



**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO**  
**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM MEDICINA**

**LUIS FERNANDO ZAMUNER**

**Análise do Efeito do Laser de Baixa Intensidade e da  
Magnetoterapia em Células Musculares**

**São Paulo**

**2020**



**LUIS FERNANDO ZAMUNER**

**Análise do Efeito do Laser de Baixa Intensidade e da  
Magnetoterapia em Células Musculares**

Tese apresentada à Universidade Nove de Julho, para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de pós-graduação em Medicina.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cristina Chavantes

Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo de Paula Alves Silva

**São Paulo**

**2020**

Zamuner, Luis Fernando.

Análise do efeito do laser de baixa intensidade e da magnetoterapia em células musculares. / Luis Fernando Zamuner. 2020.

72 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2020.

Orientador (a): Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Cristina Chavantes.

1. Células musculares. 2. Laser de baixa intensidade. 3. Magnetoterapia. 4. Migração celular. 5. Regeneração celular.

I. Chavantes, Maria Cristina. II. Título.

CDU 616



São Paulo 30 de abril de 2020

**TERMO DE APROVAÇÃO**

Aluno: LUIS FERNANDO ZAMUNER

Título da tese: ANÁLISE DO EFEITO DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE E DA MAGNETOTERAPIA EM CÉLULAS MUSCULARES: ESTUDO PILOTO

Presidente: PROFA. DRA. MARIA CRISTINA CHAVANTES

Membro: PROFA. DRA. MARÍLIA DE ALMEIDA CORREIA

Membro: PROF. DR. JOSÉ ANTÔNIO SILVA JÚNIOR

Membro: PROFA. DRA. ELISABETH MATEUS YOSHIMURA

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus, por me dar saúde e determinação para completar meu caminho.

Minha esposa e filhos, que me impulsionam a continuar e passar pelos mais difíceis desafios;

As minhas irmãs, Stella e Silvia, sempre uma inspiração para mim, por sua determinação e excelência em tudo que fazem;

Minha orientadora Profa. Dra. Maria Cristina Chavantes, por ter me aceito como aluno, pela paciência, pelos ensinamentos e pelo exemplo de competência;

Meu Co-Orientador, Professor Marcelo de Paula Alves Silva, pela amizade e ensinamentos;

Todos os professores que contribuíram de alguma forma para que eu pudesse concluir mais essa etapa;

Ao Prof. Ezir Yoshimura (Neospin), que desenvolveu o aparelho de magnetoterapia e nos cedeu, para que utilizássemos em nossos experimentos;

Todos os técnicos dos laboratórios, que ajudaram com experimentos e análises;

Aos alunos do programa de Mestrado e Doutorado, companheiros de estudos e pesquisas;

A grande amiga Luciana Miato, que com seu vasto conhecimento em análises laboratoriais, me ensinou e ajudou a tornar possível os resultados deste trabalho.

## SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO .....	1
1.1 Regeneração do musculo esquelético .....	1
1.2 Processo de divisão celular.....	5
1.3 Fatores reguladores da regeneração muscular.....	7
1.4 Laser de baixa intensidade .....	8
1.5 Magnetoterapia .....	11
2.OBJETIVOS.....	14
2.1 Objetivo geral .....	14
2.2 Objetivos específicos .....	14
3.MATERIAL E MÉTODOS .....	15
3.1 Células musculares C <sub>2</sub> C <sub>12</sub> .....	15
3.2 Cultivo Celular .....	15
3.3Terapia laser de baixa intensidade .....	16
3.4 Magnetoterapia .....	18
3.5 Reparo tecidual com colágeno .....	19
3.6 Métodos colorimétricos para determinação de viabilidade celular.....	19
3.6.1 Viabilidade por MTT.....	20
3.6.2 Descolamento celular .....	20
3.7 Ensaio de ELISA .....	21
3.8 Ensaio de Western blot .....	21
3.9 Ensaio de teor de cálcio intracelular .....	22
3.10 Ensaio para potencial de membrana .....	23
3.11 Análise estatística .....	23

4. RESULTADOS .....	24
5. DISCUSSÃO .....	45
6. CONCLUSÕES.....	52
7. CONSIDERAÇÕES FUTURAS .....	53
REFERÊNCIAS .....	54

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosine trifosfato
C	Controle
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HE	Hematoxilina e Eosina
Hz	Hertz
J	Joule
Kda	kilo Dalton
LASER	<i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i>
LBI	Laser de baixa intensidade
LPS	Lipopolissacarídeo
MAG	Magnetoterapia
mmHg	Milímetro de mercúrio
mW	mili Watt
nM	Nanometro
NO	Óxido nítrico
MN	Migração natural
ROS	Espécies reativas de oxigênio
W	Watt

