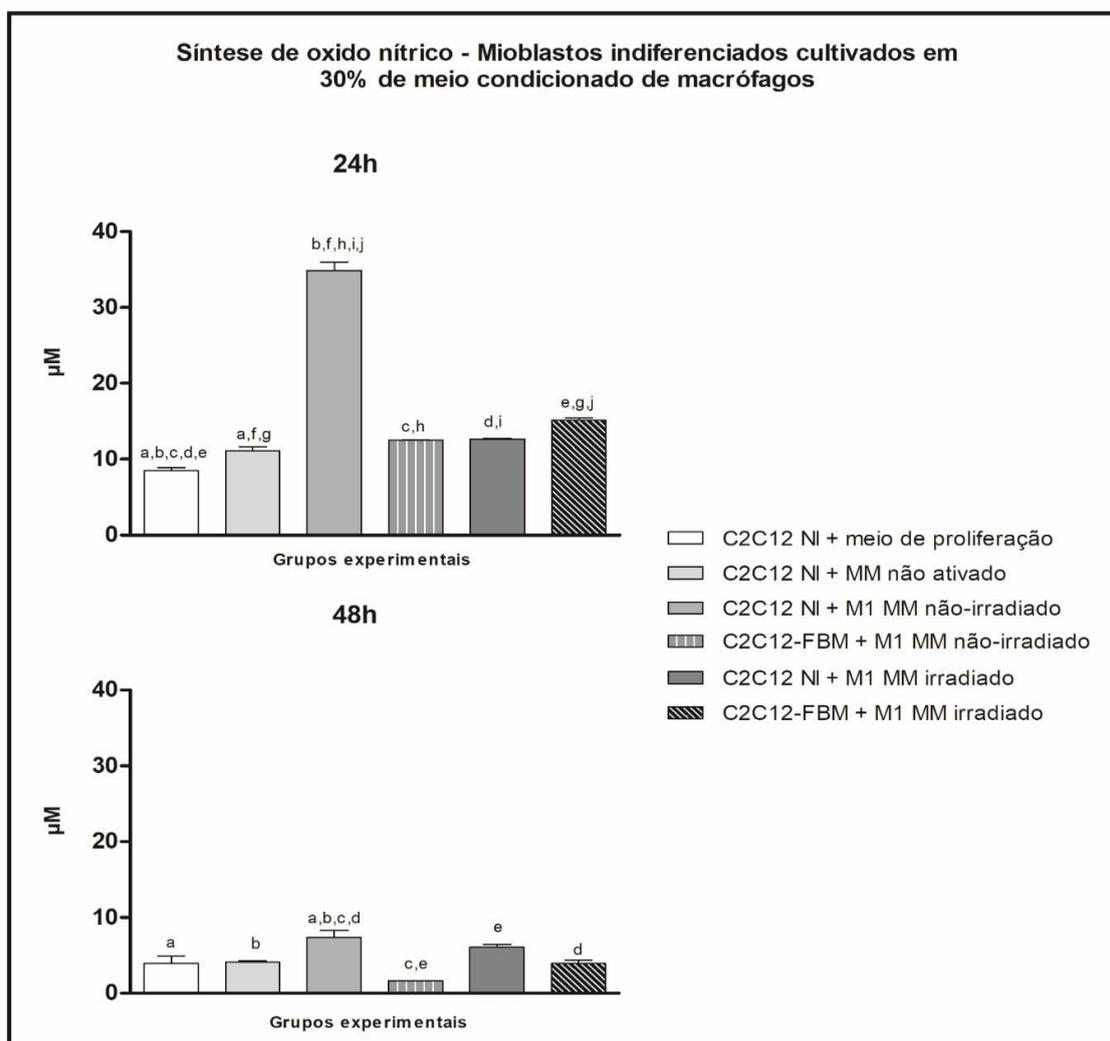


Fig 10. Efeito da FBM sobre a síntese de óxido nítrico de mioblastos C2C12 indiferenciados cultivados em 30% de meio condicionado de macrófagos ativados para perfil M1 também irradiados. Ensaio pelo método de Griess através do sobrenadante de mioblastos C2C12 ( $1 \times 10^4$  célula/poço) tratados com FBM (de acordo com grupos experimentais) com adição dos meios condicionados de macrófagos J774 ativados com LPS +IFN- $\gamma$  por 2 horas (M1) e irradiados com laser nos mesmos parâmetros (conforme grupo experimental) - avaliação com 24 e 48h de incubação após irradiações de mioblastos e plaqueamento com devidos meio condicionado. As mesmas letras representam diferença significativa entre grupos. Barras representam médias e desvio padrão. Abreviações: FBM, fotobiomodulação; MM, meio condicionado de macrófagos.

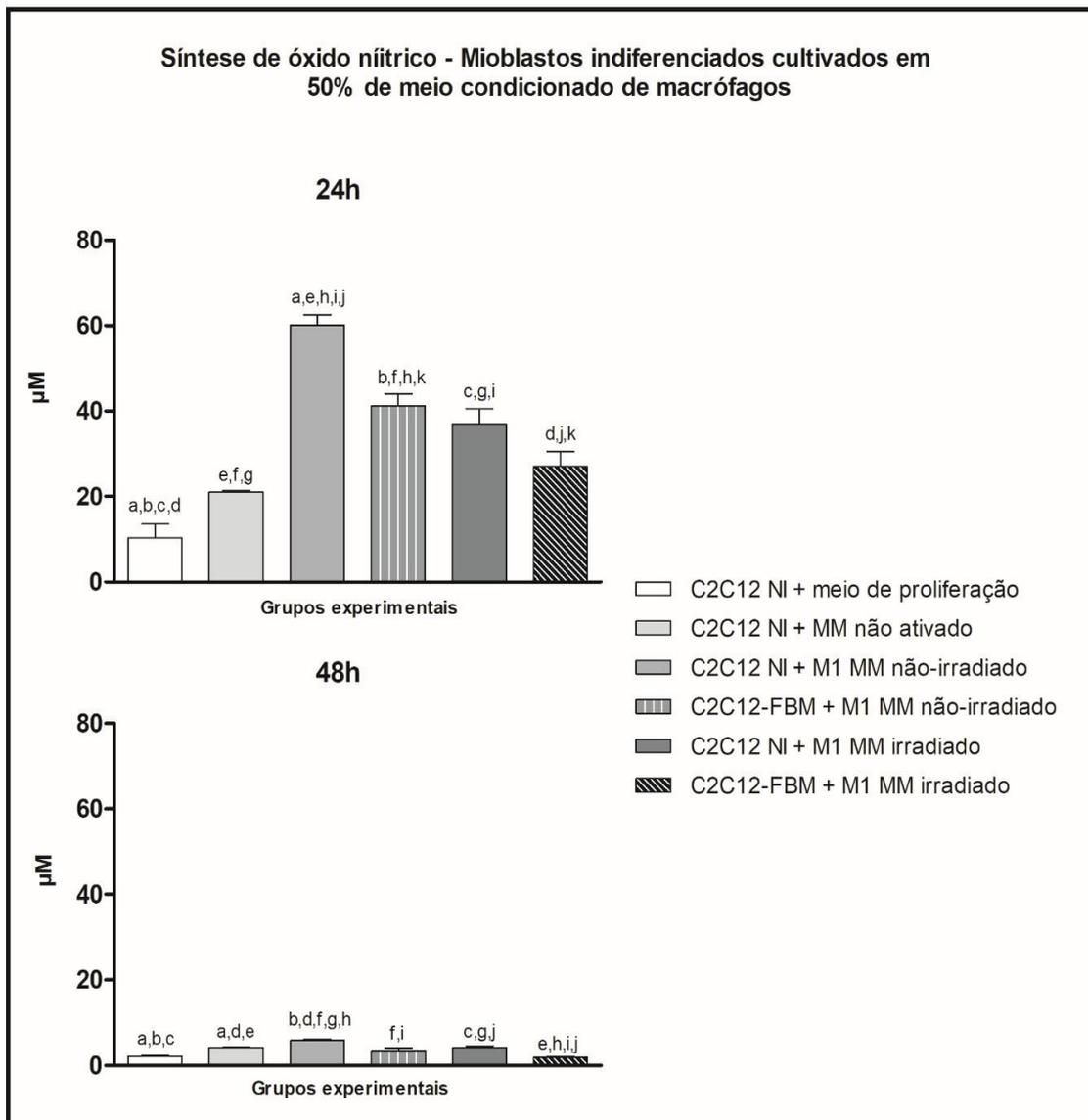


Fig 11. Efeito da FBM sobre a síntese de óxido nítrico de mioblastos C2C12 indiferenciados cultivados em 50% de meio condicionado de macrófagos ativados para perfil M1 também irradiados. Ensaio pelo método de Griess através do sobrenadante de mioblastos C2C12 ( $1 \times 10^4$  célula/poço) tratados com FBM (de acordo com grupos experimentais) com adição dos meios condicionados de macrófagos J774 ativados com LPS +IFN- $\gamma$  por 2 horas (M1) e irradiados com laser nos mesmos parâmetros (conforme grupo experimental) - avaliação com 24 e 48h de incubação após irradiações de mioblastos e plaqueamento com devidos meio condicionado. As mesmas letras representam diferença significativa entre grupos. Barras representam médias e desvio padrão. Abreviações: FBM, fotobiomodulação; MM, meio condicionado de macrófagos.

#### 5.4.2 Síntese de NO por mioblastos induzidos a diferenciação

Os mioblastos previamente induzidos a diferenciação em 2% de SC por 72h que foram cultivados em 30% de meio condicionado de macrófagos (Figura 12), quando avaliados após o período de 24h de incubação, o grupo C2C12 NI cultivado em M1 MM não-irradiado apresentou maior síntese de NO quando comparado aos grupos: C2C12 NI em meio de diferenciação ( $p < 0,001$ ), C2C12 NI em MM não ativado ( $p < 0,05$ ), C2C12-FBM em M1 MM não-irradiado ( $p < 0,001$ ) e menor produção comparado a C2C12 NI em M1 MM irradiado ( $p < 0,001$ ). Já o grupo C2C12 NI cultivado em M1 MM irradiado apresentou maior síntese de NO em comparação a todos os grupos experimentais ( $p < 0,001$ ).

Após 48h de incubação os grupos C2C12 NI em meio de diferenciação e C2C12-FBM em M1 MM também irradiado não apresentaram diferença estatística entre eles, porém demonstraram menor síntese de NO quando comparado a todos os outros grupos experimentais. Não houve diferença estatística entre os demais grupos.

Quando as células C2C12 induzidas a diferenciação foram cultivadas em 50% de meio condicionado de macrófagos (Figura 13), na avaliação após 24h de incubação, o grupo C2C12 NI cultivado em M1 MM não-irradiado apresentou maior produção de NO comparado aos grupos: C2C12 NI em meio de diferenciação ( $p < 0,001$ ), C2C12 NI em MM não ativado ( $p < 0,001$ ) e as células que foram tratadas nos grupos C2C12-FBM em M1 MM não-irradiado ( $p < 0,001$ ) e C2C12-FBM cultivado em M1 MM também irradiado ( $p < 0,001$ ). O grupo C2C12 NI cultivado em M1 MM não-irradiado apresentou maior síntese de NO comparado a todos os grupos experimentais ( $p < 0,001$ ). Quando ambas as células foram irradiadas, como o grupo C2C12-FBM cultivado em M1 MM irradiado apresentou maior produção de NO quando comparado ao grupo C2C12 NI cultivado em M1 MM irradiado ( $p < 0,001$ ).

Na avaliação de 48h após a incubação o grupo C2C12 NI que recebeu MM não ativado apresentou diferença estatística com os demais grupos experimentais, exceto o grupo C2C12-FBM incubado em M1 MM não-irradiado. Já o grupo C2C12 NI cultivado em M1 MM não-irradiado apresentou aumento na síntese de NO em comparação aos grupos C2C12-FBM em M1 MM não-irradiado ( $p < 0,001$ ) e ao grupo C2C12-FBM cultivado em M1 MM também

irradiado ( $p < 0,05$ ). Também o grupo C2C12-FBM cultivado em M1 MM irradiado teve redução na produção de NO comparado ao grupo C2C12 NI em M1 MM irradiado ( $p < 0,01$ ). Não houve diferença estatística entre os demais grupos.

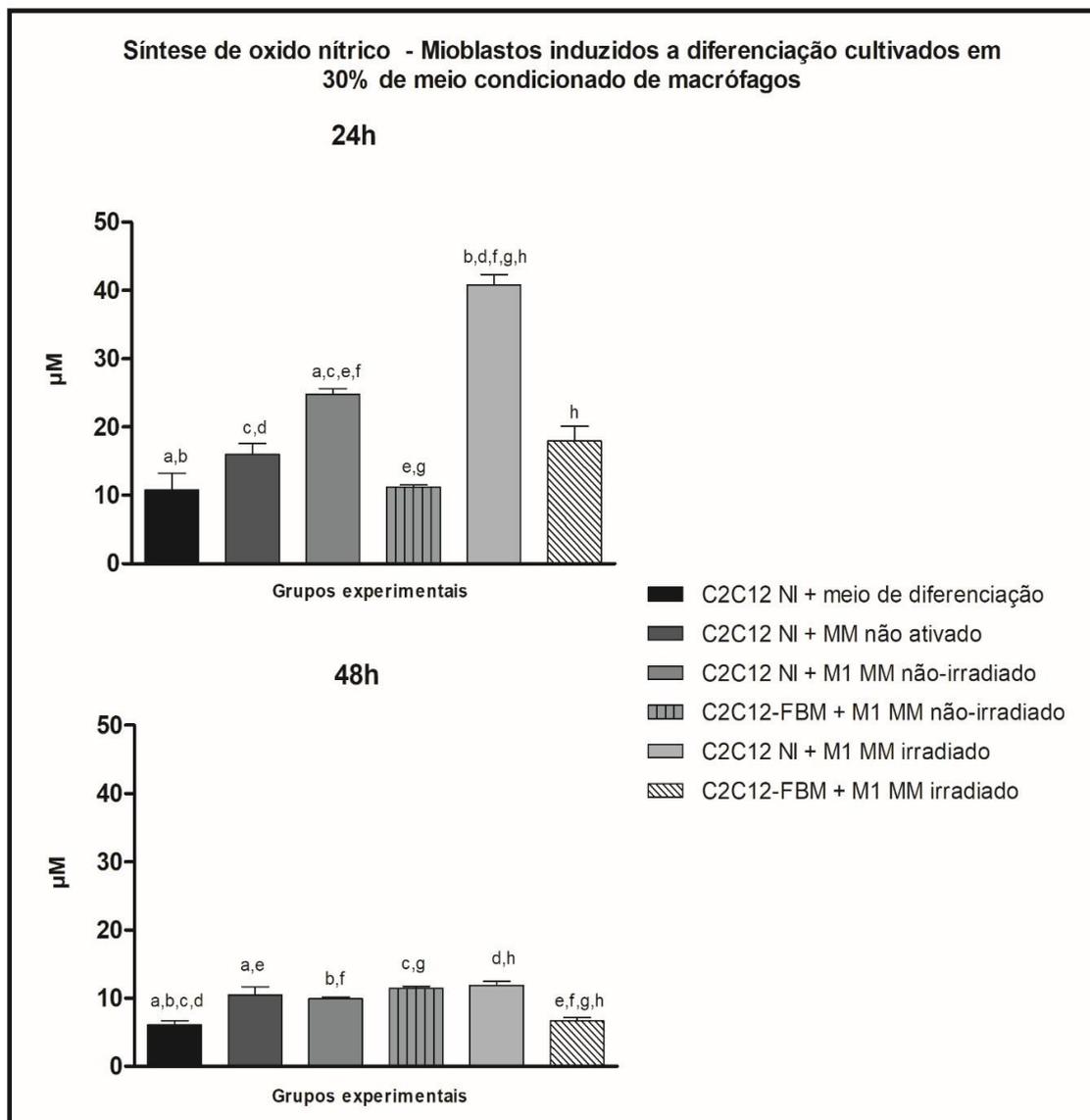


Fig 12. Efeito da FBM sobre a síntese de óxido nítrico de mioblastos C2C12 induzidos a diferenciação cultivados em 30% de meio condicionado de macrófagos ativado para perfil M1 também irradiados. Ensaio pelo método de Griess através do sobrenadante de mioblastos C2C12 induzidos a diferenciação em 2% SC por 72h ( $1 \times 10^4$  célula/poço) tratados com FBM (de acordo com grupos experimentais) com adição dos meios condicionados de macrófagos J774 ativados com LPS +IFN- $\gamma$  por 2 horas (M1) e irradiados com laser nos mesmos parâmetros (conforme grupo experimental) - avaliação com 24 e 48h de incubação após irradiações de mioblastos e plaqueamento com devidos meio condicionado. As mesmas letras representam diferença significativa entre grupos. Barras representam médias e desvio padrão. Abreviações: FBM, fotobiomodulação; MM, meio condicionado de macrófagos.

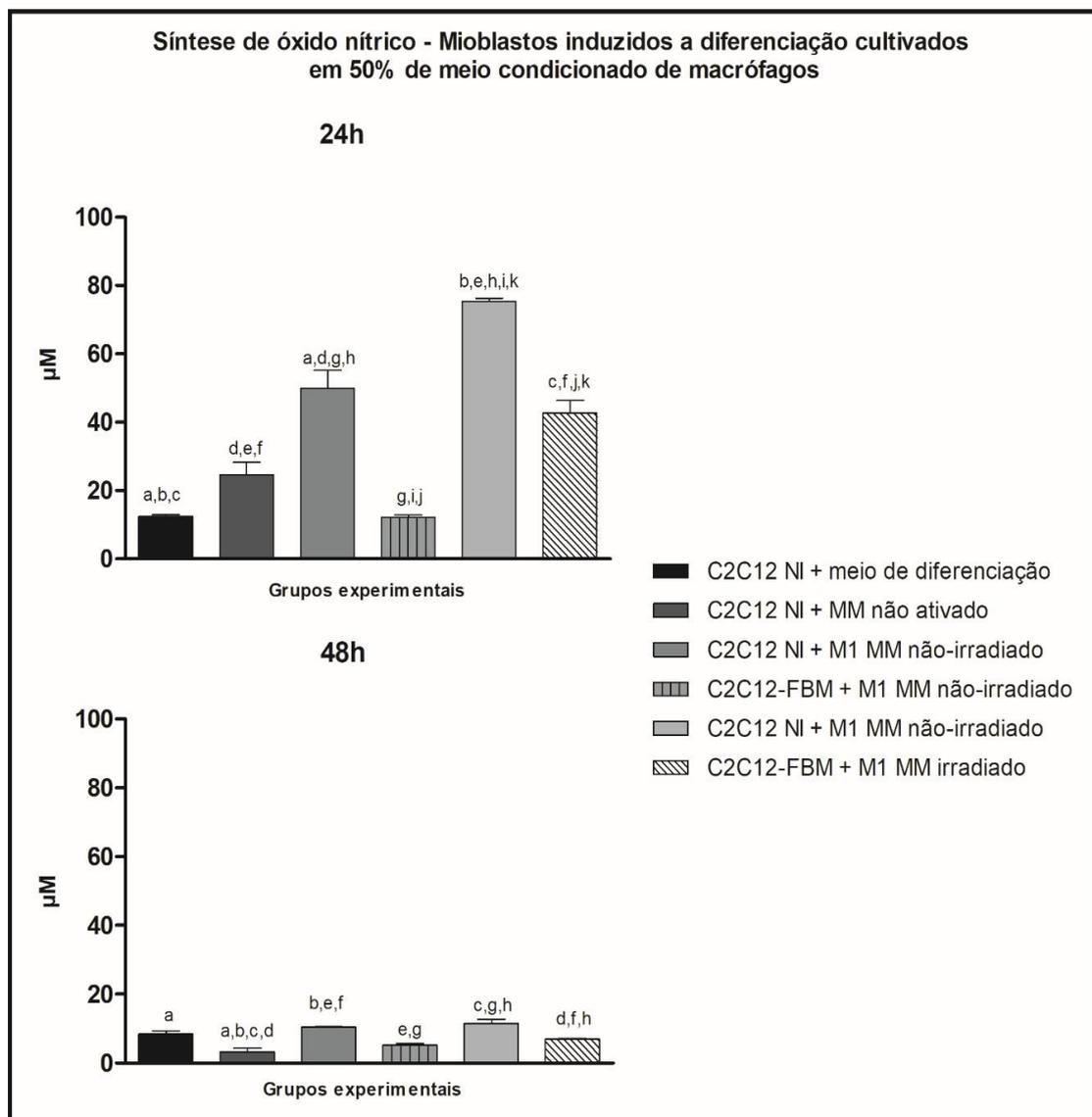


Fig 13. Efeito da FBM sobre a síntese de óxido nítrico de mioblastos C2C12 induzidos a diferenciação cultivados em 50% de meio condicionado de macrófagos ativados para perfil M1 também irradiados. Ensaio pelo método de Griess através do sobrenadante de mioblastos C2C12 induzidos a diferenciação em 2% SC por 72h ( $1 \times 10^4$  célula/poço) tratados com FBM (de acordo com grupos experimentais) com adição dos meios condicionados de macrófagos J774 ativados com LPS +IFN- $\gamma$  por 2 horas (M1) e irradiados com laser nos mesmos parâmetros (conforme grupo experimental) - avaliação com 24 e 48h de incubação após irradiações de mioblastos e plaqueamento com devidos meio condicionado. As mesmas letras representam diferença significativa entre grupos. Barras representam médias e desvio padrão. Abreviações: FBM, fotobiomodulação; MM, meio condicionado de macrófagos.