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da ação do LBI na permeabilidade da membrana celular ( <i>cellmembrane</i> ) com ação na cadeia respiratória ( <i>respiratorychain</i> ) da mitocôndria ( <i>mitochondrial</i> ), em específico no citocromo C oxidase ( <i>cytc oxidase</i> ) e liberação de adenosina trifosfato (ATP), óxido nítrico (NO), espécies reativas de oxigênio (ROS) e sinalização no núcleo celular. Sinalização redox ( <i>redox sinaling</i> ). Transcrição ( <i>transcription</i> ). Núcleo ( <i>nucleus</i> ). Quantun de energia (hv,600~900nm), Estraido de YNG-YNG HUANG, 2011.....	11
Figura 2. Espectro eletromagnético apresentando as regiões de radiações ionizantes e não ionizantes. ....	13
Figura 3. Aparelho de Laser de Baixa Intensidade.....	17
Figura 4. Aparelho de Magneto .....	18
Figura 5. Efeito do LBI e MAG na viabilidade celular de células C <sub>2</sub> C <sub>12</sub> de passagem nova (p6) e antiga (p76).....	24
Figura 6. Efeito do LBI e MAG no descolamento celular em amostras de células C <sub>2</sub> C <sub>12</sub> de passagem nova (p6)e antiga (p76).....	25
Figura 7.Efeito do LBI e MAG na migração de células C <sub>2</sub> C <sub>12</sub> de passagem nova ..	28
Figura 8.Efeito do LBI e MAG na migração de células C <sub>2</sub> C <sub>12</sub> de passagem antiga..	31
Figura 9. Efeito do LBI e MAG na expressão de proteínas envolvidas nas vias de diferenciação e regeneração em células C <sub>2</sub> C <sub>12</sub> de passagem nova (p6) e antiga (p76) .....	32,33
Figura 10. Efeito do LBI e MAG na concentração de cálcio intracelular causada pelo uso de LPS em células C <sub>2</sub> C <sub>12</sub> de passagem nova (p6)..	35
Figura 11. Efeito do LBI e MAG na concentração de cálcio intracelular causada pelo uso de LPS em células C <sub>2</sub> C <sub>12</sub> de passagem antiga (p76)..	36
Figura 12. Efeito do LBI e da MAG na concentração do potencial de membrana de mioblastos causada pelo uso de LPS em células C <sub>2</sub> C <sub>12</sub> de passagem nova (p6).....	37
Figura 13. Efeito do LBI e MAG na concentração do potencial de membrana de mioblastos causada pelo uso de LPS em células C <sub>2</sub> C <sub>12</sub> de passagem antiga (p76).....	38

Figura 14. Avaliação da liberação do mediador IL-1 $\beta$ em células C <sub>2</sub> C <sub>12</sub> de passagem nova (p6) e passagem antiga (p76).. .....	39
Figura 15. Avaliação da liberação do mediador IL-6 em células C <sub>2</sub> C <sub>12</sub> de passagem nova (p6) e passagem antiga (p76).. .....	40
Figura 16. Avaliação da liberação do mediador TNF- $\alpha$ em células C <sub>2</sub> C <sub>12</sub> de passagem nova (p6) e passagem antiga (p76). .....	41
Figura 17. Avaliação da liberação do mediador IL-10 em células C <sub>2</sub> C <sub>12</sub> de passagem nova (p6) e passagem antiga (p76). .....	42
Figura 18. Efeito do LBI e MAG na expressão de proteínas envolvidas na fase de inflamação em células C <sub>2</sub> C <sub>12</sub> de passagem nova (p6) e antiga (p76). .....	43,44

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Parâmetros dosimétricos do LBI.....	17
---	----

## RESUMO

Este estudo tem o objetivo de compreender e comparar os efeitos do Laser de Baixa Intensidade (LBI) e da Magnetoterapia (MAG) em células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> de passagem nova (representando células com 6 passagens) e antiga (representando células com 76 passagens). Para o estudo, foi realizado o cultivo de células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>, com o monitoramento do crescimento celular realizado a cada 24 h. Foi utilizado o LBI no comprimento de onda 660 nm. Neste estudo empregamos um novo instrumento, o aparelho magneto, que induz um campo magnético oscilante, com frequência de 12 Hz. Foram analisados os efeitos do LBI e MAG na viabilidade e integridade celular, além da migração das células por lesão mecânica. Ainda, foi analisado a liberação de citocinas pró e anti-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-10), após a incubação das células com LPS, por ensaio imunoenzimático. Foi analisado a expressão de proteínas Myf-5, Pax7, MyoD, miogenina, caspase-3, p38 MAPK e NF $\kappa$ -B através do método de *western blot*. Foi mensurada a concentração de cálcio intracelular e a concentração do potencial de membrana nas células. Os resultados demonstraram aumento da migração, viabilidade celular e integridade pelos dois métodos de tratamento utilizados. A expressão de todos os fatores miogênicos avaliados teve elevação significativa tanto com o LBI quanto com a MAG. O grupo tratado com LBI foi eficaz nas duas situações de passagem, em relação aos outros grupos, quando avaliada a concentração de cálcio intracelular. A concentração do potencial de membrana teve resposta significativa com o LBI e MAG. O LBI, assim como a MAG, reduziram a liberação das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 nas células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>, no tempo estudado e nas duas passagens de células avaliadas. Também ocorreu incremento da liberação da citocina IL-10. Esses dados sugerem que ambos tratamentos melhoram o processo de migração e regeneração, facilitando a resposta miogênica, frente a terapia com aparelhos baseados em energia (LBI e MAG).