## 5.5 Efeito da FBM sobre a produção de citocinas

### 5.5.1 Produção de IL-6

#### 5.5.1.1 Produção de IL-6 por mioblastos indiferenciados

Na avaliação dos mioblastos indiferenciados que foram cultivados em 30% de meio condicionado de macrófagos (Figura 14), após 24h de incubação, as células do grupo C2C12 NI em MM não ativado produziu menos IL-6 em relação ao grupo C2C12 NI em M1 MM não-irradiado ( $p<0,01$ ) e maior produção comparado as células C2C12 NI em meio de proliferação ( $p<0,01$ ), C2C12 NI em M1 MM irradiado ( $p<0,01$ ) e C2C12-FBM em M1 MM irradiado ( $p<0,05$ ). Já o grupo C2C12 NI cultivado em M1 MM não-irradiado produziu mais IL-6 comparado aos demais grupos experimentais. Os grupos C2C12 NI em M1 MM irradiado e C2C12-FBM cultivado em M1 MM também irradiado apresentaram menor produção de IL-6 em relação ao grupo C2C12-FBM em M1 MM não-irradiado ( $p<0,01$ ).

Já nas culturas incubadas por 48h, todos os grupos demonstraram diferenças estatísticas entre eles. O grupo C2C12 NI em M1 MM não-irradiado ainda produziu mais IL-6 quando comparado aos demais grupos experimentais. Os grupos em que uma ou ambas as culturas celulares foram tratadas com FBM apresentaram decrescente produção de IL-6, assim o grupo C2C12-FBM cultivado em M1 MM também irradiado produziu menos que C2C12-FBM em M1 MM não-irradiado ( $p<0,001$ ) e C2C12 NI em M1 MM irradiado ( $p<0,05$ ).

Os mioblastos indiferenciados que foram cultivados em 50% de meio condicionado de macrófagos e avaliados após 24h de incubação (Figura 15), as células do grupo C2C12 NI em meio de proliferação produziram menos IL-6 quando comparado aos demais grupos experimentais exceto o grupo C2C12 NI em M1 MM irradiado. Já o grupo C2C12-FBM em M1 MM não-irradiado apresentou maior produção que todos os grupos experimentais, exceto C2C12 NI em M1 MM não-irradiado. Já quando ambas as células foram tratadas do grupo C2C12-FBM em M1 MM irradiada produziram mais IL-6 que as células do grupo C1C12 NI em M1 MM irradiado ( $p<0,05$ ).

Após 48h de incubação, as células do grupo C2C12 NI em MM não ativado geraram mais produção de IL-6 quando comparado a todos os grupos

experimentais ( $p < 0,001$ ). Já as células do grupo C2C12 NI em M1 MM não-irradiado produziram mais IL-6 comparado aos grupos que foram tratadas ( $p < 0,001$ ). As células do grupo C2C12-FBM cultivada em M1 MM irradiado produziram menos IL-6 em relação aos grupos C2C12-FBM em M1 MM não-irradiado e C2C12 NI em M1 MM irradiado, mas esta redução não foi estatisticamente significativa.

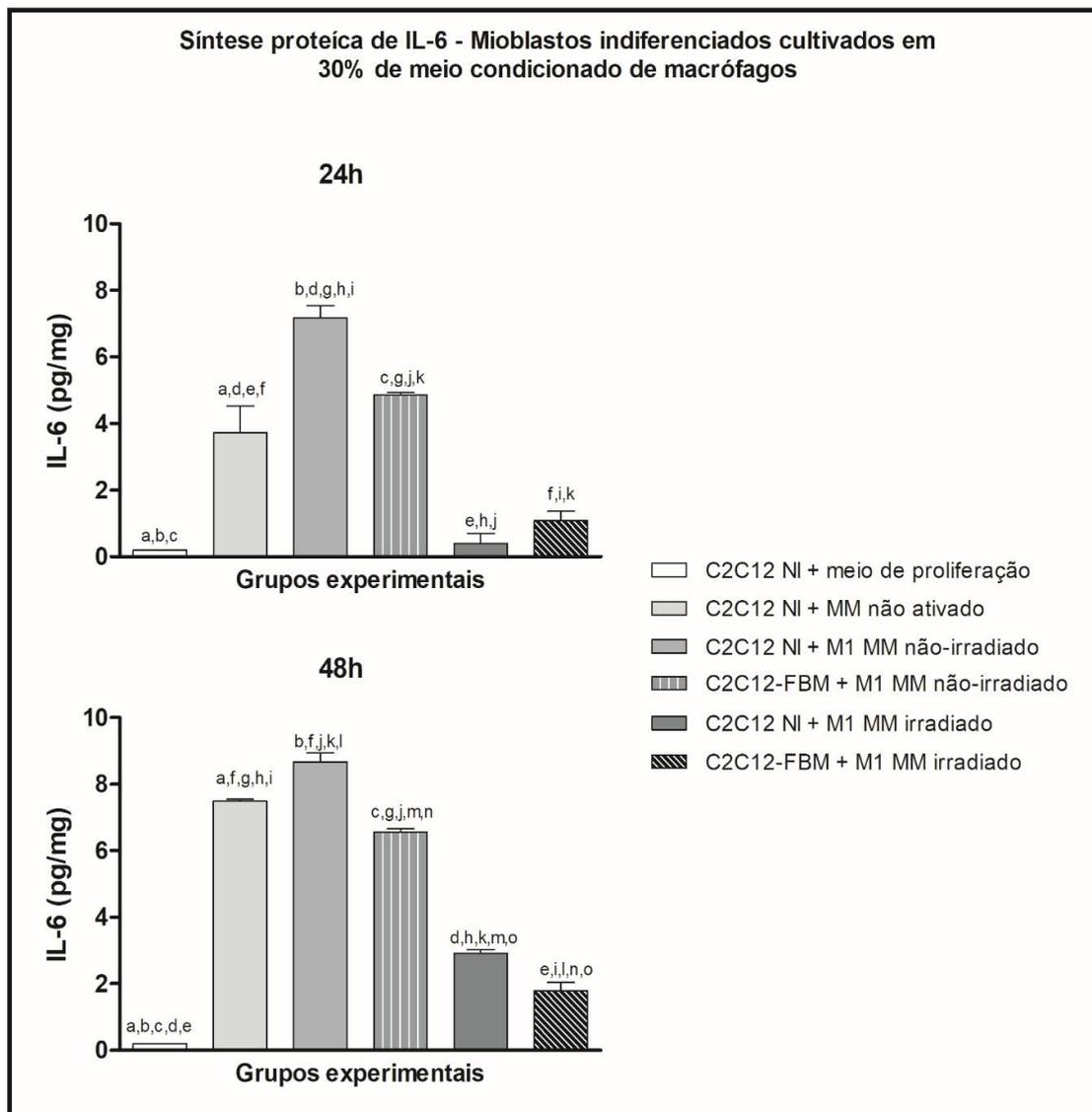


Fig 14. Efeito da FBM sobre a produção de IL-6 de mioblastos C2C12 indiferenciados cultivados em 30% de meio condicionado de macrófagos ativado para perfil M1 também irradiados. Síntese proteica de IL-6 pelo método ELISA no sobrenadante das culturas de células C2C12 ( $1 \times 10^4$  célula/poço) tratadas com FBM (de acordo com grupos experimentais) com adição dos meios condicionados de macrófagos J774 ativados com LPS +IFN- $\gamma$  por 2 horas (M1) e irradiados com laser nos mesmos parâmetros (conforme grupo experimental) - avaliação com 24 e 48h de incubação após irradiações de mioblastos e plaqueamento com devidos meio condicionado. As mesmas letras representam diferença significativa entre grupos. Barras representam médias e desvio padrão. Abreviações: FBM, fotobiomodulação; MM, meio condicionado de macrófagos.

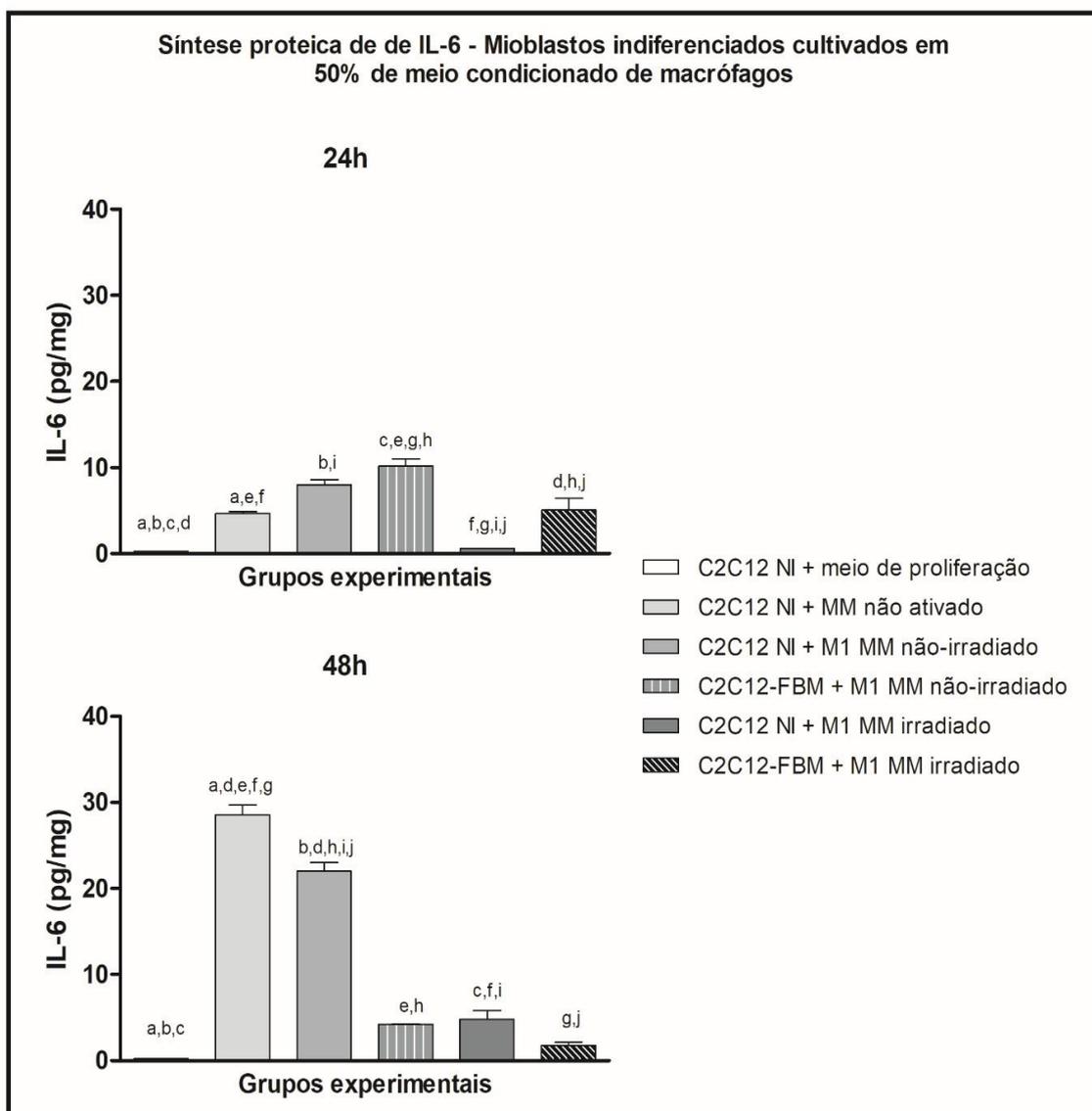


Fig 15. Efeito da FBM sobre a produção de IL-6 de mioblastos C2C12 indiferenciados cultivados em 50% de meio condicionado de macrófagos ativados para perfil M1 também irradiados. Síntese proteica de IL-6 pelo método ELISA no sobrenadante das culturas de células C2C12 ( $1 \times 10^4$  célula/poço) tratadas com FBM (de acordo com grupos experimentais) com adição dos meios condicionados de macrófagos J774 ativados com LPS +IFN- $\gamma$  por 2 horas (M1) e irradiados com laser nos mesmos parâmetros (conforme grupo experimental) - avaliação com 24 e 48h de incubação após irradiações de mioblastos e plaqueamento com devidos meio condicionado. As mesmas letras representam diferença significativa entre grupos. Barras representam médias e desvio padrão. Abreviações: FBM, fotobiomodulação; MM, meio condicionado de macrófagos.

### 5.5.1.2 Produção de IL-6 por mioblastos induzidos a diferenciação

Os mioblastos previamente induzidos a diferenciação em 2% de SC por 72h que foram cultivados em 30% de meio condicionado de macrófagos (Figura 16) do grupo C2C12 NI em M1 MM não-irradiado produziram menos IL-6 em relação aos demais grupos experimentais ( $p < 0,001$ ). Já o grupo C2C12-FBM em M1 MM não-irradiado apresentou também diferença estatística apresentando maior produção de IL-6 em comparação com os demais grupos experimentais e as células do grupo C2C12 NI em M1 MM não-irradiado também produziram menos ( $p < 0,001$ ). O grupo C2C12-FBM cultivado em M1 MM também irradiado apresentou maior síntese de IL-6 comparado as células do grupo C2C12 NI em M1 MM irradiado ( $p < 0,05$ ).

Após 48h de incubação todos os grupos experimentais apresentaram diferença estatística entre si. Os grupos que foram tratados produziram menos IL-6 quando comparados as células do grupo C2C12 NI em MM não ativado ( $p < 0,001$ ) e mais IL-6 quando comparados ao grupo C2C12 NI em M1 MM não-irradiado ( $p < 0,001$ ).

Quando as células C2C12 induzidas a diferenciação foram cultivadas em 50% de meio condicionado de macrófagos (Figura 17), na avaliação após 24h de incubação, os grupos C2C12 em meio de diferenciação e C2C12 em MM não ativado apresentaram diferença estatística com os demais grupos experimentais.

Já as células do grupo C2C12-FBM em M1 MM não-irradiado produziram mais IL-6 quando comparado ao grupo C2C12 NI em M1 MM não-irradiado ( $p < 0,05$ ). Não houve diferenças estatísticas na síntese de IL-6 entre os grupos irradiados.

Após 48h de incubação, as células do grupo C2C12 NI em meio de diferenciação produziram menos IL-6 quando comparadas as células dos demais grupo experimentais ( $p < 0,001$ ). Já o grupo C2C12 em MM nãoativado produziu mais IL-6 em comparação a todos os grupos, exceto comparado ao grupo C2C12-FBM em M1 MM não-irradiado ( $p < 0,001$ ). As células do grupo C2C12-FBM em M1 MM não-irradiado sintetizaram mais IL-6 que os grupos: C2C12 NI em M1 MM não-irradiado, C2C12 NI em M1 MM irradiado e C2C12-FBM em M1 MM também irradiado ( $p < 0,001$ ). Não houve diferença estatística entre os demais grupos.

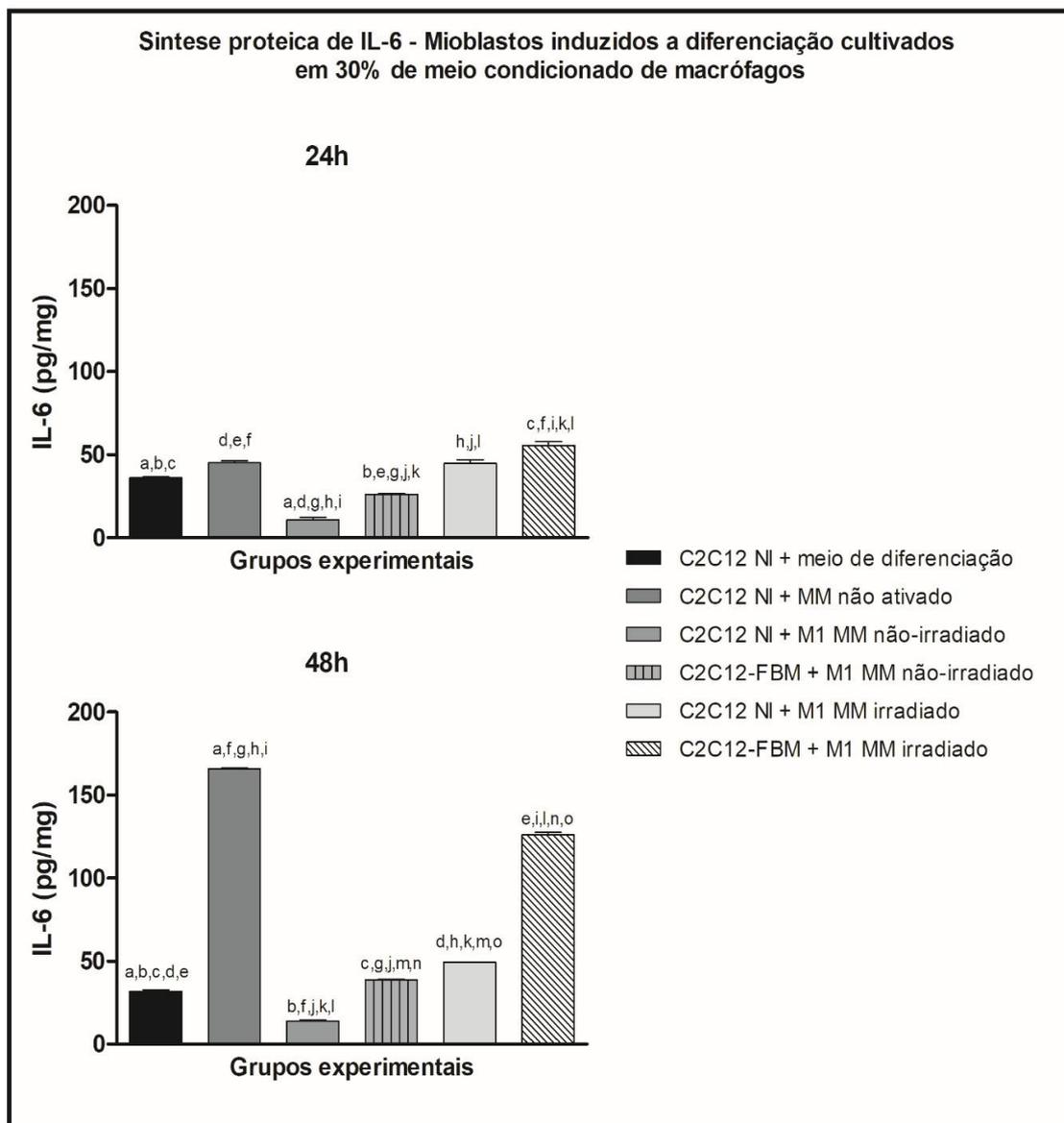


Fig 16. Efeito da FBM sobre a síntese de IL-6 de mioblastos C2C12 induzidos a diferenciação cultivados em 30% de meio condicionado de macrófagos ativados para perfil M1 também irradiados. Síntese proteica de IL-6 pelo método ELISA no sobrenadante das culturas de células C2C12 induzidos a diferenciação em 2% SC por 72h ( $1 \times 10^4$  célula/poço) tratados com FBM (de acordo com grupos experimentais) com adição dos meios condicionados de macrófagos J774 ativados com LPS +IFN- $\gamma$  por 2 horas (M1) e irradiados com laser nos mesmos parâmetros (conforme grupo experimental) - avaliação com 24 e 48h de incubação após irradiações de mioblastos e plaqueamento com devidos meio condicionado. As mesmas letras representam diferença significativa entre grupos. Barras representam médias e desvio padrão. Abreviações: FBM, fotobiomodulação; MM, meio condicionado de macrófagos.



## 5.5.2 Produção de TNF- $\alpha$

### 5.5.2.1 Produção de TNF- $\alpha$ por mioblastos indiferenciados

Na avaliação da síntese proteica de TNF- $\alpha$  por mioblastos indiferenciados que foram cultivados em 30% de meio condicionado de macrófagos (Figura 18), após 24h de incubação, as células dos grupos C2C12 NI em meio de proliferação e C2C12 NI em MM não-ativado produziram menos em relação aos demais grupos cultivados em meio condicionado ativado ( $p < 0,001$ ). As células do grupo C2C12 NI em M1 MM não-irradiado apresentaram maior síntese de TNF- $\alpha$  em relação a todos grupos experimentais, porém essa diferença não foi estaticamente significativa. Não houve diferença estatística entre os grupos que foram irradiados.

Após 48h de incubação, as células do grupo C2C12 NI em meio de proliferação ainda produziram menos TNF- $\alpha$  comparado aos demais grupos experimentais ( $p < 0,001$ ). Já o grupo C2C12 NI em MM não ativado apenas não demonstrou diferença estatística quando comparado ao grupo C2C12-FBM em M1 MM irradiado, onde as células desses grupos apresentaram semelhante produção de TNF- $\alpha$ . As células do grupo C2C12 NI em M1 MM não-irradiado produziram mais TNF- $\alpha$  em relação aos grupos C2C12 NI em M1 MM irradiado ( $p < 0,01$ ) e C2C12-FBM em M1 MM irradiado ( $p < 0,001$ ). Já quando ambas as células foram tratadas, no grupo C2C12-FBM em M1 MM irradiado, produziram menos TNF- $\alpha$  em relação aos grupos em que apenas uma das linhagens foram irradiadas, como em C2C12-FBM cultivado em M1 MM não-irradiado ( $p < 0,01$ ) e C2C12 NI em M1 MM irradiado ( $p < 0,05$ ).

Quando os mioblastos C2C12 indiferenciados foram cultivados em 50% de meio condicionado de macrófagos e a síntese de TNF- $\alpha$  avaliada após 24h de incubação (Figura 19) os grupos C2C12 NI em meio de proliferação e C2C12 NI em MM não ativado produziram menos que os demais grupos experimentais ( $p < 0,001$ ). Já as células do grupo C2C12 NI em M1 MM não-irradiado produziram menos TNF- $\alpha$  em relação ao grupo C2C12-FBM em M1 MM também irradiado ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença estatística entre os grupos que foram irradiados.

Na avaliação após 48h de incubação, as células do grupo C2C12 em meio de proliferação produziram menos TNF- $\alpha$  quando comparado a todos os grupos

experimentais ( $p < 0,001$ ). As células do grupo C2C12 NI em MM M1 não-irradiado produziram mais TNF- $\alpha$  comparado aos grupos C2C12 NI em MM não ativado ( $p < 0,001$ ) e C2C12 NI em M1 MM irradiado ( $p < 0,05$ ). Quando as células foram irradiadas nos grupos C2C12-FBM em M1 MM não-irradiado e C2C12-FBM em M1 MM irradiado produziram mais TNF- $\alpha$  comparado ao grupo C2C12 NI em MM não ativado ( $p < 0,01$ ). Já quando ambas as linhagens foram tratadas no grupo C2C12-FBM cultivadas em M1 MM irradiado produziram mais TNF- $\alpha$  comparado ao grupo C2C12 NI em M1 MM irradiado ( $p < 0,05$ ).

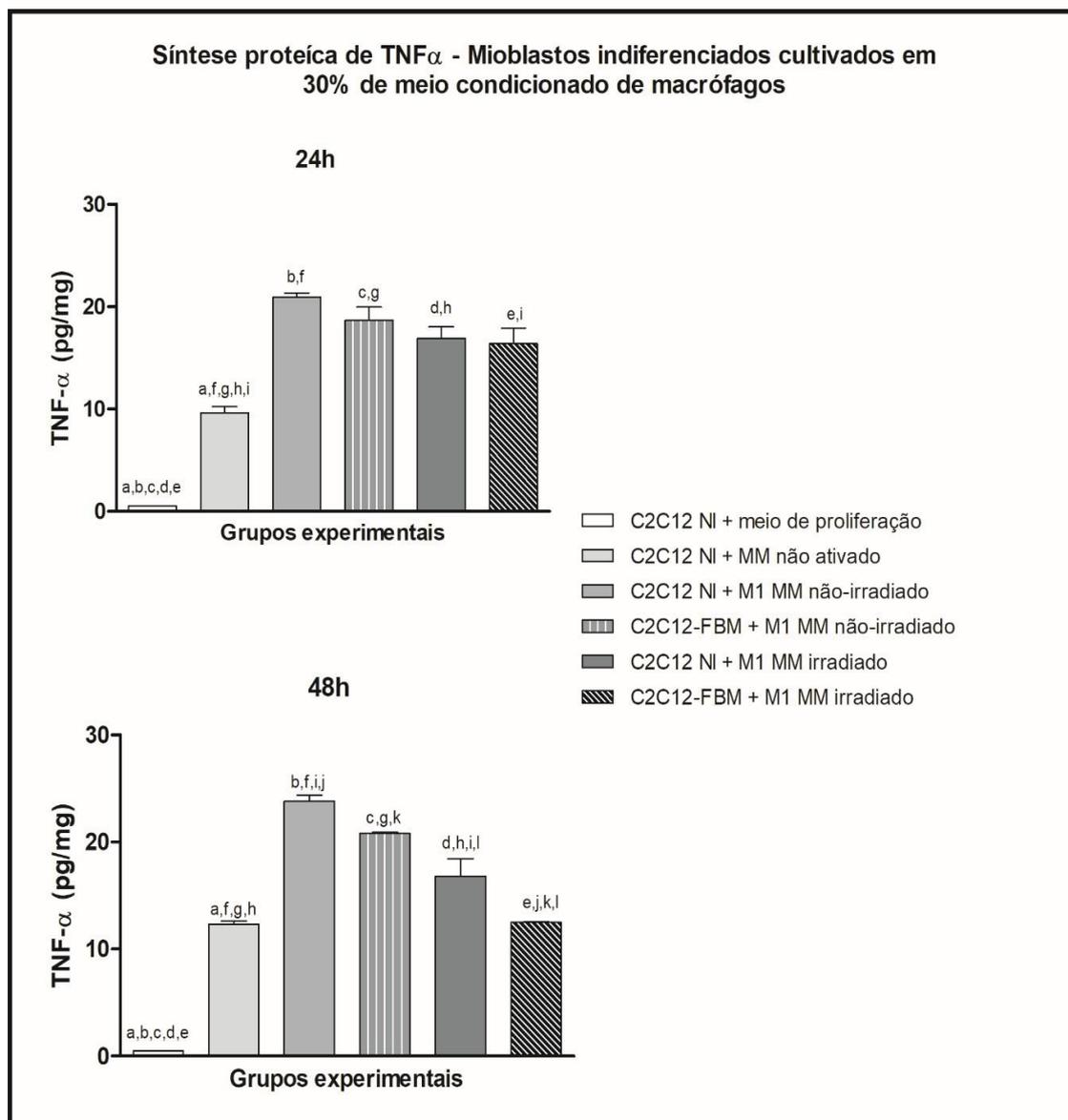


Fig 18. Efeito da FBM sobre a produção de TNF- $\alpha$  de mioblastos C2C12 indiferenciados cultivados em 30% de meio condicionado de macrófagos ativados para perfil M1 também irradiados. Síntese proteica de TNF- $\alpha$  pelo método ELISA no sobrenadante das culturas de células C2C12 ( $1 \times 10^4$  célula/poço) tratadas com FBM (de acordo com grupos experimentais) com adição dos meios condicionados de macrófagos J774 ativados com LPS +IFN- $\gamma$  por 2 horas (M1) e irradiados com laser nos mesmos parâmetros (conforme grupo experimental) - avaliação com 24 e 48h de incubação após irradiações de mioblastos e plaqueamento com devidos meio condicionado. As mesmas letras representam diferença significativa entre grupos. Barras representam médias e desvio padrão. Abreviações: FBM, fotobiomodulação; MM, meio condicionado de macrófagos.



### 5.5.2.2 Produção de TNF- $\alpha$ por mioblastos induzidos a diferenciação

Os mioblastos previamente induzidos a diferenciação, em 2% de SC por 72h que foram cultivados em 30% de meio condicionado de macrófagos (Figura 20), na avaliação de 24h de incubação, os grupos C2C12 NI em meio de diferenciação e C2C12 NI em MM não ativado produziram menos TNF- $\alpha$  que os demais grupos experimentais. Não houve diferença estatística entre os grupos que foram irradiados.

Após 48h de incubação os grupos C2C12 NI cultivado em meio de diferenciação e C2C12-FBM em M1 MM irradiado produziram menos TNF- $\alpha$  que os demais grupos experimentais e não tiveram diferença estatística entre eles. Não houve diferença estatística entre os demais grupos.

A síntese proteica de TNF- $\alpha$  avaliada em mioblastos induzidos a diferenciação (2% SC – 72h) cultivados em 50% de meio condicionado de macrófagos (Figura 21) após 24h de incubação apresentaram menos produção nos grupos C2C12 NI em meio de diferenciação e C2C12 NI em MM não ativado em relação aos demais grupos experimentais ( $p < 0,001$ ). Não houve diferença estatística entre os grupos que foram irradiados.

Após 48h de incubação, as células do grupo C2C12 NI em meio de diferenciação produziram menos TNF- $\alpha$  que os demais grupos experimentais ( $p < 0,001$ ). Já o grupo C2C12 NI em M1 MM não-irradiado produziu mais TNF- $\alpha$  comparado aos grupos C2C12 NI em MM não ativado ( $p < 0,05$ ) e C2C12-FBM em M1 MM também irradiado ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença estatística entre os demais grupos.

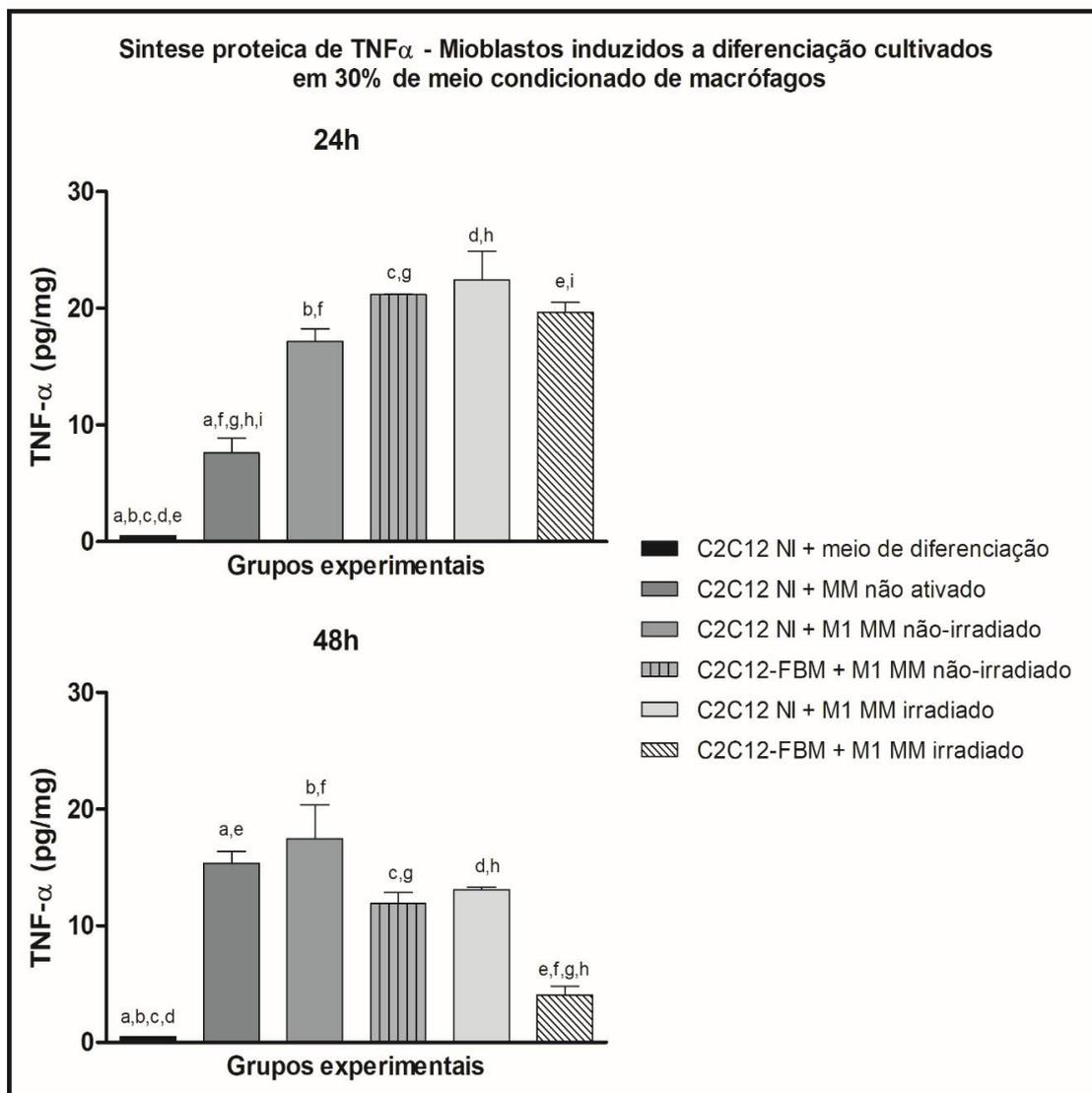


Fig 20. Efeito da FBM sobre a síntese de TNF- $\alpha$  por mioblastos C2C12 induzidos a diferenciação cultivados em 30% de meio condicionado de macrófagos ativado para perfil M1 também irradiados. Síntese proteica de TNF- $\alpha$  pelo método ELISA no sobrenadante das culturas de células C2C12 induzidos a diferenciação em 2% SC por 72h ( $1 \times 10^4$  célula/poço) tratados com FBM (de acordo com grupos experimentais) com adição dos meios condicionados de macrófagos J774 ativados com LPS +IFN- $\gamma$  por 2 horas (M1) e irradiados com laser nos mesmos parâmetros (conforme grupo experimental) - avaliação com 24 e 48h de incubação após irradiações de mioblastos e plaqueamento com devidos meio condicionado. As mesmas letras representam diferença significativa entre grupos. Barras representam médias e desvio padrão. Abreviações: FBM, fotobiomodulação; MM, meio condicionado de macrófagos.

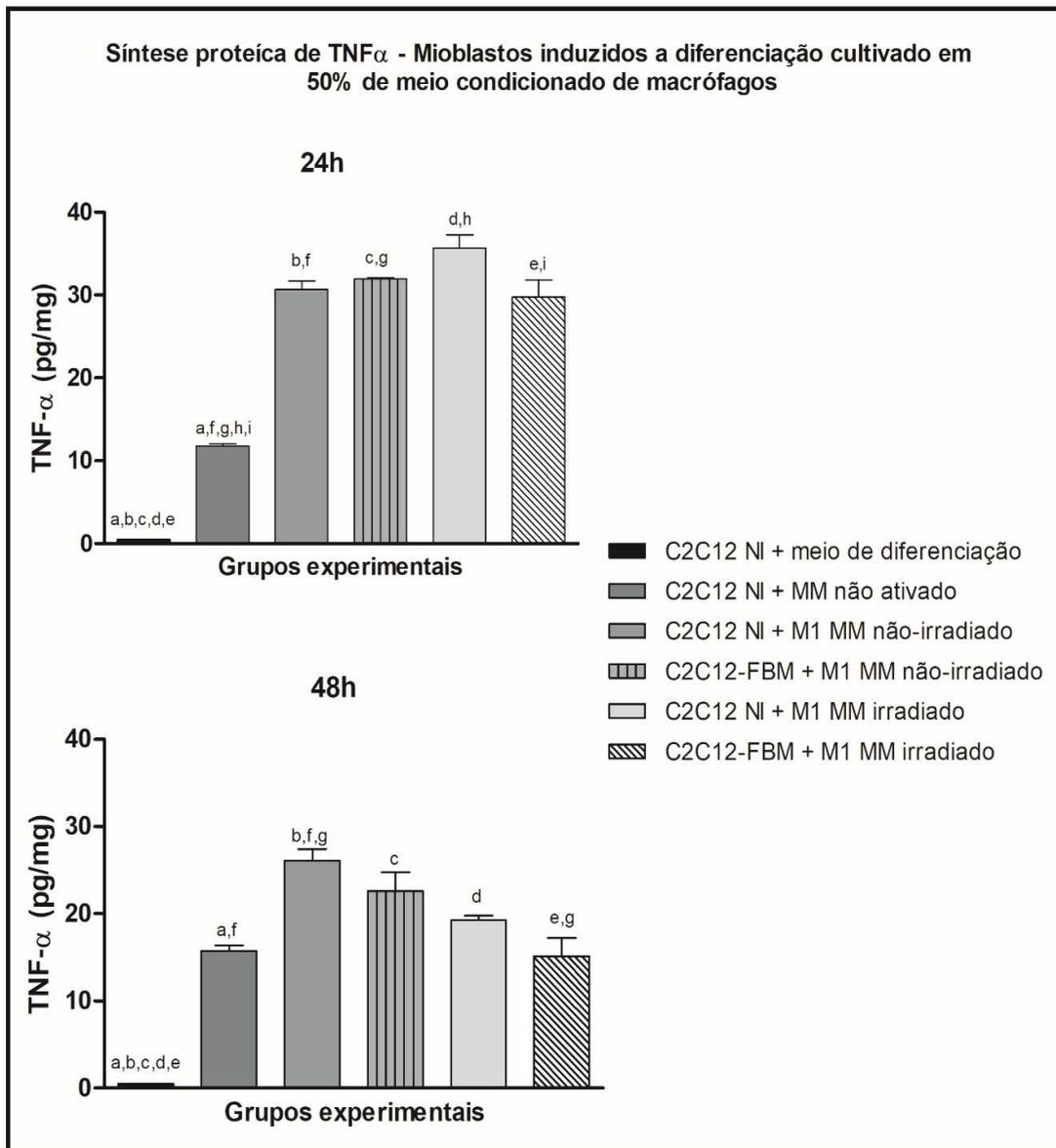


Fig 21. Efeito da FBM sobre a síntese de TNF- $\alpha$  por mioblastos C2C12 induzidos a diferenciação cultivados em 50% de meio condicionado de macrófagos ativados para perfil M1 também irradiados. Síntese proteica de TNF- $\alpha$  pelo método ELISA no sobrenadante das culturas de células C2C12 induzidos a diferenciação em 2% SC por 72h ( $1 \times 10^4$  célula/poço) tratados com FBM (de acordo com grupos experimentais) com adição dos meios condicionados de macrófagos J774 ativados com LPS +IFN- $\gamma$  por 2 horas (M1) e irradiados com laser nos mesmos parâmetros (conforme grupo experimental) - avaliação com 24 e 48h de incubação após irradiações de mioblastos e plaqueamento com devidos meio condicionado. As mesmas letras representam diferença significativa entre grupos. Barras representam médias e desvio padrão. Abreviações: FBM, fotobiomodulação; MM, meio condicionado de macrófagos.