**Palavras-chave:** células musculares, laser de baixa intensidade, magnetoterapia, migração celular, regeneração celular.

## ABSTRACT

This study aims to understand and compare the effects of the low level laser therapy (LLLT) and magnetotherapy (MAG) on C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> cells of new passage (representing cells with 6 passages) and old (representing cells with 76 passages). For this study, C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> cells were cultured, with cell growth monitoring performed every 24 h. LLLT was used at a wavelength of 660 nm. In this study, it was employ new equipment, a magnet device, which induces an oscillating magnetic field, with 12 Hz rate. The effects of LLLT and MAG on cell viability and integrity were analyzed, in addition to the migration of cells by mechanical injury. In addition, the release of pro and anti-inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  and IL-10) was analyzed after the incubation of cells with LPS, by enzyme immunoassay. The expression of MyF-5, Pax7, MyoD, myogenin, caspase-3, p38 MAPK and NF $\kappa$ -B proteins was analyzed using the western blot method. The intracellular calcium concentration and the concentration of the membrane potential in the cells were measured. The results showed an increase in cell viability and detachment in the two treatment methods used. In addition, it was observed an increase in cell migration after the using LLLT and MAG, when compared to natural migration. The expression of proteins in all myogenic factors evaluated denotes a significant increase by both LLLT and MAG. The group treated with LLLT was effective in both cell passages, in relation to the other groups, when the intracellular calcium concentration was assessed. The concentration of the membrane potential had a significant response post photobiomodulation and MAG. The LLLT, as well as MAG, reduced the release of the cytokines TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 in C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> cells, in the studied time and in the two cell passages evaluated. There was also a significant increase in the release of the cytokine IL-10. These data suggested that both treatments improved the process of migration and regeneration, facilitating the myogenic response, using the therapy with energy-based devices, as LLLT and MAG.

**Keywords:** cell migration, cell regeneration, muscle cells, low level laser therapy, photobiomodulation, magnetotherapy.

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1 Regeneração do Músculo Esquelético**

Desde o final do século XIX, o processo de reparo do tecido muscular tem sido descrito, mas somente nos últimos trinta anos foi realmente compreendida a capacidade regenerativa das fibras musculares esqueléticas.

A migração de células progenitoras musculares é um importante fator para a ocorrência da miogênese e regeneração do músculo esquelético. A migração é necessária para que os precursores musculares cheguem ao local do reparo e para o alinhamento dos mioblastos antes da sua fusão, o que acaba contribuindo para a regeneração muscular.

O processo de reparo tecidual (cicatrização) é um fenômeno complexo que visa restabelecer a integridade morfológica e funcional de um tecido lesado. Consiste em uma perfeita e coordenada cascata de eventos celulares e moleculares que interagem para que ocorra a reconstituição tecidual.<sup>(1)</sup>

A cicatrização é dependente de muitos fatores, dentre estes o tipo de pele do indivíduo, a localização anatômica do tecido a ser regenerado, a idade do indivíduo, estados de saúde geral e nutricional do indivíduo, tipo de ferida (cirúrgica ou traumática), ressecamento ou não do leito da ferida durante a cicatrização, entre outros.<sup>(2)</sup>

O sucesso da regeneração depende da extensão e da natureza da lesão, porém em todas as situações o processo envolve: revascularização; infiltração de células inflamatórias; remoção dos componentes celulares lesionados através da fagocitose; proliferação e, em seguida, fusão das células satélites para a formação de novos miotúbulos e fibras musculares; e finalmente a reinervação e a recuperação da função muscular.<sup>(3)</sup>

Os fibroblastos são as principais células envolvidas no processo de reparo tecidual e sua função é a manutenção da integridade do tecido conjuntivo por meio da síntese dos componentes da matriz extracelular. Estes estão sujeitos a mudanças devido às forças mecânicas as quais são submetidos durante a cicatrização e, assim, organizam as fibras colágenas e estão diretamente relacionados à formação do tecido de granulação.