## **5.6 Análise morfológica quantitativa e qualitativa por May-Grunwald e Giemsa**

### **5.6.1 Análise de mioblastos indiferenciados**

Os mioblastos indiferenciados cultivados em 30% de meio condicionado de macrófagos, na avaliação após 24h de incubação (Figura 22H), o grupo C2C12 NI em meio de proliferação apresentou menor índice de fusão quando comparado aos demais grupos experimentais ( $p < 0,001$ ) exceto ao grupo C2C12 NI em M1 MM não-irradiado. As células do grupo C2C12 NI em M1 MM irradiado apresentou maior índice de fusão em relação ao grupo C2C12 NI em MM não ativado ( $p < 0,01$ ). Já o grupo C2C12 NI em M1 MM não-irradiado apresentou menor índice de fusão quando comparado a todos os grupos que receberam tratamento com fotobiomodulação: C2C12-FBM em M1 MM não-irradiado ( $p < 0,01$ ), C2C12 NI em M1 MM irradiado ( $p < 0,001$ ) e C2C12-FBM em M1 MM irradiado ( $p < 0,001$ ). Não houve diferenças estatísticas entre os grupos tratados.

As imagens morfológicas representativas de cada grupo podem ser observadas nas figuras 22A-22F. A análise descritiva da distribuição de núcleos de cada grupo experimental pode ser observada na figura 22G.

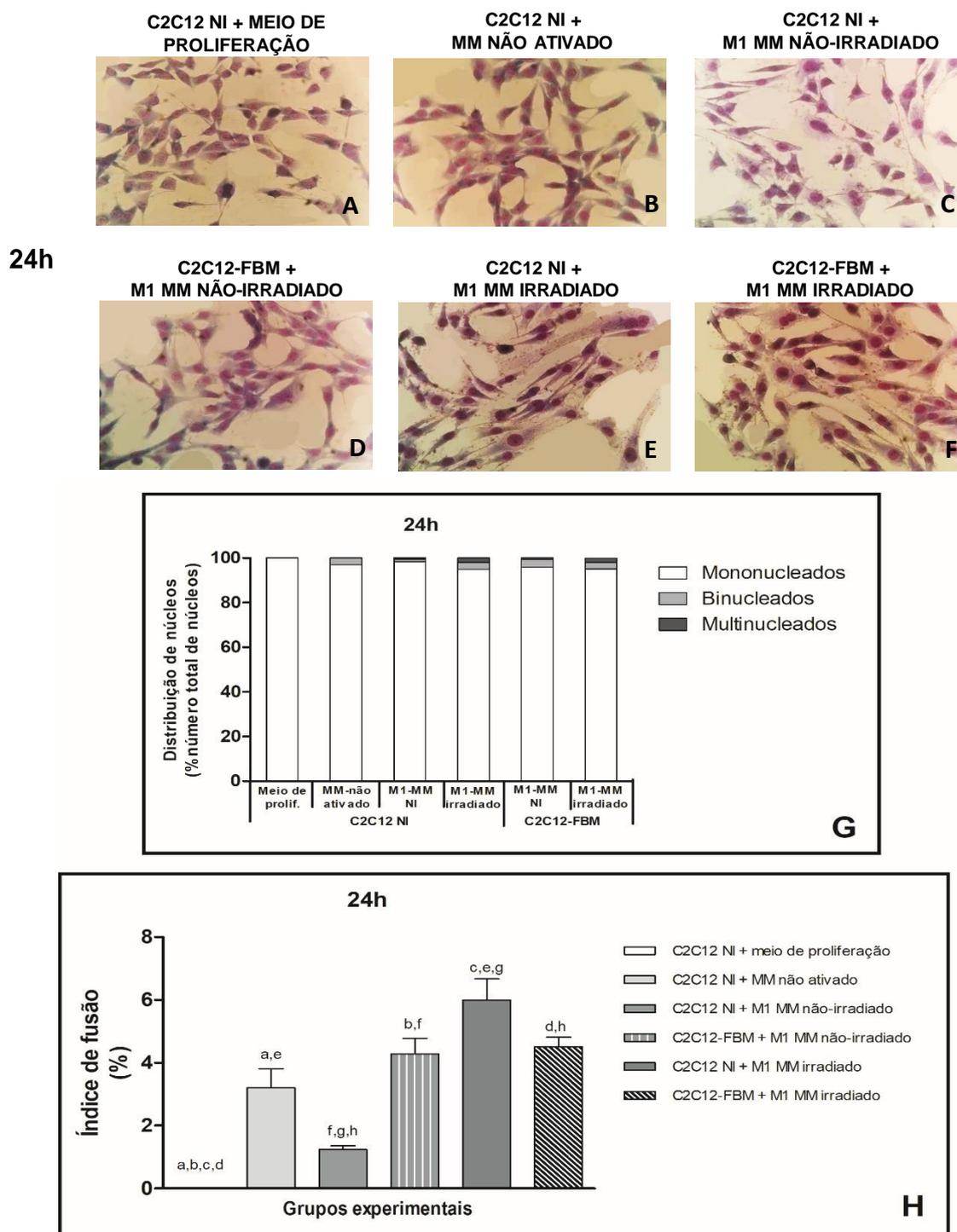


Fig 22. Análise morfológica, distribuição de núcleos e índice de fusão dos mioblastos indiferenciados e tratados, cultivados por 24h em 30% de meio condicionado de macrófagos ativados para perfil M1 também irradiados. Coloração dos mioblastos C2C12 por May-Grunwald e Giemsa nas culturas de células ( $1 \times 10^4$  célula/poço) tratadas com FBM (de acordo com grupos experimentais) com adição dos meios condicionados de macrófagos J774 ativados para perfil M1 e irradiados com laser nos mesmos parâmetros (conforme grupo experimental) – avaliação e cálculos com 24h de incubação após irradiações de mioblastos e plaqueamento com devidos meio condicionado. As imagens apresentam a morfologia dos mioblastos nas diferentes condições experimentais (letras A,B,C,D,E,F). Análise descritiva (%) da distribuição de núcleos (letra G). Índice de fusão de miotubos (letra H). As mesmas letras representam diferença significativa entre grupos. Barras representam médias e desvio padrão. Abreviações: FBM, fotobiomodulação; MM, meio condicionado de macrófagos.

Já após 48h de incubação em 30% de meio condicionado, as células do grupo C2C12-FBM em M1 MM não-irradiado apresentou diferença no índice de fusão (Figura 23H) em relação a todos os demais grupos experimentais, apresentando maior índice de fusão comparado aos grupos com células não tratadas ( $p < 0,001$ ) e menor índice comparado aos grupos das células que foram tratadas ( $p < 0,001$ ). As células dos grupos C2C12 NI em M1 MM irradiado e C2C12-FBM em M1 MM irradiado não tiveram diferença estatística entre eles, mas ambos apresentaram maior índice de fusão comparado aos grupos que não foram tratados com laser ( $p < 0,001$ ).

As imagens morfológicas representativas de cada grupo podem ser observadas nas figuras 23A-23F. A análise descritiva da distribuição de núcleos de cada grupo experimental pode ser observada na figura 23G.

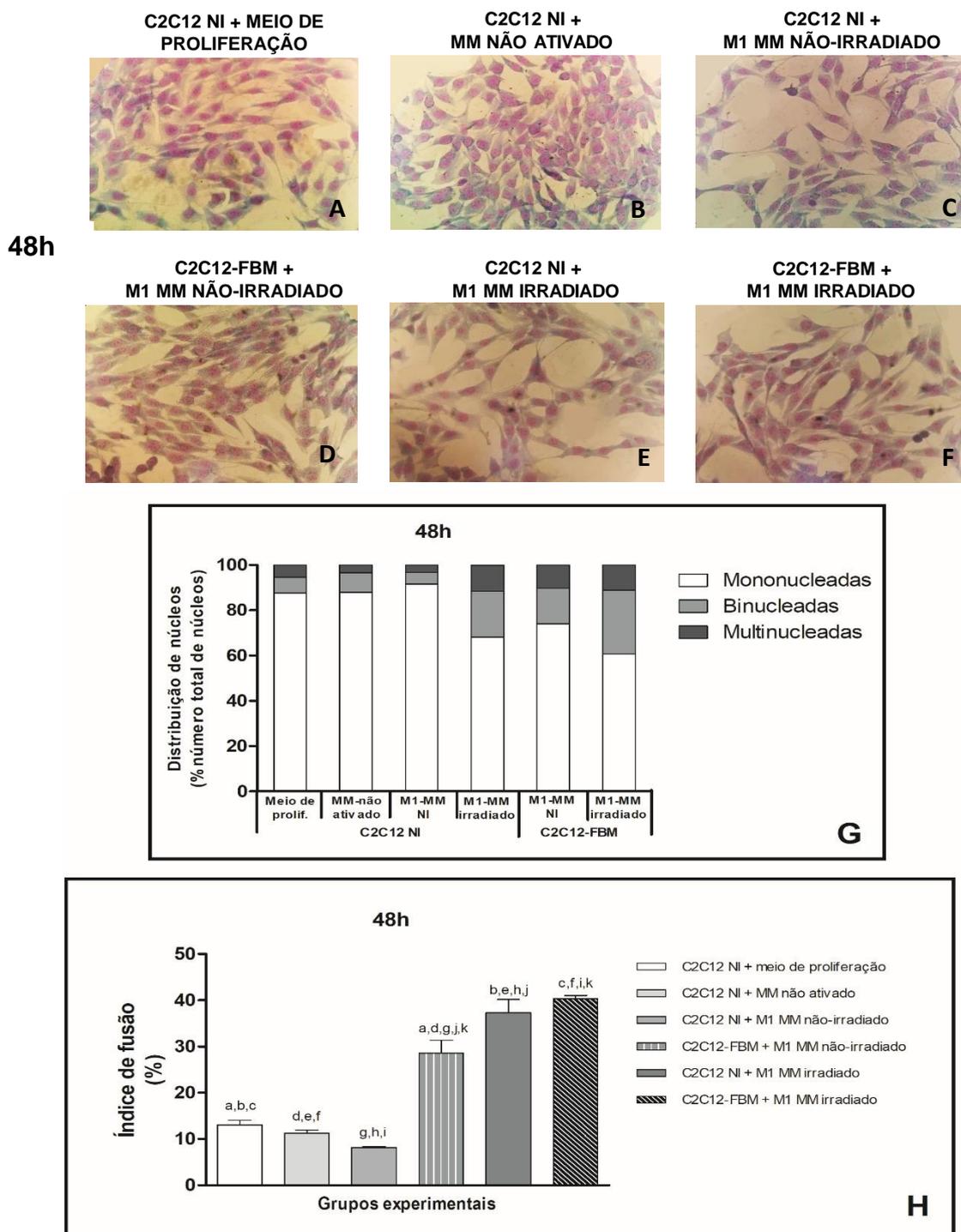


Fig 23. Análise morfológica, distribuição de núcleos e índice de fusão dos mioblastos indiferenciados e tratados, cultivados por 48h em 30% de meio condicionado de macrófagos ativados para perfil M1 também irradiados. Coloração dos mioblastos C2C12 por May-Grunwald e Giemsa nas culturas de células ( $1 \times 10^4$  célula/poço) tratadas com FBM (de acordo com grupos experimentais) com adição dos meios condicionados de macrófagos J774 ativados para perfil M1 e irradiados com laser nos mesmos parâmetros (conforme grupo experimental) – avaliação e cálculos com 48h de incubação após irradiações de mioblastos e plaqueamento com devidos meio condicionado. As imagens apresentam a morfologia dos mioblastos nas diferentes condições experimentais (letras A,B,C,D,E,F). Análise descritiva (%) da distribuição de núcleos (letra G). Índice de fusão de miotubos (letra H). As mesmas letras representam diferença significativa entre grupos. Barras representam médias e desvio padrão. Abreviações: FBM, fotobiomodulação; MM, meio condicionado de macrófagos.

Quando as células C2C12 indiferenciadas foram cultivadas em 50% de meio condicionado de macrófagos, na avaliação após 24h de incubação, as células do grupo C2C12 NI em meio de proliferação apresentaram menor índice de fusão (Figura 24H) em relação aos demais grupos experimentais ( $p < 0,001$ ) exceto ao grupo C2C12-FBM em M1 MM não-irradiado. Já o grupo C2C12 NI em MM não ativado apresentou aumento significativo comparado aos grupos C2C12 NI em M1 MM não-irradiado e C2C12-FBM em M1 MM não-irradiado ( $p < 0,001$ ). As células do grupo C2C12 NI em M1 MM não-irradiado apresentaram maior índice de fusão comparado ao grupo C2C12-FBM em M1 MM não-irradiado ( $p < 0,01$ ) e menor índice de fusão comparado aos grupos: C2C12 NI em M1 MM irradiado ( $p < 0,001$ ) e C2C12-FBM em M1 MM irradiado ( $p < 0,01$ ).

Dos grupos em que as células foram tratadas, o grupo C2C12-FBM em M1 MM não-irradiado apresentou menor índice de fusão em relação aos grupos C2C12 NI em M1 MM irradiado e C2C12-FBM em M1 MM irradiado ( $p < 0,001$ ). O grupo C2C12 NI em M1 MM irradiado teve maior índice de fusão em relação aos demais grupos experimentais tratados ou não com laser ( $p < 0,001$ ).

As imagens morfológicas representativas de cada grupo podem ser observadas nas figuras 24A-24F. A análise descritiva da distribuição de núcleos de cada grupo experimental pode ser observada na figura 24G.

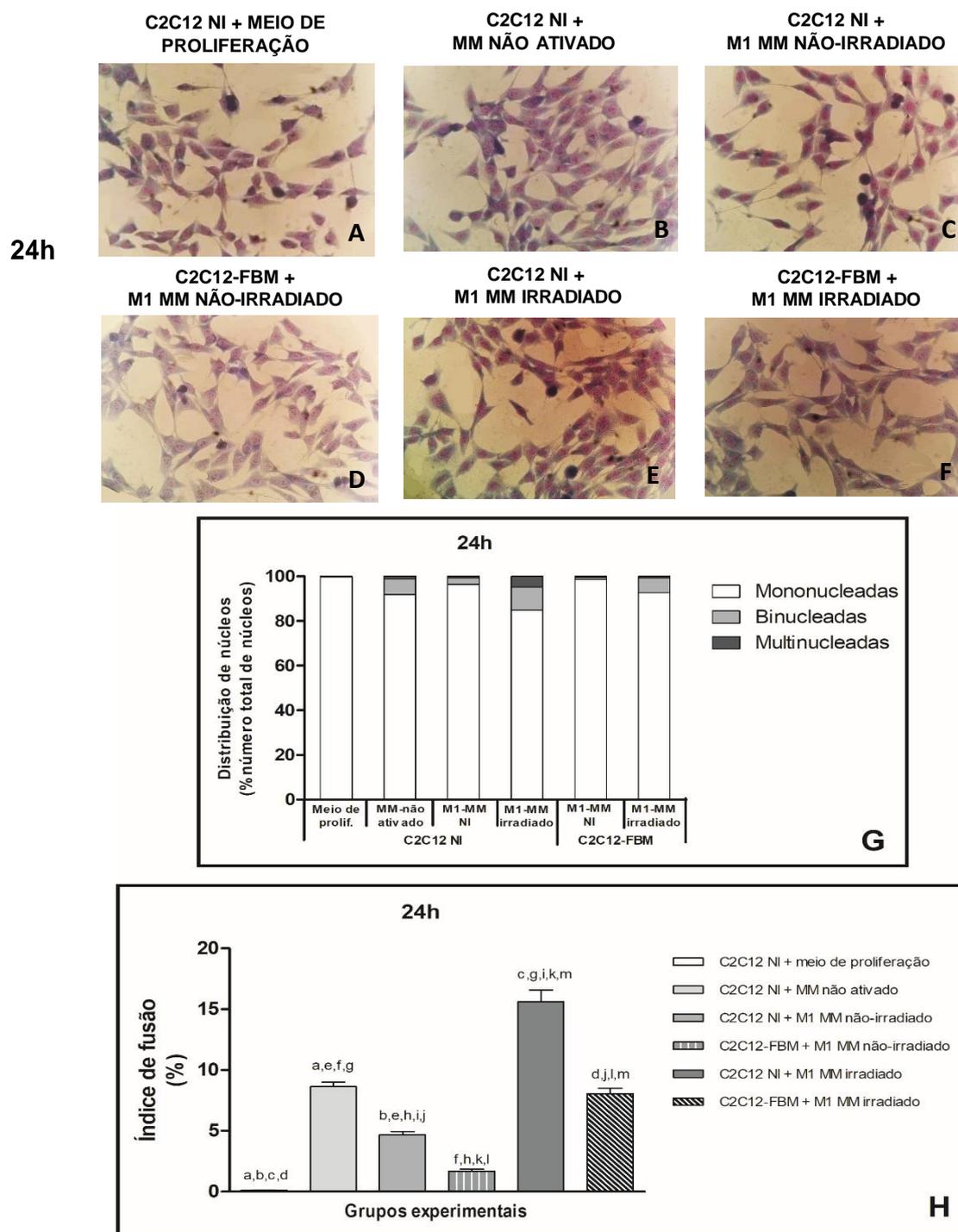


Fig 24. Análise morfológica, distribuição de núcleos e índice de fusão dos mioblastos indiferenciados e tratados, cultivados por 24h em 50% de meio condicionado de macrófagos ativados para perfil M1 também irradiados. Coloração dos mioblastos C2C12 por May-Grunwald e Giemsa nas culturas de células ( $1 \times 10^4$  célula/poço) tratadas com FBM (de acordo com grupos experimentais) com adição dos meios condicionados de macrófagos J774 ativados para perfil M1 e irradiados com laser nos mesmos parâmetros (conforme grupo experimental) – avaliação e cálculos com 24h de incubação após irradiações de mioblastos e plaqueamento com devidos meio condicionado. As imagens apresentam a morfologia dos mioblastos nas diferentes condições experimentais (letras A,B,C,D,E,F). Análise descritiva (%) da distribuição de núcleos (letra G). Índice de fusão de miotubos (letra H). As mesmas letras representam diferença significativa entre grupos. Barras representam médias e desvio padrão. Abreviações: FBM, fotobiomodulação; MM, meio condicionado de macrófagos.