Além de produzirem colágeno, os fibroblastos produzem elastina, fibronectina, glicosaminoglicanas e proteases, responsáveis pelo desbridamento e remodelamento fisiológico da célula. <sup>(4)</sup>

Os fibrócitos (fibroblastos inativos) também são considerados importantes no processo cicatricial por contribuírem para o mecanismo de formação do granuloma, na atividade antigênica, na produção de colágeno e na matriz protéica, além de terem participação na remodelagem e na inflamação como fonte rica de citocinas. <sup>(2,4)</sup>

As células são capazes de extensa proliferação quando desafiados por ciclos repetidos de lesão e regeneração *in vivo*<sup>(5)</sup> ou crescimento em cultura por clone, <sup>(6)</sup> mantendo a capacidade de se diferenciar.

As células satélites são pequenas células miogênicas, localizadas entre o sarcolema e a lamina basal das fibras musculares. Durante a vida extra-uterina estas células permanecem em estado de repouso (quiescente), porém dependendo de certos estímulos, como o mio-trauma, elas são ativadas e sintetizam diversas proteínas que contribuem para modificar seu status. A partir daí elas podem se diferenciar em mio-blastos, dividir-se, migrar e fundir-se, contribuindo assim para a regeneração e/ou crescimento do tecido muscular.<sup>(7,8,9)</sup>

Células satélites e a sua fusão, com origem respectiva de mio-blastos, fornecem mio-núcleos para crescimento ou regeneração de mio-fibras, que são responsáveis pela plasticidade muscular e capacidade para reparar e crescer em massa após traumas ou

exercício. A regeneração muscular após a lesão é conhecida por envolver duas fases, degenerativas e regenerativas.<sup>(10)</sup>

A fase degenerativa, após lesão muscular, envolve os eventos que levam à necrose das fibras musculares: ruptura do myarcibresarcolemma, aumento da permeabilidade das miofibras levando ao influxo de cálcio, ativação de proteases de calpaína que induzem a clivagem de células miofibrilares e proteínas do citoesqueleto, que posteriormente leva à proteólise das miofibras.<sup>(11)</sup>

O rompimento do sarcolema e miofibrilas resulta no aumento dos níveis séricos de CK. Este aumento é um evento observado após estresse mecânico ou em doenças degenerativas musculares.<sup>(12)</sup> Os tecidos danificados liberam fatores que atraem células inflamatórias circulantes para o local danificado, a fim de limpar os detritos, e também pode ativar células satélite, portanto, desencadear o processo de reparação muscular.<sup>(13)</sup>

Os neutrófilos são as primeiras células inflamatórias a se infiltrar no local da lesão muscular, seguido por macrófagos.<sup>(14)</sup>

As células inflamatórias contribuem não só para a remoção de detritos celulares, mas também para facilitar a fase de regeneração do músculo danificado. Macrófagos agem em secretar fatores de crescimento e citocinas que podem ativar células satélites e induzir a proliferação de mioblastos.<sup>(15)</sup> Isto demonstra que os neutrófilos desempenham um papel proeminente na regeneração muscular, possivelmente devido à sua capacidade de eliminar detritos por fagocitose e recrutar outras células inflamatórias.<sup>(16)</sup>

Também foi demonstrado que a redução da resposta inflamatória por depleção farmacológica de monócitos/macrófagos levam a um reparo moderadamente prejudicado dos músculos feridos.<sup>(17)</sup> Estes estudos sustentam a noção de que a inflamação as células agem como parte integrante dos processos de regeneração muscular, limpando detritos e

também fornecendo mediadores necessários para a completa regeneração de músculo lesionado.

A fase regenerativa do músculo esquelético pós-lesionado é mediada pela atividade das células satélites que residem no tecido muscular. A expansão de células miogênicas fornece uma fonte de novos mionúcleos para regeneração de miofibras demonstrando a importância da proliferação de precursores miogênicos para este processo.

Em condições fisiológicas normais, as células satélites são pacatas, mas em resposta a fatores secretados e liberados no ambiente danificado (após lesão, exercício ou condições patológicas e doenças degenerativas), elas são ativadas. Migram então para o local do dano, proliferam para gerar uma progênie de mioblastos, que são capazes de se fundir com miofibras danificadas e se diferenciam para promover a reparação muscular.<sup>(18)</sup>

A ativação de células por satélite não é restrito ao local danificado; danos à fibra desencadeia a ativação e migração de células satélites ao longo de toda a extensão da fibra e, em raras condições, células de músculos adjacentes podem ser recrutadas.<sup>(19)</sup>

A linhagem C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> é um subclone da linhagem de células musculares C<sub>2</sub>, isoladas de células-satélites de camundongos adultos <sup>(20)</sup>. Assim, os mioblastos da linhagem C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> são um bom modelo para o estudo do crescimento e diferenciação celular, apresentam a maioria das características de células musculares normais.<sup>(21, 22)</sup>

## **1.2 Processo de Divisão Celular**

Pesquisas anteriores investigaram o efeito de várias divisões sobre a capacidade proliferativa de células satélites do músculo esquelético e concentrou-se principalmente em potencial de divisão e encurtamento dos telômeros.<sup>(23)</sup> (Fig. 1)

Telômeros são estruturas constituídas por fileiras de proteínas e DNA, cuja a função é impedir o desgaste do material genético.