Já após 48h de incubação em 50% de meio condicionado de macrófagos, o índice de fusão (Figura 25H) das células do grupo C2C12 NI em meio de proliferação apresentaram redução significativa em relação aos grupos tratados com FBM ( $p < 0,001$ ). Os grupos C2C12 NI em MM não ativado e C2C12 NI em M1 MM não-irradiado apresentaram diferença estatística entre eles ( $p < 0,01$ ) e ambos apresentaram menor índice de fusão em comparação aos grupos tratados ( $p < 0,001$ ).

Já os grupos em que as células foram irradiadas, os grupos C2C12-FBM em M1 MM não-irradiado e C2C12 NI em M1 MM irradiado não apresentaram diferença estatística no índice de fusão entre eles, porém grupo C2C12-FBM cultivado em M1 MM irradiado apresentou maior índice de fusão em relação aos grupos C2C12-FBM em M1 MM não-irradiado ( $p < 0,05$ ) e C2C12 NI em M1 MM irradiado ( $p < 0,001$ ).

As imagens morfológicas representativas de cada grupo podem ser observadas nas figuras 25A-25F. A análise descritiva da distribuição de núcleos de cada grupo experimental pode ser observada na figura 25G.

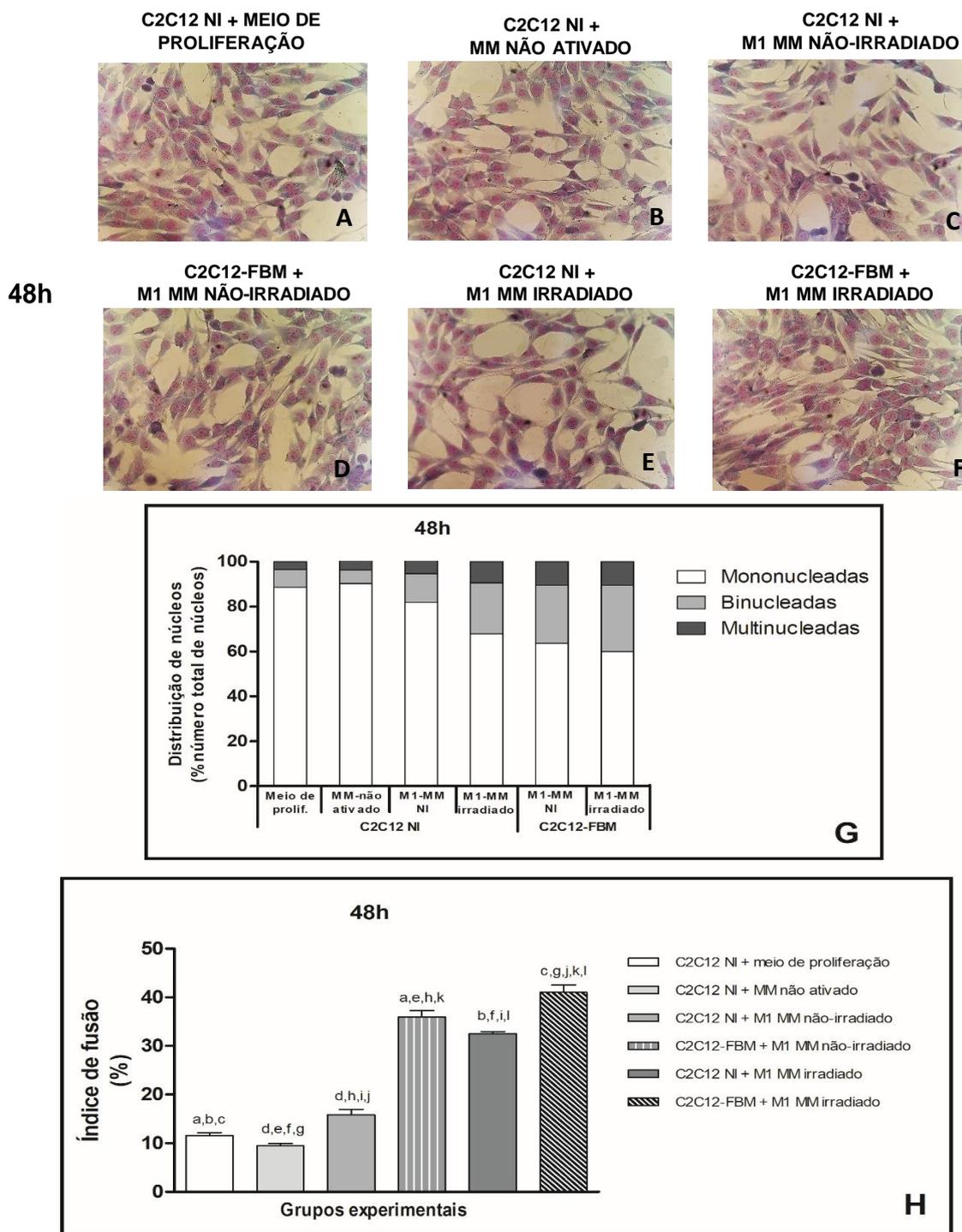


Fig 25. Análise morfológica, distribuição de núcleos e índice de fusão dos mioblastos indiferenciados e tratados, cultivados por 48h em 50% de meio condicionado de macrófagos ativados para perfil M1 também irradiados. Coloração dos mioblastos C2C12 por May-Grunwald e Giemsa nas culturas de células ( $1 \times 10^4$  célula/poço) tratadas com FBM (de acordo com grupos experimentais) com adição dos meios condicionados de macrófagos J774 ativados para perfil M1 e irradiados com laser nos mesmos parâmetros (conforme grupo experimental) – avaliação e cálculos com 48h de incubação após irradiações de mioblastos e plaqueamento com devidos meio condicionado. As imagens apresentam a morfologia dos mioblastos nas diferentes condições experimentais (letras A,B,C,D,E,F). Análise descritiva (%) da distribuição de núcleos (letra G). Índice de fusão de miotubos (letra H). As mesmas letras representam diferença significativa entre grupos. Barras representam médias e desvio padrão. Abreviações: FBM, fotobiomodulação; MM, meio condicionado de macrófagos.

### 5.6.2 Análise de mioblastos induzidos a diferenciação

Na avaliação do índice de fusão (Figura 26H) dos mioblastos induzidos a diferenciação e cultivados, por 24h, em 30% de meio condicionado de macrófagos, o grupo C2C12 NI em MM não ativado apresentou maior índice de fusão em relação aos demais grupos experimentais ( $p < 0,001$  e  $p < 0,05$  vs. C2C12 NI em meio de diferenciação).

As células do grupo C2C12 NI em M1 MM não-irradiado apresentaram maior índice de fusão em relação aos grupos tratados: C2C12-FBM em M1 MM não-irradiado ( $p < 0,001$ ), C2C12 NI em M1 MM irradiado ( $p < 0,001$ ) e C2C12-FBM em M1 MM irradiado ( $p < 0,001$ ).

Quando avaliados os grupos de células que foram tratadas com FBM, o grupo C2C12-FBM em M1 MM não-irradiado não apresentou diferença estatística em relação aos outros grupos que tiveram as células irradiadas. Já o grupo C2C12-FBM em M1 MM irradiado apresentou maior índice de fusão em relação ao grupo C2C12 NI em M1 MM irradiado ( $p < 0,01$ ).

As imagens morfológicas representativas de cada grupo podem ser observadas nas figuras 26A-26F. A análise descritiva da distribuição de núcleos de cada grupo experimental pode ser observada na figura 26G.

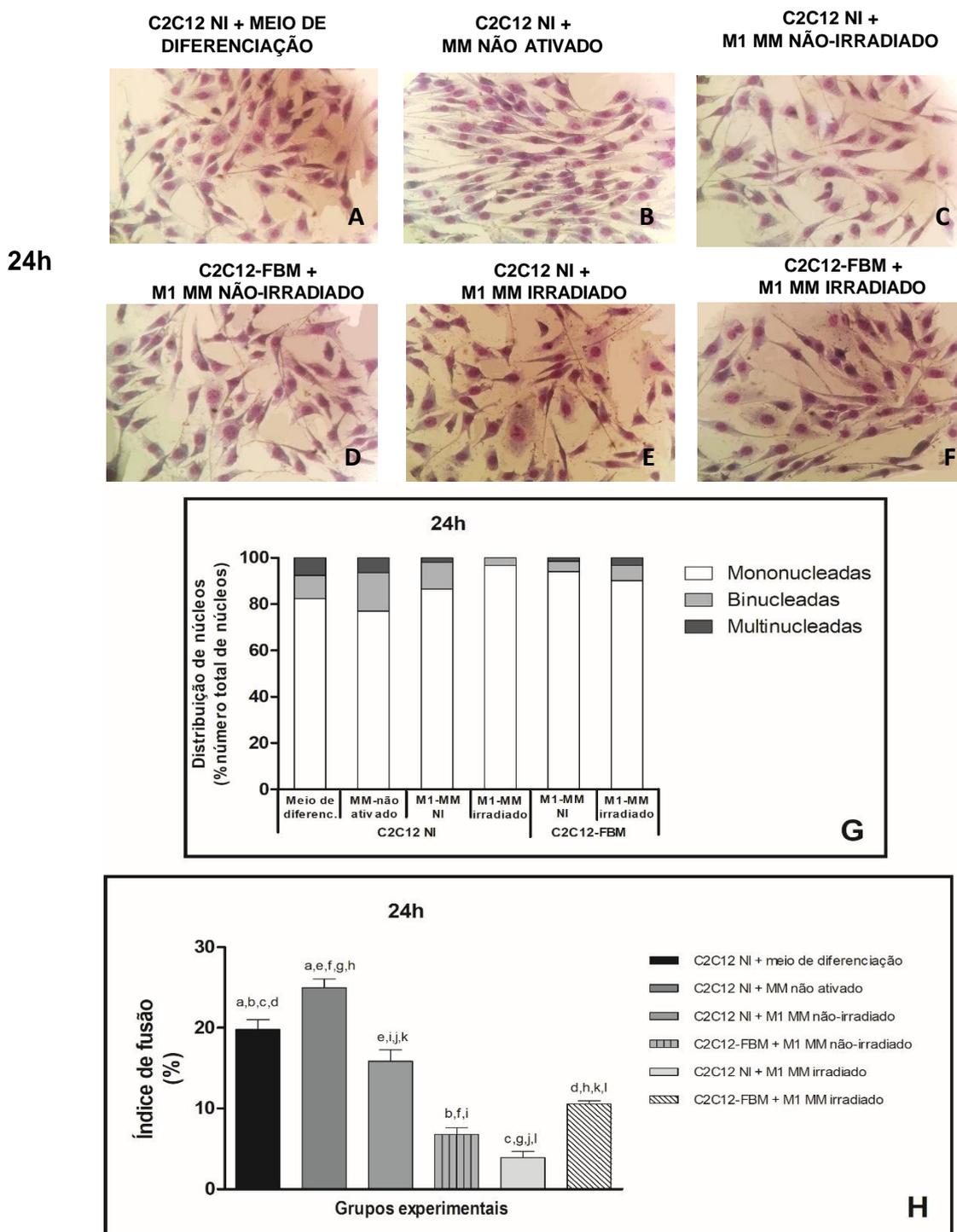


Fig 26. Análise morfológica, distribuição de núcleos e índice de fusão dos mioblastos induzidos a diferenciação e tratados, cultivados por 24h em 30% de meio condicionado de macrófagos ativados para perfil M1 também irradiados. Coloração das células C2C12 induzidas a diferenciação (2% SC-72h) por May-Grunwald e Giemsa nas culturas ( $1 \times 10^4$  célula/poço) tratadas com FBM (de acordo com grupos experimentais) com adição dos meios condicionados de macrófagos J774 ativados para perfil M1 e irradiados com laser nos mesmos parâmetros (conforme grupo experimental) – avaliação e cálculos com 24h de incubação após irradiações de mioblastos e plaqueamento com devidos meio condicionado. As imagens apresentam a morfologia das células nas diferentes condições experimentais (letras A,B,C,D,E,F). Análise descritiva (%) da distribuição de núcleos (letra G). Índice de fusão de miotubos (letra H). As mesmas letras representam diferença significativa entre grupos. Barras representam médias e desvio padrão. Abreviações: FBM, fotobiomodulação; MM, meio condicionado de macrófagos.

Os mioblastos induzidos a diferenciação e cultivados em 30% de meio condicionado de macrófagos, durante 48h, apresentaram maior índice de fusão (Figura 27H) dos grupos C2C12 NI em meio de diferenciação e C2C12-FBM em M1 MM irradiado em relação aos demais grupos experimentais ( $p < 0,001$ ), porém não apresentaram diferença estatística entre eles.

As células do grupo C2C12 NI em M1 MM não-irradiado tiveram menor índice de fusão em relação aos demais grupos experimentais ( $p < 0,01$  vs. C2C12 em MM não ativado e C2C12-FBM em MM não-irradiado), exceto ao grupo C2C12 NI em M1 MM irradiado.

Os grupos em que as células foram irradiadas, C2C12-FBM em M1 MM não-irradiado e C2C12 NI em M1 MM irradiado, não apresentaram diferença estatísticas no índice de fusão entre eles.

As imagens morfológicas representativas de cada grupo podem ser observadas nas figuras 27A-27F. A análise descritiva da distribuição de núcleos de cada grupo experimental pode ser observada na figura 27G.

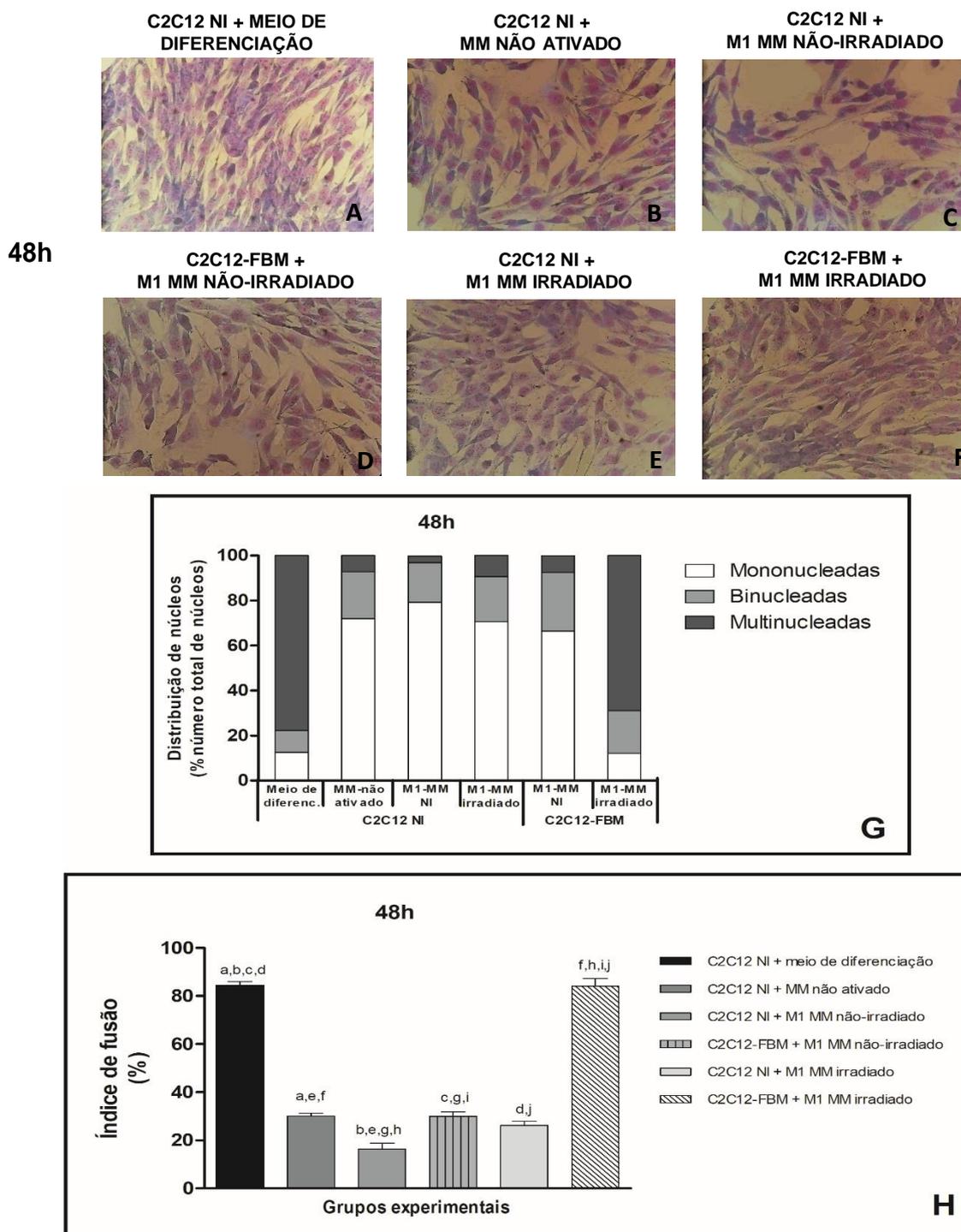


Fig 27. Análise morfológica, distribuição de núcleos e índice de fusão dos mioblastos induzidos a diferenciação e tratados, cultivados por 48h em 30% de meio condicionado de macrófagos ativados para perfil M1 também irradiados. Coloração das células C2C12 induzidas a diferenciação (2% SC-72h) por May-Grunwald e Giemsa nas culturas ( $1 \times 10^4$  célula/poço) tratadas com FBM (de acordo com grupos experimentais) com adição dos meios condicionados de macrófagos J774 ativados para perfil M1 e irradiados com laser nos mesmos parâmetros (conforme grupo experimental) – avaliação e cálculos com 24h de incubação após irradiações de mioblastos e plaqueamento com devidos meio condicionado. As imagens apresentam a morfologia das células nas diferentes condições experimentais (letras A,B,C,D,E,F). Análise descritiva (%) da distribuição de núcleos (letra G). Índice de fusão de miotubos (letra H). As mesmas letras representam diferença significativa entre grupos. Barras representam médias e desvio padrão. Abreviações: FBM, fotobiomodulação; MM, meio condicionado de macrófagos.

Quando os mioblastos C2C12 induzidos a diferenciação foram cultivados em 50% de meio condicionado de macrófagos e incubados por 24h (Figura 28H), as células dos grupos C2C12 NI em meio de diferenciação e C2C12 NI em MM não ativado tiveram maior índice de fusão em relação aos demais grupos experimentais ( $p < 0,001$ ) e diferença estatística entre eles ( $p < 0,001$ ).

Já o grupo C2C12 NI em M1 MM não-irradiado apresentou maior índice de fusão apenas comparado ao grupo C2C12 NI em M1 MM irradiado ( $p < 0,01$ ) entre os grupos que foram submetidos a fotobiomodulação.

Quando comparados os grupos irradiados, as células do grupo C2C12-FBM em M1 MM não-irradiado apresentaram maior índice de fusão comparado ao grupo C2C12 NI em M1 MM irradiado ( $p < 0,05$ ) e menor índice em relação ao grupo C2C12-FBM em M1 MM irradiado ( $p < 0,05$ ). Já o grupo C2C12-FBM em M1 MM irradiado apresentou maior índice de fusão quando comparado ao grupo C2C12 NI em M1 MM irradiado ( $p < 0,001$ ).

As imagens morfológicas representativas de cada grupo podem ser observadas nas figuras 28A-28F. A análise descritiva da distribuição de núcleos de cada grupo experimental pode ser observada na figura 28G.

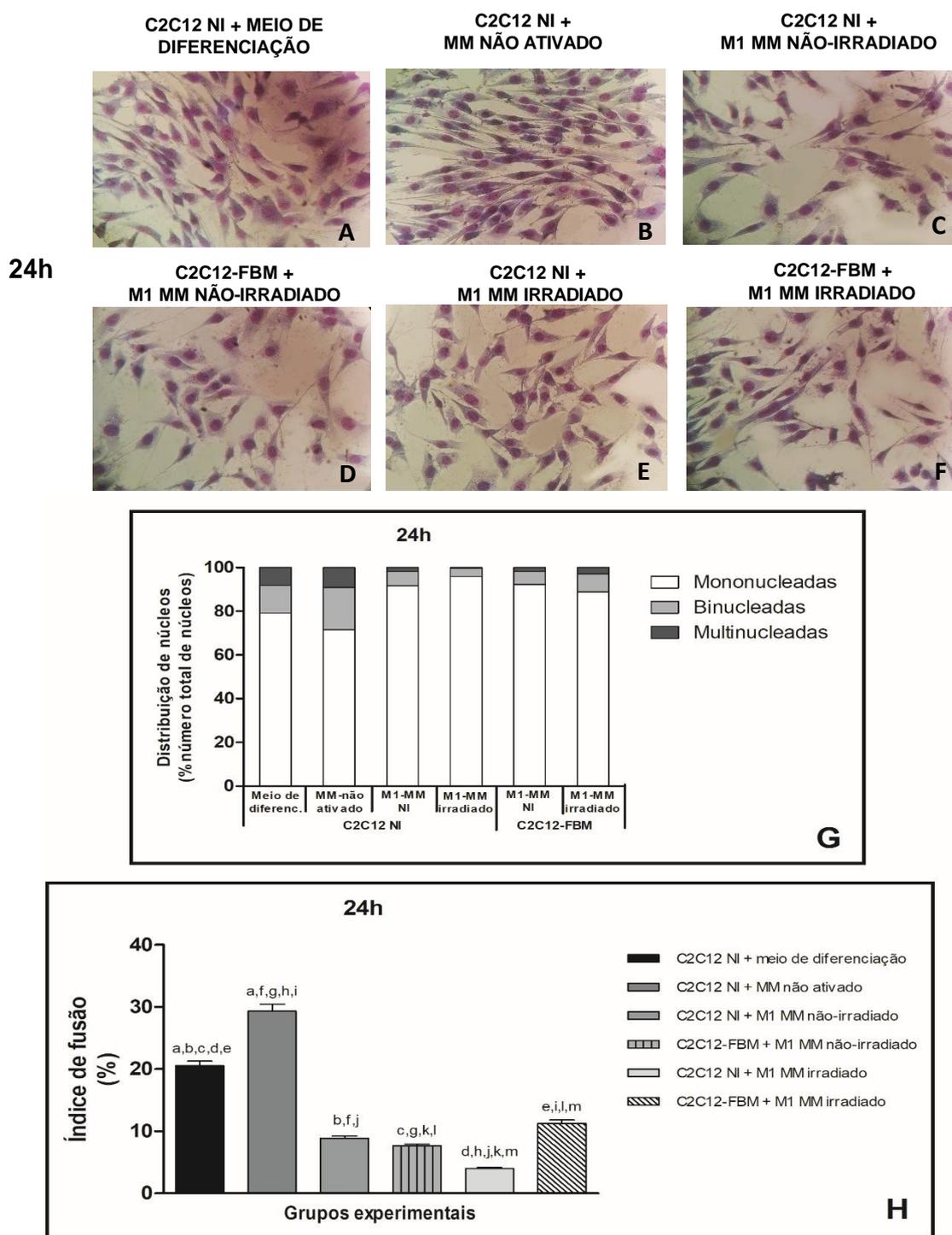


Fig 28. Análise morfológica, distribuição de núcleos e índice de fusão dos mioblastos induzidos a diferenciação e tratados, cultivados por 24h em 50% de meio condicionado de macrófagos ativado para perfil M1 também irradiados. Coloração das células C2C12 induzidas a diferenciação (2% SC-72h) por May-Grunwald e Giemsa nas culturas ( $1 \times 10^4$  célula/poço) tratadas com FBM (de acordo com grupos experimentais) com adição dos meios condicionados de macrófagos J774 ativado para perfil M1 e irradiados com laser nos mesmos parâmetros (conforme grupo experimental) – avaliação e cálculos com 24h de incubação após irradiações de mioblastos e plaqueamento com devidos meio condicionado. As imagens apresentam a morfologia das células nas diferentes condições experimentais (letras A,B,C,D,E,F). Análise descritiva (%) da distribuição de núcleos (letra G). Índice de fusão de miotubos (letra H). As mesmas letras representam diferença significativa entre grupos. Barras representam médias e desvio padrão. Abreviações: FBM, fotobiomodulação; MM, meio condicionado de macrófagos.

Já o índice de fusão das células C2C12 induzidas a diferenciação foram cultivadas em 50% de meio condicionado de macrófagos durante 48h (Figura 29H), o grupo C2C12 NI em meio de diferenciação apresentou maior índice de fusão em relação aos demais grupos experimentais, exceto ao grupo C2C12-FBM em M1 MM irradiado que apresentaram índices similares.

Já o grupo C2C12 NI em MM não ativado apresentou menor índice de fusão em relação as células dos grupos C2C12 NI em meio de diferenciação e C2C12-FBM em M1 MM irradiado ( $p < 0,01$ ) e maior índice em relação comparado aos demais grupos experimentais ( $p < 0,001$ ).

O grupo C2C12 NI em M1 MM não-irradiado apenas não apresentou diferença estatística em relação ao grupo C2C12-FBM em M1 MM não-irradiado.

Quando as células foram submetidas a fotobiomodulação, os grupos C2C12-FBM em M1 MM não-irradiado tiveram menor índice de fusão em relação ao grupo C2C12-FBM em M1 MM irradiado ( $p < 0,001$ ).

As imagens morfológicas representativas de cada grupo podem ser observadas nas figuras 29A-29F. A análise descritiva da distribuição de núcleos de cada grupo experimental pode ser observada na figura 29G.

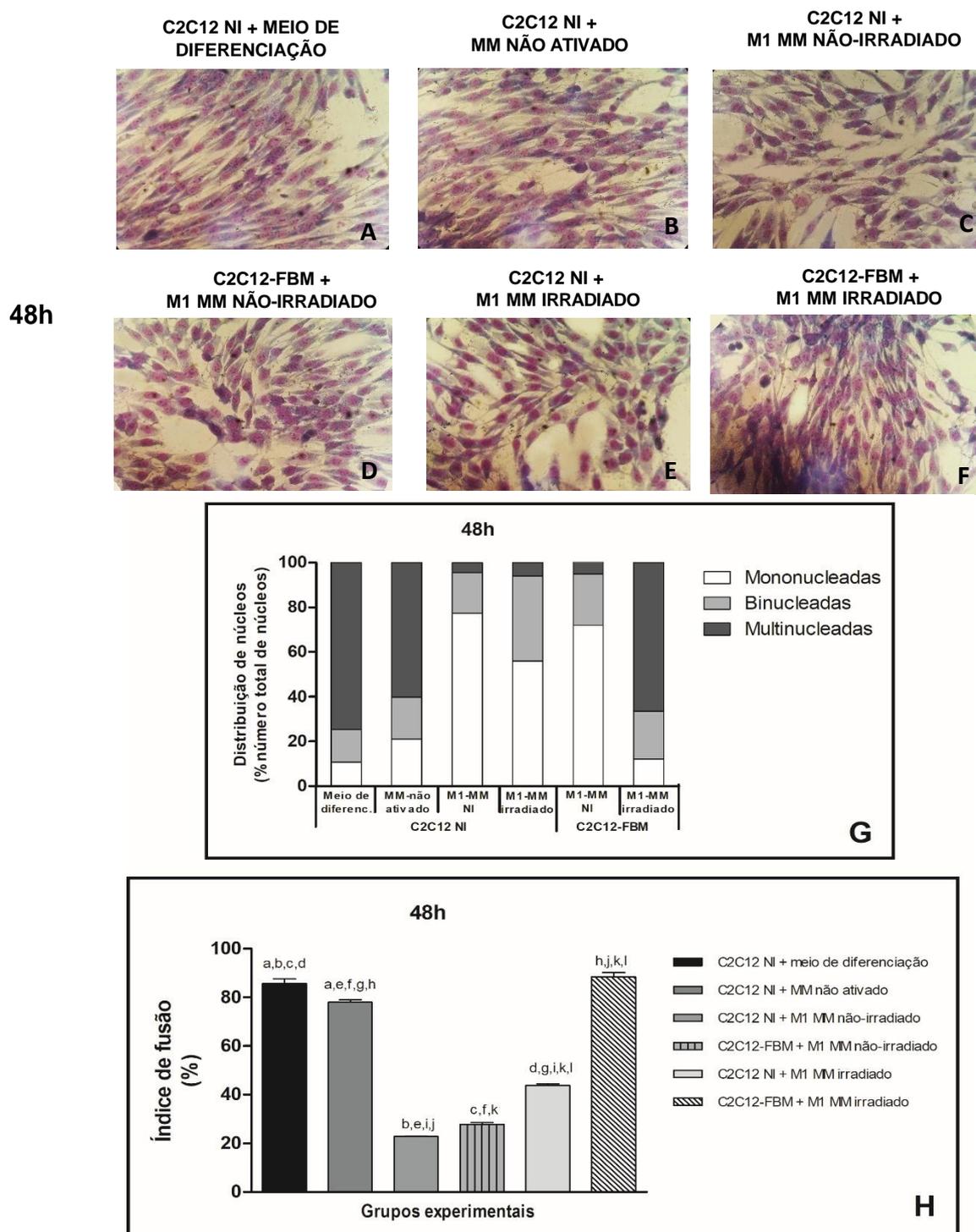


Fig 29. Análise morfológica, distribuição de núcleos e índice de fusão dos mioblastos induzidos a diferenciação e tratados, cultivados por 48h em 50% de meio condicionado de macrófagos ativado para perfil M1 também irradiados. Coloração das células C2C12 induzidas a diferenciação (2% SC-72h) por May-Grunwald e Giemsa nas culturas ( $1 \times 10^4$  célula/poço) tratadas com FBM (de acordo com grupos experimentais) com adição dos meios condicionados de macrófagos J774 ativado para perfil M1 e irradiados com laser nos mesmos parâmetros (conforme grupo experimental) – avaliação e cálculos com 24h de incubação após irradiações de mioblastos e plaqueamento com devidos meio condicionado. As imagens apresentam a morfologia das células nas diferentes condições experimentais (letras A,B,C,D,E,F). Análise descritiva (%) da distribuição de núcleos (letra G). Índice de fusão de miotubos (letra H). As mesmas letras representam diferença significativa entre grupos. Barras representam médias e desvio padrão. Abreviações: FBM, fotobiomodulação; MM, meio condicionado de macrófagos.

## 5.7 Tabelas resumo dos resultados dos experimentos

### 5.7.1 Tabela resumo dos resultados de mioblastos indiferenciados

Os resultados dos experimentos realizados com mioblastos indiferenciados cultivados em 30 e 50% de meio condicionado de macrófagos incubados por 24 e 48 horas estão aglutinados na tabela nº5.

Tabela 5. Resumo dos resultados de experimentos com mioblastos indiferenciados cultivados em meio condicionado de macrófagos

	Viabilidade celular		Proliferação celular		Síntese de NO		Síntese de IL-6		Síntese de TNF- $\alpha$	
	[30%] MM	[50%] MM	[30%] MM	[50%] MM	[30%] MM	[50%] MM	[30%] MM	[50%] MM	[30%] MM	[50%] MM
<b>Comparação entre grupos sem tratamento com FBM</b>										
<b>C2C12 NI em meio de proliferação X C2C12 NI em MM não ativado</b>	24h - ↓ 48h - ↓	24h - ns 48h - ↓	24h - ↓ 48h - ↓	24h - ns 48h - ↓	24h - ↑ 48h - ns	24h - ns 48h - ↑	24h - ↑ 48h - ↑	24h - ↑ 48h - ↑	24h - ↑ 48h - ↑	24h - ↑ 48h - ↑
<b>C2C12 NI em meio de proliferação X C2C12 NI em M1 MM não-irradiado</b>	24h - ↓ 48h - ↓	24h - ns 48h - ns	24h - ↓ 48h - ↓	24h - ↓ 48h - ↓	24h - ↑ 48h - ↑	24h - ↑ 48h - ↑	24h - ↑ 48h - ↑	24h - ↑ 48h - ↑	24h - ↑ 48h - ↑	24h - ↑ 48h - ↑
<b>C2C12 NI em MM não ativado X C2C12 NI em M1 MM não irradiado</b>	24h - ns 48h - ns	24h - ↑ 48h - ↑	24h - ↑ 48h - ↑	24h - ↑ 48h - ↑	24h - ns 48h - ↓	24h - ↑ 48h - ↑	24h - ↑ 48h - ↑			
<b>Comparação entre grupos tratados com FBM</b>										
<b>C2C12 NI em M1 MM não-irradiado X C2C12-FBM em M1 MM não-irradiado</b>	24h - ns 48h - ns	24h - ↑ 48h - ns	24h - ns 48h - ↑	24h - ↓ 48h - ↑	24h - ↓ 48h - ↓	24h - ↓ 48h - ↓	24h - ↓ 48h - ↓	24h - ns 48h - ↓	24h - ns 48h - ns	24h - ns 48h - ns
<b>C2C12 NI em M1 MM não-irradiado X C2C12 NI em M1 MM irradiado</b>	24h - ns 48h - ns	24h - ns 48h - ↑	24h - ns 48h - ns	24h - ns 48h - ↑	24h - ↓ 48h - ns	24h - ↓ 48h - ↓	24h - ↓ 48h - ↓	24h - ↓ 48h - ↓	24h - ns 48h - ↓	24h - ns 48h - ↓
<b>C2C12 NI em M1 MM não-irradiado X C2C12-FBM em M1 MM irradiado</b>	24h - ns 48h - ns	24h - ns 48h - ↑	24h - ns 48h - ns	24h - ns 48h - ↑	24h - ↓ 48h - ↓	24h - ↓ 48h - ↓	24h - ↓ 48h - ↓	24h - ns 48h - ↓	24h - ns 48h - ↓	24h - ↑ 48h - ns
<b>C2C12-FBM em M1 MM não-irradiado X C2C12 NI em M1 MM irradiado</b>	24h - ns 48h - ns	24h - ↓ 48h - ns	24h - ns 48h - ns	24h - ↑ 48h - ns	24h - ns 48h - ↑	24h - ns 48h - ns	24h - ↓ 48h - ↓	24h - ↓ 48h - ns	24h - ns 48h - ns	24h - ns 48h - ns
<b>C2C12-FBM em M1 MM não-irradiado X C2C12-FBM em M1 MM irradiado</b>	24h - ns 48h - ns	24h - ns 48h - ns	24h - ns 48h - ns	24h - ns 48h - ↑	24h - ns 48h - ns	24h - ↓ 48h - ↓	24h - ↓ 48h - ↓	24h - ↓ 48h - ns	24h - ns 48h - ↓	24h - ns 48h - ns
<b>C2C12 NI em M1 MM irradiado X C2C12-FBM em M1 MM irradiado</b>	24h - ns 48h - ns	24h - ns 48h - ns	24h - ns 48h - ns	24h - ns 48h - ↑	24h - ns 48h - ns	24h - ns 48h - ↓	24h - ns 48h - ↓	24h - ↑ 48h - ns	24h - ns 48h - ↓	24h - ns 48h - ↑

O grupo experimental em vermelho é o que apresentou: aumento (↑), ou redução (↓) em relação ao grupo em preto. Diferença não significativa (ns); FBM, fotobiomodulação; MM, meio condicionado de macrófagos; NI, não irradiado; [ ], concentração.

## 5.7.2 Tabela resumo dos resultados de mioblastos induzidos a diferenciação

Os resultados dos experimentos realizados com mioblastos induzidos a diferenciação cultivados em 30 e 50% de meio condicionado de macrófagos incubados por 24 e 48 horas estão aglutinados na tabela nº6.

Tabela 6. Resumo dos resultados de experimentos com mioblastos induzidos a diferenciação cultivados em meio condicionado de macrófagos

	Viabilidade celular		Proliferação celular		Síntese de NO		Síntese de IL-6		Síntese de TNF- $\alpha$	
	[30%] MM	[50%] MM	[30%] MM	[50%] MM	[30%] MM	[50%] MM	[30%] MM	[50%] MM	[30%] MM	[50%] MM
<b>Comparação entre grupos sem tratamento com FBM</b>										
<b>C2C12 NI em meio de diferenciação X C2C12 NI em MM não ativado</b>	24h - ns 48h - ns	24h - ns 48h - ns	24h - ns 48h - ns	24h - ns 48h - ↓	24h - ns 48h - ↑	24h - ns 48h - ↓	24h - ns 48h - ↑	24h - ↑ 48h - ↑	24h - ↑ 48h - ↑	24h - ↑ 48h - ↑
<b>C2C12 NI em meio de diferenciação X C2C12 NI em M1 MM não-irradiado</b>	24h - ↓ 48h - ns	24h - ns 48h - ns	24h - ↓ 48h - ↓	24h - ns 48h - ↓	24h - ↑ 48h - ↑	24h - ↑ 48h - ns	24h - ↓ 48h - ↓	24h - ↑ 48h - ↑	24h - ↑ 48h - ns	24h - ↑ 48h - ↑
<b>C2C12 NI em MM não ativado X C2C12 NI em M1 MM não irradiado</b>	24h - ns 48h - ns	24h - ns 48h - ns	24h - ns 48h - ↓	24h - ns 48h - ns	24h - ↑ 48h - ns	24h - ↑ 48h - ↑	24h - ↓ 48h - ↓	24h - ↑ 48h - ↓	24h - ↑ 48h - ns	24h - ↑ 48h - ↑
<b>Comparação entre grupos tratados com FBM</b>										
<b>C2C12 NI em M1 MM não-irradiado X C2C12-FBM em M1 MM não-irradiado</b>	24h - ns 48h - ns	24h - ns 48h - ns	24h - ns 48h - ↑	24h - ns 48h - ns	24h - ↓ 48h - ns	24h - ↓ 48h - ↓	24h - ↑ 48h - ↑	24h - ↑ 48h - ↓	24h - ns 48h - ns	24h - ns 48h - ns
<b>C2C12 NI em M1 MM não-irradiado X C2C12 NI em M1 MM irradiado</b>	24h - ns 48h - ↑	24h - ns 48h - ns	24h - ns 48h - ↑	24h - ns 48h - ns	24h - ↑ 48h - ns	24h - ↑ 48h - ns	24h - ↑ 48h - ↑	24h - ns 48h - ns	24h - ns 48h - ns	24h - ns 48h - ns
<b>C2C12 NI em M1 MM não-irradiado X C2C12-FBM em M1 MM irradiado</b>	24h - ns 48h - ↑	24h - ns 48h - ↓	24h - ns 48h - ns	24h - ↑ 48h - ↑	24h - ns 48h - ns	24h - ns 48h - ↓	24h - ns 48h - ↓			
<b>C2C12-FBM em M1 MM não-irradiado X C2C12 NI em M1 MM irradiado</b>	24h - ns 48h - ns	24h - ↑ 48h - ns	24h - ↑ 48h - ↑	24h - ↑ 48h - ↑	24h - ns 48h - ↓	24h - ns 48h - ns	24h - ns 48h - ns			
<b>C2C12-FBM em M1 MM não-irradiado X C2C12-FBM em M1 MM irradiado</b>	24h - ns 48h - ↑	24h - ns 48h - ns	24h - ns 48h - ↑	24h - ns 48h - ns	24h - ns 48h - ↓	24h - ↑ 48h - ns	24h - ↑ 48h - ↑	24h - ns 48h - ↓	24h - ns 48h - ↓	24h - ns 48h - ns
<b>C2C12 NI em M1 MM irradiado X C2C12-FBM em M1 MM irradiado</b>	24h - ns 48h - ↑	24h - ns 48h - ↑	24h - ns 48h - ↑	24h - ns 48h - ns	24h - ↓ 48h - ↓	24h - ↓ 48h - ↓	24h - ↑ 48h - ↑	24h - ns 48h - ns	24h - ns 48h - ↓	24h - ns 48h - ns

O grupo experimental em vermelho é o que apresentou: aumento (↑), ou redução (↓) em relação ao grupo em preto. Diferença não significativa (ns); FBM, fotobiomodulação; MM, meio condicionado de macrófagos; NI, não irradiado; [ ], concentração.