A existência de um tempo de vida útil nas células eucariotas normais pode depender também dos telômeros. A replicação destas estruturas é realizada por uma enzima chamada telomerase. Na ausência da telomerase, uma enzima que adiciona repetições sucessivas de bases de DNA telomérico aos telômeros. Em cada duplicação celular a célula pode perder entre 50 e 201 pares de bases de DNA telomérico. O encurtamento dos telômeros ocorre porque a maioria das células somáticas normais não sintetiza a telomerase.<sup>(24)</sup> Na medida em que as células chegam próximas à fase de senescência replicativa, a proteína p53 passa a ser sintetizada. Esta proteína é o produto de um gene supressor tumoral, que atua interrompendo as duas primeiras fases do ciclo celular, G1 e S. Essa proteína é importante no controle do ciclo celular, pois sua inativação ou mutação é associada a um aumento da proliferação celular, que independe do comprimento dos telômeros.<sup>(25)</sup>

Assim, os telômeros podem ter uma função preponderante no envelhecimento tecidual, onde as células mantem a sua capacidade proliferativa ao longo da vida do indivíduo. Entretanto, a sua função torna-se restrita no caso de tecidos compostos por células permanentemente pós-mióticas, tais como os neurônios e os cardiomiócitos.<sup>(26)</sup>

A presença de micronúcleos também pode estar associada ao envelhecimento. O micronúcleo consiste em uma porção citoplasmática de cromatina de forma redonda ou

ovalada que se localiza perto do núcleo. A sua formação resulta de uma quebra na molécula de DNA dias ou semanas após a ação de carcinógenos, quando as células da camada basal estão em divisão. Eles são constituídos por fragmentos de cromátides, de cromossomos acêntricos ou de cromossomos aberrantes, que não foram incluídos no núcleo principal após a conclusão da mitose. <sup>(27)</sup>

Assim como podem indicar processos fisiológicos degenerativos na célula, como a apoptose e a necrose celular.

Evidências importantes e convincentes também sugerem redução na diferenciação com myoD e miogenina, reduzidos em mioblastos humanos senescentes após múltiplas divisões. <sup>(28)</sup>

Os telômeros são, portanto, fundamentais no controle da divisão celular e vão sendo encurtados ao longo da vida até perderem sua funcionalidade. O resultado desse processo é o envelhecimento, pois células com telômeros curtos acabam morrendo ou ficam mais vulneráveis a instabilidades genéticas. Isso pode ser comprovado quando se analisa o tecido de um idoso, em que a perda de células é uma das principais características.

Um modelo de duplicação múltipla, portanto, revela a oportunidade de investigar *in vitro* as múltiplas divisões que ocorrem *in vivo* com o envelhecimento. Nesse contexto, as células C2C12 fornecem um bom modelo para investigar o impacto de divisões celulares no comportamento subsequente dos mioblastos, imitando a divisão celular e a renovação, já que retém atividade da telomerase equivalente a células-tronco musculares isoladas.

### 1.3 Fatores Reguladores da Regeneração Muscular

O padrão de expressão gênica de células satélites ainda é pouco conhecido, tanto no estado de quiescência como no estado ativado. As células satélites quiescentes não expressam fatores reguladores da miogênese das famílias do MyoD, MEF2 ou outros marcadores de diferenciação terminal.

O MyoD é um excelente marcador para células satélites ativadas <sup>(29,30)</sup>, sendo encontrado em elevados níveis no músculo em regeneração e de neonatos. <sup>(31)</sup>

Também importante fator de transcrição é o Myf-5, que pertence à família de proteínas “*basichelix-loop helix*”, marcando células satélites quiescentes e ativadas. <sup>(32)</sup>

Pax7 é um fator de transcrição “*paired box*” expresso em células satélites quiescentes e em proliferação. Uma mutação no Pax7 leva à ausência de células satélites, mostrando que o Pax7 é extremamente importante para a especificação da população de células satélites. <sup>(33)</sup>

Um fator regulador da miogênese é a miogenina, que se encontra expresso em células satélites ativadas e mioblastos. <sup>(34)</sup> A caspase 3 é uma enzima envolvida no apoptose. A ativação e o controle da cascata das caspases são essenciais para diversos processos celulares envolvidos na homeostasia e diferenciação celular.