## 6. DISCUSSÃO

A regeneração muscular após lesão é atribuída a sinais intrínsecos do músculo estriado esquelético, conferindo suas características de plasticidade e alta capacidade de regeneração. Capacidade dada pela presença das células satélites musculares, estas que após as lesões são ativadas, proliferam e passam por fases de diferenciação e fusão, para gerar o reparo da região lesionada ou formar novas fibras musculares<sup>5,15</sup>.

Esse processo também é modulado por sinais extrínsecos, atribuídos principalmente aos macrófagos. Esses que são derivados de monócitos presentes na circulação sanguínea e estão presentes durante todo o processo de lesão e reparo e/ou regeneração. Possuem importante papel de acordo com o fenótipo predominante e os produtos por eles secretados no microambiente da lesão<sup>53,54</sup>.

Em resposta a lesão muscular, as distintas populações de macrófagos possuem ações e secretam produtos de caráter pró-inflamatório e anti-inflamatório, populações que são denominados fenótipos M1 e M2, respectivamente, associados as fases do processo de regeneração muscular<sup>5,37,41</sup>. É importante ressaltar que os fenótipos não são expressos isoladamente. Os macrófagos são encontrados em seus diferentes estados de ativação em qualquer momento avaliado após a lesão, mas que apresentam predominância de uma ou outra população e podem ser avaliados através de marcadores de superfície celular associados aos perfis M1 e M2<sup>5</sup>.

Em resposta a lesão aguda, os macrófagos de perfil M1 são recrutados e os produtos por eles secretados auxiliam na ativação, proliferação e migração das células satélites musculares. Em modelo *in vitro* a ativação para esse perfil, conhecida como ativação clássica, pode ser induzida através da adição as células de LPS e INF- $\gamma$ , promovendo a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF- $\alpha$ ) e espécies reativas de oxigênio e intermediários de nitrogênio<sup>41,15,31,53</sup>.

Os macrófagos participam na amplificação do processo inflamatório nos períodos após a lesão e também são capazes de atenuar a exacerbação desse

processo, a fim de evitar danos ao tecido. Ou seja, podem ter efeitos benéficos ou deletérios dependendo do contexto<sup>15</sup>.

Foi demonstrado que a ausência de macrófagos no ambiente de lesão e regeneração muscular, causa a redução da expressão de fatores regulatórios miogênicos (miogenina e MyoD), assim como o aumento da expressão de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, incluindo IL1- $\beta$ , TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$  e RANTES, durante as fases tardias da regeneração muscular<sup>55</sup>.

A transição tardia e prolongada do fenótipo predominante dos macrófagos M1 presentes no tecido muscular após a lesão, como a persistência da presença de citocinas inflamatórias, prejudicam o processo de regeneração. Assim, sendo essencial a adequada mudança na prevalência desse perfil pró-inflamatório para um cenário que induz a fase regenerativa<sup>56</sup>. Dentre as formas terapêuticas para o tratamento de lesões musculares e do envolvimento do processo inflamatório na fase aguda, a FBM têm evidenciado efeitos em diversos tipos celulares, se tratando de avaliações *in vitro*<sup>27,28,33,36,37,57,58</sup>.

O presente estudo, procurou mimetizar esse tema, por meio de avaliações *in vitro*, o efeito da FBM (780 nm) sobre células satélites musculares C2C12 em suas fases de proliferação e diferenciação, quando são cultivadas em meio aos produtos (meio condicionado) de macrófagos J774 ativados para perfil M1 irradiados com os mesmos parâmetros dosimétricos. Buscou-se avaliar a viabilidade, proliferação, índice de fusão (diferenciação) e morfologia celular, assim como a síntese de NO e das citocinas IL-6 e TNF- $\alpha$ .

Devido a ampla variedade da escolha dos parâmetros dosimétricos (comprimento de onda, potência, irradiância, exposição irradiante, energia, entre outros), faz com que as publicações encontradas quando avaliados os efeitos da FBM sobre macrófagos, células satélites musculares e outros tipos celulares, apresentem efeitos diversos e por vezes antagônicos<sup>44,45</sup>. Assim, gerando complexidade nas escolhas paramétricas, quando o objetivo do estudo foi que ambas as linhagens celulares utilizadas fossem tratadas de forma semelhante, mimetizando a situação ocorrida *in vivo* quando a irradiação abrange o tecido muscular lesionado e os macrófagos presentes na fase aguda do processo inflamatório, porém neste contexto dando destaque aos macrófagos<sup>28,33,35</sup>.

Nos resultados do presente estudo, houve compatibilidade no padrão de comportamento das SC em seu estado proliferativo em meio a um microambiente constituído por macrófagos de caráter pró-inflamatório e seus produtos<sup>15,41,59</sup>. Após o cultivo de células satélites musculares em fase de proliferação em meio a diferentes concentrações dos produtos de macrófagos que foram ativados para perfil M1, foi observado o aumento da síntese de NO e das citocinas IL-6 e TNF- $\alpha$  (períodos de 24 e 48h). Não houve diferença estatística no índice de fusão desses grupos, podendo correlacionar o aumento das citocinas e a permanência das células mononucleadas.

Wu et al. (2003)<sup>59</sup> relataram que a polarização de macrófagos (LPS), de linhagem RAW-264.7, acarretou em alta produção de NO e síntese de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10. Assim como Fernandes et al. (2015)<sup>28</sup> relataram aumento na expressão de TNF- $\alpha$  e iNOS e na produção proteica de IL-6, COX-2 e TNF- $\alpha$  em culturas de macrófagos J774 ativados com LPS e IFN $\gamma$ .

Neste contexto, autores<sup>31</sup> demonstraram que o laser infravermelho (780 nm, 2mW/cm<sup>2</sup>, 2,2 J/cm<sup>2</sup>) foi capaz de reduzir a expressão gênica de IL-6 e outras citocinas de caráter inflamatório, quando macrófagos murinos RAW 264.7 foram polarizados em altas concentrações de LPS (1 $\mu$ g/mL), como utilizado no presente estudo. Isto também foi evidenciado em macrófagos peritoneais de camundongo ativados com IFN- $\gamma$  (20  $\mu$ g/mL) e LPS (10 ng/mL) e irradiados com laser 780 nm, uma vez que estes apresentaram menor produção de TNF- $\alpha$  em comparação aos macrófagos ativados e não irradiados<sup>32</sup>.

Fernandes *et al.* (2015)<sup>28</sup> relataram que o tratamento com FBM (780 nm) gerou diminuição da expressão gênica e produção de IL-6 e TNF- $\alpha$  e da expressão de iNOS por macrófagos J774 ativados com LPS e IFN $\gamma$ .

Em relação a viabilidade dos mioblastos C2C12 indiferenciados, foi possível observar no presente estudo que apresentaram redução (24 e 48h) quando cultivados em 30% meio condicionado ativado para perfil M1 e houve maior índice de fusão após 24h quando cultivadas em 50% (M1 MM). Após o tratamento com FBM, há o aumento da viabilidade das células cultivadas em 50% de meio condicionado de macrófagos M1 quando apenas a C2C12 foi

irradiada (24h), quando apenas os macrófagos foram irradiados (48h) e quando ambas as células foram irradiadas (48h).

Os resultados do efeito da FBM sobre a proliferação celular de mioblastos indiferenciados, mostraram que as culturas em que apenas a C2C12 foi irradiada houve redução na proliferação após 24h na condição 50% de meio condicionado M1 e aumento em ambas as concentrações (30 e 50%) após 48h de incubação. Os grupos em que apenas os macrófagos M1 foram irradiados e no que ambas as células foram irradiadas houve um aumento da proliferação quando cultivadas em 50% de meio condicionado após 48h, evidenciando o efeito benéfico do tratamento com FBM em ambos tipos celulares.

Já em relação a FBM envolvendo células C2C12, Monici *et al.* (2013)<sup>60</sup> utilizaram laser de modo pulsado no comprimento de onda infravermelho (808 e 905 nm) em mioblastos indiferenciados e não encontrou diferenças na viabilidade celular, porém apresentou redução da proliferação celular e aumento de MyoD e associações as mudanças na morfologia celular apresentando formação de estruturas relacionadas a miotubos e células apresentando dois ou mais núcleos. Ferreira *et al.* (2018)<sup>61</sup> também relataram que 6h após o tratamento com laser vermelho (660 nm, 20mW) demonstrou redução da migração e proliferação, porém sem afetar a viabilidade celular. Contudo nestes dois estudos citados as células foram avaliadas sem a presença de fatores produzidos por macrófagos.

Ferreira *et al.* (2009)<sup>35</sup> e Mesquita-Ferrari *et al.* (2011)<sup>36</sup> compararam os efeitos do laser 660 e 780 nm (em diferentes exposições irradiantes, entre elas, 17,5 J/cm<sup>2</sup> para 780 nm e 70mW – mesmos parâmetros utilizados neste estudo) em mioblastos C2C12 em meio de proliferação e sob deficiência nutricional. A FBM não apresentou diferenças sobre a viabilidade e proliferação celular após 24, 48 e 72h nestes contextos avaliados.

Já Mesquita-Ferrari *et al.* (2015)<sup>33</sup> observaram que a irradiação (780 nm, 10mW) possibilitou o aumento da atividade de CK (72h) e da viabilidade celular após 24, 48 e 72h de incubação de células C2C12 induzidas a diferenciação. A atividade de CK é uma análise direta dessa importante enzima marcadora do processo de diferenciação de células musculares.

As células C2C12 previamente induzidas a diferenciação apresentam redução da viabilidade celular apenas quando cultivadas em 30% de meio condicionado M1 e redução da proliferação quando cultivadas em 30% (24 e 48h) e 50% (48h). Houve redução do índice de fusão dessas células nessas situações, assim como a predominância das células mononucleadas. Há aumento da viabilidade e proliferação apenas quando recebem 30% de meio condicionado de macrófagos irradiados após 48h. Em um período de 48h de incubação, em ambas concentrações de meio condicionado de macrófagos M1 irradiados, as células C2C12 diferenciadas e tratadas com FBM apresentaram aumento da viabilidade e proliferação, evidenciando mais uma vez o efeito positivo do tratamento quanto feito concomitantemente sobre os dois tipos celulares.

Os mioblastos induzidos a diferenciação cultivados em meio condicionado de macrófagos M1, ambos sem intervenção da FBM, apresentam redução da proliferação celular e síntese de IL-6 e aumento da síntese de NO e TNF- $\alpha$  (apenas em 24h) quando avaliados em menor concentração de meio condicionado de macrófagos M1 (30%) e redução da proliferação celular (48h), aumento da síntese de NO (24h), IL-6 e TNF- $\alpha$  quando cultivados em maior concentração de meio condicionado de macrófagos M1 (50%).

Um estudo prévio, avaliando fatores capazes de aumentar níveis da produção de citocinas pró-inflamatórias, demonstrou que ROS, incluindo o NO, estimulam a produção de IL-6 em células C2C12 diferenciadas<sup>62</sup>. Assim como, Chen et al. (2007)<sup>16</sup> observaram que mioblastos em fase proliferativa possuem expressão constitutiva de TNF- $\alpha$  e mioblastos durante as fases iniciais da diferenciação demonstram aumentar a expressão dessa citocina.

Os resultados presentes obtidos nesse estudo, evidenciaram que a FBM é capaz de reduzir a síntese de NO em ambas as situações avaliadas (proliferação e diferenciação), contudo sendo mais evidente em algumas condições mais específicas. Com relação aos mioblastos C2C12 indiferenciados houve uma redução quando um tipo celular ou ambos foram tratados com FBM, em todos os períodos avaliados. Já na situação de diferenciação, quando somente as células musculares foram tratadas e cultivadas em 30% (24h) e 50% (24 e 48h) de meio condicionado M1, apresentaram redução na síntese de NO.

Por outro lado, a irradiação apenas dos macrófagos M1 apresentou aumento de NO após 24h de incubação em ambas as concentrações de meio condicionado. E quando ambas as linhagens celulares foram tratadas, após 48h, o grupo em menor concentração (30%) apresentou redução da síntese de NO.

O tratamento apresentou claramente uma redução das citocinas inflamatórias e do NO condizente com os estudos de Fernandes et al. (2015)<sup>28</sup> e Silva et al. (2016)<sup>63</sup> que evidenciaram os efeitos da FBM em macrófagos na modulação de citocinas inflamatórias e síntese de NO.

Estudo avaliando a citotoxicidade através do co-cultivo de células musculares e macrófagos ativados para perfil M1, demonstraram que o aumento da produção de NO, gerados através dos macrófagos ativados, resultam na lise celular de miotubos em fase de diferenciação através do aumento da atividade de iNOS. Porém, baixos níveis da produção de NO possuem efeito citoprotetor, demonstrando que o NO possui efeitos dose-dependente sobre células musculares<sup>57</sup>. Dessa forma os resultados obtidos neste estudo são desejáveis para um processo de reparo mais efetivo.

Gavish et al. (2008)<sup>31</sup> verificou que o tratamento com laser (780nm) causou o aumento da produção de NO de macrófagos murinos RAW 264.7 ativados com LPS. Esse estudo correlaciona o efeito da FBM diretamente com a concentração de LPS que os macrófagos foram polarizados, ou seja, que o tratamento com laser e seus efeitos modulatórios são diretamente proporcionais a intensidade do processo inflamatório que a lesão pode acometer um tecido. Estes autores demonstraram que há maiores efeitos inibitórios causados pela FBM durante a intensa resposta inflamatória e que os efeitos podem ser mínimos ou não observados em situações de homeostasia.

Os mioblastos C2C12 indiferenciados, apresentaram redução de IL-6 quando apenas a C2C12 foi tratada com FBM após 24 e 48h (30% M1 MM) e 48h (50% M1 MM). O único grupo (24h em 50% M1 MM) que não apresentou redução de IL-6, apresentou nesse mesmo período menor índice de fusão, com predominância de células mononucleadas. Nas culturas que apenas os macrófagos M1 foram irradiados houve redução de IL-6 e TNF- $\alpha$  (somente em 48h) em ambas as concentrações de meio condicionado. As citocinas avaliadas,

após o tratamento das células J774 M1 e C2C12 com os mesmos parâmetros, apresentaram redução de IL-6 e TNF- $\alpha$  (somente após 48h) quando cultivados em 30% de meio condicionado M1 irradiado e quando cultivados em 50%. apresentaram redução de IL-6 (48h) e aumento de TNF- $\alpha$  (24h).

Com relação a produção proteica das citocinas de células C2C12 previamente induzidas a diferenciação, a FBM gerou aumento da síntese de IL-6 quando foram cultivadas em menor e maior concentração de meio condicionado M1 não irradiado e redução apenas em 50% de meio condicionado M1 irradiado (maior concentração) após 48h de cultivo. Quando os macrófagos M1 foram irradiados, o meio condicionado destes em menor concentração (30%) sobre C2C12 induzidas a diferenciação tratadas e não tratadas com FBM gerou um aumento da síntese de IL-6 (24 e 48h).

O efeito da irradiação sobre a síntese de TNF- $\alpha$ , das células C2C12 induzidas a diferenciação, foi apenas observado quando ambas as linhagens celulares foram tratadas com FBM e cultivadas durante 48h em menor e maior concentração do meio condicionado M1 irradiado.

Assim, neste estudo o aumento dos níveis de produção de NO e das citocinas avaliadas também evidenciam o predomínio de mioblastos mononucleados e no que se refere ao índice de fusão não apresentou diferença estatística. Nesse sentido, de acordo com a literatura, a presença dos produtos dos macrófagos desse fenótipo pode ter mantido as células precursoras miogênicas em estado de proliferação, prevenindo sua diferenciação prematura<sup>41</sup>.

Durante a fase aguda do processo inflamatório, as citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 e IL-8, produzidas nessa fase, se ligam a receptores de membrana e ativam enzimas responsáveis pela produção de ROS, amplificando a síntese de seus intermediários<sup>14</sup>.

Quando comparados os mioblastos indiferenciados e induzidos a diferenciação cultivados em seus meios respectivos (controle), pode ser observado acentuado aumento da síntese de IL-6 em células diferenciadas. Estudo avaliando a expressão e produção de IL-6, utilizando um modelo de *in vitro* de contração com estimulador de pulso elétrico, em células C2C12 em suas

diferentes fases, demonstraram que a síntese dessa citocina não pode nem ao menos ser detectada em culturas de mioblastos indiferenciados do grupo controle, porém foi mais expressa quando quantificada em culturas de células C2C12 induzidas a diferenciação<sup>64</sup>.

Analisando conjuntamente a índice de fusão, assim como a descrição inferencial da distribuição de núcleos, os grupos apresentaram maior ou menor fusão de núcleos celulares de acordo com a presença das citocinas avaliadas. Foi possível identificar um padrão de fusão inversamente proporcional, no cultivo de ambas as concentrações, relacionando a síntese de IL-6 por mioblastos indiferenciados e a síntese de TNF- $\alpha$  por mioblastos induzidos a diferenciação. Os grupos de mioblastos indiferenciados apresentaram maior índice de fusão quando apresentaram menor síntese de IL-6, assim como os grupos de mioblastos induzidos a diferenciação apresentaram maior índice de diferenciação quando haviam menor síntese de TNF- $\alpha$ .

Saclier *et al.* (2013)<sup>41</sup> relataram que o bloqueio de IL-6 em meio condicionado de macrófagos M1, tal como baixas concentrações de TNF- $\alpha$  sobre células precursoras miogênicas humanas, induzem o aumento da formação de miotubos. Apresentando redução no índice de fusão de mioblastos e inibiu a formação de grandes miotubos (>10 núcleos). Estudos também demonstraram que a adição de TNF- $\alpha$  exógeno causa efeito inibitório durante as fases de diferenciação de mioblastos<sup>31</sup>.

Alguns resultados deste estudo mostraram diferenças em relação as descrições na literatura, devido aos efeitos da FBM serem encontradas em cada linhagem celular, nas características descritas, de forma isolada. Não há estudos, até o momento, que avaliem o efeito da FBM (780 nm) em células satélites musculares cultivadas em meio condicionado de macrófagos ativadas para perfil M1 também submetidas a irradiação com os mesmos parâmetros. Estudos ressaltam que há variação nos efeitos de sobrenadantes de culturas macrófagos sobre mioblastos e que estes não possuem capacidade de mimetizar totalmente o ocorrido *in vivo*, sendo que os resultados dependem do perfil de ativação dos macrófagos utilizados, bem como sua origem (linhagem ou cultura primária), e ainda da presença de soro no meio de cultivo<sup>5,41,48</sup>. Contudo,

esta análise nos traz informações importantes sobre um panorama que seria o mais próximo do desejável.

Assim, o conjunto de resultados desta dissertação permite inferir que o tratamento com FBM (780 nm) pode gerar efeitos positivos em células satélites musculares em suas diferentes fases, quando cultivadas em meio a diferentes concentrações de produtos de macrófagos de perfil pró-inflamatório (M1) também submetidos a irradiação nos mesmos parâmetros, no que se refere a redução de NO e citocinas inflamatórias e no favorecimento do processo de diferenciação das células musculares (índice de fusão).

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo avaliou os efeitos da fotobiomodulação sobre células satélites musculares em seus estados de proliferação e diferenciação, cultivadas em diferentes concentrações de produtos secretados por macrófagos ativados para perfil pró-inflamatório, que também foram irradiados com os mesmos parâmetros dosimétricos. O tratamento com a fotobiomodulação foi capaz surtir efeitos na viabilidade e proliferação celular, propiciar o processo de diferenciação das células satélites musculares, além de promover a redução da síntese de NO e de citocinas de caráter inflamatório envolvidas no processo inflamatório agudo.

Como o processo de regeneração muscular é dividido em diferentes fases e há concomitante mudança do fenótipo dos macrófagos envolvidos durante esse processo, o estudo futuro de outros aspectos envolvendo marcação das células satélites com imunofluorescência, expressão gênica de citocinas inflamatórias, anti-inflamatórias e de enzimas envolvidas na síntese de espécies reativas de oxigênio, expressão de fatores regulatórios miogênicos, assim como a marcação da superfície de macrófagos para a determinação do fenótipo prevalente, entre outros, tornam-se essenciais para o entendimento desse processo.

Neste contexto, os dados desse estudo são relevantes para que estudos posteriores possam oferecer melhor entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos no efeito da fotobiomodulação, *in vitro*, sobre células satélites musculares em um microambiente de lesão aguda proporcionado por macrófagos também submetidos a irradiação.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Filippin LI, Moreira AJ, Marroni NP, Xavier RM. Nitric oxide and repair of skeletal muscle injury. *Nitric Oxide - Biol Chem* [Internet]. 2009;21(3–4):157–63. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.niox.2009.08.002>
2. Uezumi A, Ikemoto-Uezumi M, Tsuchida K. Roles of nonmyogenic mesenchymal progenitors in pathogenesis and regeneration of skeletal muscle. *Front Physiol*. 2014;5 FEB(February):1–11.
3. Fukada SI, Ma Y, Ohtani T, Watanabe Y, Murakami S, Yamaguchi M. Isolation, characterization, and molecular regulation of muscle stem cells. *Front Physiol*. 2013;4 NOV(November):1–16.
4. Tedesco FS, Dellavalle A, Diaz-manera J, Messina G, Cossu G. Repairing skeletal muscle: regenerative potential ... [J Clin Invest. 2010] - PubMed result. 2010;120(1). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20051632%5Cnpapers3://publication/uuid/906207AB-C2A8-490C-9F9D-8C97F7ED6944>
5. Tidball JG. Regulation of muscle growth and regeneration by the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2017;17(3):165–78.
6. Sprague AH, Khalil RA. NIH Public Access. *Vasc Surg*. 2010;78(6):539–52.
7. Muñoz-Cánoves P, Scheele C, Pedersen BK, Serrano AL. Interleukin-6 myokine signaling in skeletal muscle: A double-edged sword? *FEBS J*. 2013;280(17):4131–48.
8. Chazaud B, Sonnet C, Lafuste P, Bassez G, Rimaniol AC, Poron F, et al. Satellite cells attract monocytes and use macrophages as a support to escape apoptosis and enhance muscle growth. *J Cell Biol*. 2003;163(5):1133–43.
9. Italiani P, Boraschi D. From monocytes to M1/M2 macrophages: Phenotypical vs. functional differentiation. *Front Immunol*. 2014;5(OCT):1–22.
10. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep* [Internet]. 2014;6(March):1–13. Available at: <http://www.f1000.com/prime/reports/b/6/13>

11. Patsalos A, Pap A, Varga T, Trencsenyi G, Contreras GA, Garai I, et al. In situ macrophage phenotypic transition is affected by altered cellular composition prior to acute sterile muscle injury. *J Physiol*. 2017;595(17):5815–42.
12. Kroner A, Greenhalgh AD, Zarruk JG, PassosdosSantos R, Gaestel M, David S. TNF and Increased Intracellular Iron Alter Macrophage Polarization to a Detrimental M1 Phenotype in the Injured Spinal Cord. *Neuron* [Internet]. 2014;83(5):1098–116. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2014.07.027>
13. Tseng W, Su C. FAK Activation Is Required for TNF- $\alpha$ -Induced IL-6 Production in Myoblasts. *J Cell Physiol*. 2010;223(91):389–96.
14. Barbieri E, Sestili P. Reactive Oxygen Species in Skeletal Muscle Signaling. *J Signal Transduct* [Internet]. 2012;2012:1–17. Available at: <http://www.hindawi.com/journals/jst/2012/982794/>
15. Arnold L, Henry A, Poron F, Baba-Amer Y, Rooijen N van, Gherardi APRK, et al. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into anti-inflammatory macrophages to support myogenesis. *J Exp Med* [Internet]. 2007;204(5):1057–69. Available at: <http://arxiv.org/abs/1805.00237>
16. Chen S-E, Jin B, Li Y-P. TNF- $\alpha$  regulates myogenesis and muscle regeneration by activating p38 MAPK. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007;292(5):1660–71.
17. Stamler JS, Meissner G. Physiology of Nitric Oxide in Skeletal Muscle. *Physiol Rev* [Internet]. 2001;81(1):209–37. Available at: <http://www.physiology.org/doi/10.1152/physrev.2001.81.1.209>
18. Pilon G, Dallaire P, Marette A. Inhibition of inducible nitric-oxide synthase by activators of AMP-activated protein kinase: A new mechanism of action of insulin-sensitizing drugs. *J Biol Chem*. 2004;279(20):20767–74.
19. Ji LL, Gomez-Cabrera MC, Vina J. Exercise and hormesis: Activation of cellular antioxidant signaling pathway. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1067(1):425–35.
20. De Palma C, Clementi E. Nitric oxide in myogenesis and therapeutic muscle repair. *Mol Neurobiol*. 2012;46(3):682–92.
21. Soltow QA, Lira VA, Betters JL, Long JHD, Sellman JE, Zeanah EH, et al.

- Nitric oxide regulates stretch-induced proliferation in C2C12 myoblasts. *J Muscle Res Cell Motil.* 2010;31(3):215–25.
22. Lee M-H, Jang M-H, Kim E-K, Han S-W, Cho S-Y, Kim C-J. Nitric oxide induces apoptosis in mouse C2C12 myoblast cells. *J Pharmacol Sci.* 2005;97(3):369–76.
  23. Shin EH, Caterson EJ, Jackson WM, Nesti LJ. Quality of healing: defining, quantifying, and enhancing skeletal muscle healing. *Wound Repair Regen.* 2014;22:18–24.
  24. Karu TI. Cellular and Molecular Mechanisms of Photobiomodulation (Low-Power Laser Therapy). *IEEE J Sel Top Quantum Electron.* 2014;20(2):143–8.
  25. de Freitas LF, Hamblin MR. Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy. 2016;22(3):348–64.
  26. Kreslavski VD, Fomina IR, Los DA, Carpentier R, Kuznetsov V V., Allakhverdiev SI. Red and near infra-red signaling: Hypothesis and perspectives. *J Photochem Photobiol C Photochem Rev [Internet].* 2012;13(3):190–203. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2012.01.002>
  27. Souza NHC, Mesquita-Ferrari RA, Silva DFT, Nunes FD, Bussadori SK, Fernandes KPS. Effect of low-level laser therapy on the modulation of the mitochondrial activity of macrophages\rEfeito da laserterapia em baixa intensidade na modulação da atividade mitocondrial de macrófagos. *Braz J Phys Ther [Internet].* 2014;18(4):308–14. Available at: [/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=&lang=pt](/scielo.php?script=sci_arttext&pid=&lang=pt)
  28. Fernandes KPS, Souza NHC, Mesquita-Ferrari RA, Silva DDFT, Rocha LA, Alves AN, et al. Photobiomodulation with 660-nm and 780-nm laser on activated J774 macrophage-like cells: Effect on M1 inflammatory markers. *J Photochem Photobiol B Biol.* 2015;153:344–51.
  29. Sousa KDB. Efeito do laser em baixa intensidade sobre a expressão gênica e proteica de mediadores de macrófagos J774 induzidos a diferenciação. Universidade Nove de Julho. 2016.
  30. Souza NHC. Comparação do efeito do laser em baixa intensidade (660 e 780 nm) sobre a polarização de macrófagos e a modulação da expressão e síntese de citocinas envolvidas no reparo muscular. 2016. p. [tese].

31. Gavish L, Perez LS, Reissman P, Gertz SD. Irradiation with 780 nm diode laser attenuates inflammatory cytokines while upregulating nitric oxide in LPS-stimulated macrophages: Implications for the prevention of aneurysm progression. *Lect Notes Electr Eng.* 2008;12 LNEE(March):53–7.
32. Sousa LR, Cavalcanti BN, Marques MM. Effect of Laser Phototherapy on the Release of TNF-  $\alpha$  and MMP-1 by Endodontic Sealer–Stimulated Macrophages. *Photomed Laser Surg* [Internet]. 2009;27(1):37–42. Available at: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/pho.2007.2220>
33. Mesquita-Ferrari RA, Alves AN, de Oliveira Cardoso V, Artilheiro PP, Bussadori SK, Rocha LA, et al. Low-level laser irradiation modulates cell viability and creatine kinase activity in C2C12 muscle cells during the differentiation process. *Lasers Med Sci.* 2015;30(8):2209–13.
34. Amaral AC. Influência da terapia laser de baixa intensidade em células precursoras miogênicas (in vitro) e durante a regeneração muscular (in vivo). São Carlos; 2004. p. 122 f.
35. Ferreira MPP, Ferrari RAM, Gravalos ED, Martins MD, Bussadori SK, Gonzalez DAB, et al. Effect of Low-Energy Gallium-Aluminum-Arsenide and Aluminium Gallium Indium Phosphide Laser Irradiation on the Viability of C2C12 Myoblasts in a Muscle Injury Model. *Photomed Laser Surg* [Internet]. 2009;27(6):901–6. Available at: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/pho.2008.2427>
36. Mesquita-Ferrari RA, Ribeiro R, Souza NHC, Silva CAA, Martins MD, Bussadori SK, et al. No effect of low-level lasers on in vitro myoblast culture. *Indian J Exp Biol.* 2011;49(6):423–8.
37. Nguyen LMD, Malamo AG, Larkin-Kaiser KA, Borsa PA, Adihetty PJ. Effect of near-infrared light exposure on mitochondrial signaling in C2C12 muscle cells. *Elsevier BV Mitochondria Res Soc* [Internet]. 2014;14(1):42–8. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mito.2013.11.001>
38. R Hamblin M. Mechanisms and applications of the anti-inflammatory effects of photobiomodulation. *AIMS Biophys* [Internet]. 2017;4(3):337–61. Available at: <http://www.aimspress.com/article/10.3934/biophy.2017.3.337>

39. Alves AN, Ribeiro BG, Fernandes KPS, Souza NHC, Rocha LA, Nunes FD, et al. Comparative effects of low-level laser therapy pre- and post-injury on mRNA expression of MyoD, myogenin, and IL-6 during the skeletal muscle repair. *Lasers Med Sci.* 2016;31(4):679–85.
40. Ribeiro BG, Alves AN, Dos Santos LAD, Cantero TM, Fernandes KPS, Dias D da S, et al. Red and Infrared Low-Level Laser Therapy Prior to Injury with or without Administration after Injury Modulate Oxidative Stress during the Muscle Repair Process. *PLoS One.* 2016;11(4):e0153618.
41. Saclier M, Yacoub-Youssef H, Mackey AL, Arnold L, Ardjoune H, Magnan M, et al. Differentially activated macrophages orchestrate myogenic precursor cell fate during human skeletal muscle regeneration. *Stem Cells.* 2013;31(2):384–96.
42. Sicari BM, Dziki JL, Siu BF, Medberry CJ, Dearth CL, Badylak SF. Biomaterials The promotion of a constructive macrophage phenotype by solubilized extracellular matrix. *Biomaterials [Internet].* 2014;35(30):8605–12. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.06.060>
43. Kravchenko I V, Furaev VA, Member C, Popov RASVO. The Influence of Myofibrils on the Proliferation and Differentiation of Myoblasts Cocultured with Macrophages. 2018;479(2):72–6.
44. Peplow P V., Chung T-Y, Ryan B, Baxter GD. Laser Photobiomodulation of Gene Expression and Release of Growth Factors and Cytokines from Cells in Culture : A Review of Human and Animal Studies. *Photomed Laser Surg.* 2011;29(5):285–304.
45. Mantineo M, Pinheiro JP, Morgado AM. Low-level laser therapy on skeletal muscle inflammation: evaluation of irradiation parameters. *J Biomed Opt [Internet].* 2014;19(9):098002. Available at: <http://biomedicaloptics.spiedigitallibrary.org/article.aspx?doi=10.1117/1.JBO.19.9.098002>
46. Souza NHC, Mesquita-Ferrari RA, Rodrigues MFSD, da Silva DFT, Ribeiro BG, Alves AN, et al. Photobiomodulation and different macrophages phenotypes during muscle tissue repair. *J Cell Mol Med.* 2018;(March):1–13.
47. Andreo L, Mesquita-ferrari RA, Ribeiro ãBG, Benitte A. Effects of Myogenic Precursor Cells ( C2C12 ) Transplantation and Low-Level Laser

- Therapy on Muscle Repair. *Lasers Surg Med*. 2018;50(7):781–91.
48. Cantini M, Giurisato E, Radu C, Tiozzo S, Pampinella F, Senigaglia D, et al. Macrophage-secreted myogenic factors: A promising tool for greatly enhancing the proliferative capacity of myoblasts in vitro and in vivo. *Neurol Sci*. 2002;23(4):189–94.
  49. Bai X, Wang XL, Tang B, Shi HN, Boireau P, Rosenthal B, et al. The roles of supernatant of macrophage treated by excretory-secretory products from muscle larvae of *Trichinella spiralis* on the differentiation of C2C12 myoblasts. *Vet Parasitol*. 2016;231:83–91.
  50. Veliça P, Bunce CM. A QUICK , SIMPLE AND UNBIASED METHOD TO QUANTIFY C2C12 MYOGENIC DIFFERENTIATION. 2011;(September):366–70.
  51. Pansters NAM, Velden JLJ van der, Kelders MCJM, Laeremans H, Schols AMWJ, Langen RCJ. Segregation of myoblast fusion and muscle-specific gene expression by distinct ligand-dependent inactivation of GSK-3 b. *Cell Mol Life Sci*. 2011;523–35.
  52. Ono Y, Sakamoto K. Lipopolysaccharide inhibits myogenic differentiation of C2C12 myoblasts through the Toll-like receptor 4-nuclear factor-  $\kappa$  B signaling pathway and myoblast-derived tumor necrosis factor-  $\alpha$ . *PLoS One*. 2017;12.
  53. Chazaud B. Macrophages: Supportive cells for tissue repair and regeneration. *Immunobiology* [Internet]. 2013;219(3):172–8. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2013.09.001>
  54. Dziki JL, Velayutham M, Hussey GS, Turnquist HR. Cytokine networks in immune-mediated muscle regeneration. *J Immunol Regen Med* [Internet]. 2018;1:32–44. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2468498817300215>
  55. Liu X, Liu Y, Zhao L, Zeng Z, Xiao W, Chen P. Macrophage depletion impairs skeletal muscle regeneration: The roles of regulatory factors for muscle regeneration. *Cell Biol Int J*. 2017;41(CI):228–38.
  56. Wosczyzna MN, Rando TA. A Muscle Stem Cell Support Group: Coordinated Cellular Responses in Muscle Regeneration. *Dev Cell* [Internet]. 2018;46(2):135–43. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.06.018>

57. Nguyen HX, Tidball JG. Interactions between neutrophils and macrophages promote macrophage killing of rat muscle cells in vitro. *J Physiol*. 2003;547(1):125–32.
58. Ferraresi C, Kaippert B, Avci P, Huang Y, Victor M, Sousa P De, et al. Low-level laser (light) therapy increases mitochondrial membrane potential and ATP synthesis in C2C12 myotubes with a peak response at 3-6 hours. *Photochem Photobiol*. 2016;91(2):411–6.
59. Wu C, Chen T, Chen T, Ho W, Chiu W, Chen R. Nitric Oxide Modulates Pro- and Anti-inflammatory Cytokines in Lipopolysaccharide-Activated Macrophages. 2003;(September):15–7.
60. Monici M, Cialdai F, Ranaldi F, Paoli P, Boscaro F, Moneti G, et al. Effect of IR laser on myoblasts: A proteomic study. *Mol Biosyst*. 2013;9(6):1147–61.
61. Ferreira JH, Cury SS, Vechetti-Júnior IJ, Fernandez GJ, Moraes LN, Alves CAB, et al. Low-level laser irradiation induces a transcriptional myotube-like profile in C2C12 myoblasts. *Lasers Med Sci*. 2018;33(8):1673–83.
62. Kosmidou I, Vassilakopoulos T, Xagorari A, Zakynthinos S, Papapetropoulos A, Roussos C. Production of Interleukin-6 by Skeletal Myotubes. *Am J Respir Cell Mol Biol* [Internet]. 2002;26(5):587–93. Available at: <http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1165/ajrcmb.26.5.4598>
63. Silva IHM, de Andrade SC, de Faria ABS, Fonsêca DDD, Gueiros LAM, Carvalho AAT, et al. Increase in the nitric oxide release without changes in cell viability of macrophages after laser therapy with 660 and 808 nm lasers. *Lasers Med Sci* [Internet]. 2016;31(9):1855–62. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/s10103-016-2061-1>
64. Farmawati A, Kitajima Y, Nedachi T, Sato M, Kanzaki M. Characterization of contraction-induced IL-6 up-regulation using contractile C2C12 myotubes. *Endocr J*. 2013;60(2):137–47.