Vias de sinalização MAPKs, como a MAPK 38 são evolutivamente conservadas entre eucariotos e participam de uma diversidade de processos biológicos essenciais, incluindo controle do ciclo celular, proliferação de células, apoptose, ativação do sistema imune e proteção contra o estresse oxidativo. <sup>(35)</sup>

NF-κB (factor nuclear kappa B) é um complexo proteico que desempenha funções como fator de transcrição. NF-κB pode ser encontrada em quase todos os tipos de células

animais e está envolvida na resposta celular a estímulos como o estresse, citocinas, radicais livres, radiação ultravioleta, oxidação de LDL e antígenos virais e bacterianos.

#### 1.4 Laser de Baixa Intensidade

A sigla **LASER** tem sua origem na língua inglesa, que significa “*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*”. O uso do laser como instrumento terapêutico tem sido acompanhada na área da medicina desde 1960, através de Theodore Maiman. E. Mester foi um dos primeiros experimentos publicados sobre os efeitos do laser de baixa intensidade data de 1973, através da irradiação de laser de HeNe (Hélio-Neônio), sobre feridas de ratos durante 14 dias consecutivos. <sup>(36)</sup>

As propriedades terapêuticas dos lasers vêm sendo estudadas desde seu desenvolvimento, sendo a sua ação analgésica observada, particularmente, sobre as formas da dor crônica de diversas etiopatogenias, desde os receptores periféricos até o estímulo no sistema nervoso central. <sup>(37)</sup>

A terapia a laser, quando utilizada nos tecidos e nas células, não é baseada em aquecimento, ou seja, a energia dos fótons absorvidos não é transformada em calor, mas em efeitos fotoquímicos, fotofísicos e/ou fotobiológicos. <sup>(37,38)</sup>

Na década de 80, Karuet al., (1982) descreveu as bases da fotobiomodulação nos processos de interação dos tecidos biológicos envolvidos através do efeito fotofísico-químico do laser. <sup>(39)</sup>

Dependo da dose utilizada, de acordo com os autores acima, podemos provocar uma fotobiomodulação, que se pode dividir segundo os seguintes efeitos:

## 1. Fotobioestimulação

. Reparação tecidual / Cicatrização

. Inflamação / Drenagem linfática

## 2. Fotobioinibição

. Analgésica / Contenção de hipertrofia celular

O estudo de Holanda et al. (2017) *in vitro* e *in vivo* indicou o tratamento com uma taxa de irradiância / fluência de 270mW /cm<sup>2</sup> ou superior ao nível do nervo pode bloquear rapidamente a transmissão da dor.<sup>(40)</sup>

Os efeitos do laser de baixa intensidade podem ser observados no comportamento dos linfócitos incrementando sua proliferação e ativação; sobre os macrófagos, aumentando a fagocitose; elevando a secreção de fatores de crescimento de fibroblasto e intensificando a reabsorção tanto de fibrina quanto de colágeno. Além disso, contribuem para elevar a motilidade de células epiteliais, a quantidade de tecido de granulação e, podem diminuir a síntese de mediadores inflamatórios.<sup>(41,42)</sup>

Este processo se dá por meio da estabilização da membrana celular pela normalização das concentrações de cálcio, sódio e potássio, contribuindo com a reparação celular e vasodilatação, aumentando o transporte de oxigênio e nutrientes para as células danificadas e facilitando a reparação e remoção dos restos celulares. A fotobiomodulação também acelera o influxo leucocitário; reduzindo a interleucina I; aumentando resposta dos linfócitos afetando benéficamente toda a resposta linfática, quais os linfócitos aumentam na AR: CD4, CD8, CD $\beta$ /8, CD19, CD16 e natural killer; incrementando a síntese de prostaglandina, devido à conversão das prostaglandinas PGG<sub>2</sub> e PGH<sub>2</sub> periosídeos em prostaglandinas PGI<sub>2</sub>, que possui ação vasodilatadora e anti-inflamatória.<sup>(43-45)</sup>

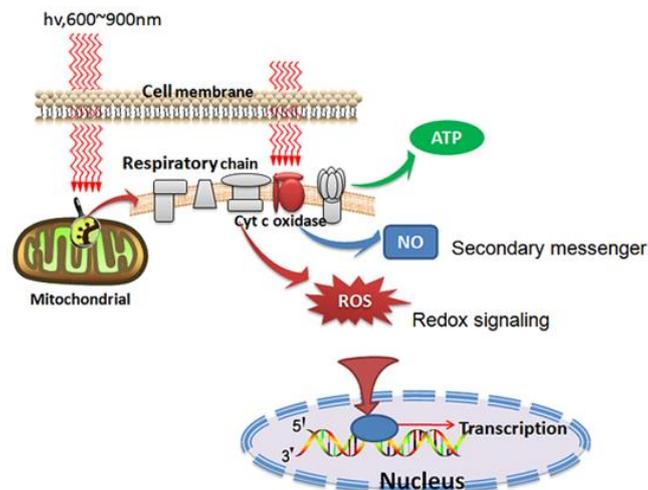
Em nível vascular, o laser de baixa intensidade estimula a proliferação das células endoteliais, resultando na formação de numerosos vasos sanguíneos, na produção aumentada do tecido de granulação, estimulando o relaxamento da musculatura vascular lisa e contribuindo, assim, para os efeitos analgésicos da terapia a laser. <sup>(46)</sup>

O LBI estimula um grande número de processos biológicos incluindo o crescimento celular, a proliferação<sup>(47)</sup> e a diferenciação.<sup>(48,49)</sup> *In vitro*, o efeito na proliferação pelo LBI tem sido estudado em vários tipos celulares como os fibroblastos, células endoteliais, keratinócitos, células musculares, mioblastos e outros tipos celulares.<sup>(50-53)</sup> Ainda, foi demonstrado que a irradiação do LBI estimula a proliferação de células satélites musculares, a angiogênese e expressão de fatores de crescimento, desempenhando assim uma função importante na regeneração muscular. <sup>(54)</sup>

A mitocôndria é descrita na literatura como um fotoceptor fazendo parte da cadeia respiratória. A propriedade de afinidade a luz monocromática a nível biológico primário da ação do LBI <sup>(55)</sup> (Fig. 1).

Sabe-se, no entanto, que o sucesso da terapia com LBI e seus respectivos efeitos denota ser dependente do comprimento de onda, potência, dose e tempo aplicados, sendo extremamente importante os cálculos dosimétricos neste caso. <sup>(56)</sup> A aplicação em baixa potência (10 a 900 mW), comprimento de onda espectro vermelho ou próximo ao infravermelho (600 – 1.000 nm) e irradiância entre 0.01 e 15 W/cm<sup>2</sup>, contribui redução de inflamação, para a regeneração tecidual e alívio a dor, através dos mecanismos fotofísicoquímicos, sem apresentar efeitos fototérmicos. <sup>(57)</sup>

O LBI atua em células, quando estas apresentam uma baixa de energia e, assim, irão utilizar de maneira que estimule sua membrana celular ou nuclear, e/ou as mitocôndrias. Dessa forma, estará induzindo a biomodulação, ou seja, a célula buscará um estado de normalização na região afetada, levando a homeostase celular.



**Figura 1.** Esquema da ação do LBI na permeabilidade da membrana celular (*cellmembrane*) com ação na cadeia respiratória (*respiratorychain*) da mitocôndria (*mitochondrial*), em específico no citocromo C oxidase (*cytc oxidase*) e liberação de adenosina trifosfato (ATP), óxido nítrico (NO), espécies reativas de oxigênio (ROS) e sinalização no núcleo celular. Sinalização redox (*redox sinaling*). Transcrição (*transcription*). Núcleo (*nucleus*). Quantun de energia ( $h\nu, 600\sim 900\text{nm}$ ), Estraido de YNG-YNG HUANG, 2011.

### 1.5 Magnetoterapia (MAG)

A magnetoterapia é uma técnica que explora os benefícios de campos magnéticos no tratamento de curativos e de reabilitação.

As células têm uma carga elétrica específica, que se altera e perde força no caso de algumas doenças. Nestes casos a membrana celular sofre despolarização, o que é acentuado quando há algum processo inflamatório, por exemplo.

Os impulsos eletromagnéticos têm a função de repolarizar a membrana celular restaurando o funcionamento fisiológico e o equilíbrio da energia. Assim, as células expostas a campos eletromagnéticos de extrema baixa frequência (0 a 100 Hz), sofrem alterações específicas desde mudanças de fluxo iônico transmembrana até o

aumento da síntese de DNA e o aumento da transcrição de RNA<sup>(58)</sup> Quando aplicado ao corpo humano, o campo magnético é capaz de restabelecer o equilíbrio bioquímico das células e restaurar a funcionalidade correta da membrana celular.<sup>(59)</sup>

As ondas eletromagnéticas são classificadas em ionizantes e não-ionizantes, de acordo com a frequência de emissão, a potência e a intensidade. (Fig. 3) As ondas utilizadas na magnetoterapia são não-ionizantes e, assim, não invasivas. As ondas magnéticas ionizantes são amplamente utilizadas na medicina clássica, mas como são absorvidas pelos tecidos, em quantidades elevadas podem ser um risco real.

Em 1979, a *Food and Drug Administration* (FDA, EUA) aprovou, pela primeira vez, o uso de eletromagnético pulsado (MAG) para o tratamento de fraturas não unidas.<sup>(60)</sup>

Após essa data, vários estudos têm demonstrado benefícios dos campos eletromagnéticos para o tratamento de várias condições, como psoríase, edema, osteoartrite e feridas.<sup>(61-63)</sup>

O campo magnético gerado por um ímã atua principalmente nos sistemas ósseo, articular, muscular e vascular.

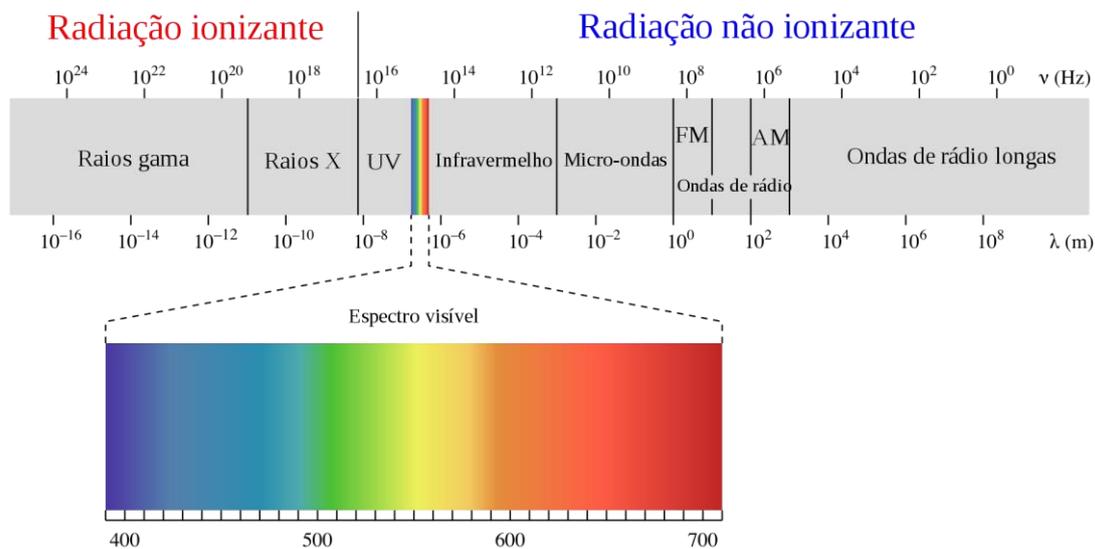
Várias são as funções curativas do campo magnético, como analgesia, resistência óssea, aumento do fluxo vascular, melhora a circulação periférica, acelera a cicatrização de feridas e ação de antienvhecimento dos tecidos.

A MAG também atua no tratamento de doenças inflamatórias, reumáticas, articulares e úlceras, como artrose, artrite, hérnia de disco, osteoporose, dores musculares, varizes e inflamação do túnel do carpo.

Tipos de terapia magnética:

A MAG é aplicada em praticamente todas as doenças caracterizadas por dor, inflamação e quando ocorra déficit funcional vascular. Existem três tipos de MAG de acordo com a fonte geradora do campo magnético usado:

- Estática - Consiste em se aplicar, sobre a pele do local a ser tratado, um ou mais magnetos (ímã). Tem aplicação eficiente em casos de dores localizadas.
- Baixa frequência - gera campos magnéticos variáveis com frequências que oscilam entre 10 e 200 Hz e é adequada para favorecer a regeneração dos tecidos.
- Alta frequência - o campo gerado atinge alguns milhões de hertz (18-900 MHz). Estas frequências elevadas são adequadas para tratar processos dolorosos e inflamações.



**Figura 2.** Espectro eletromagnético apresentando as regiões de radiações ionizantes e não ionizantes. Por Yuri Tungsten - Trabalho derivado de Philip Ronan

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar os efeitos de terapias com aparelhos baseados em energia (Laser de Baixa Intensidade e Magneto) na migração de células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> de passagem nova e antiga.

### **2.2 Objetivos Específicos**

Avaliar os efeitos de terapias com aparelhos baseados em energia (Laser de Baixa Intensidade e Magneto) na:

- Análise de células metabolicamente ativas, através de testes para viabilidade celular;
- Integridade da membrana, através de teste para notar o descolamento celular;
- Estudar o efeito do LBI e da Magnetoterapia sobre os mecanismos de migração e regeneração muscular por simulação de ruptura na camada de células;
- Expressão de proteínas MyF 5, Pax 7, MyoD, Miogenina;
- Concentração de cálcio intracelular;
- Concentração do potencial de membrana;
- Liberação de citocinas pró e anti-inflamatórias (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-10) por ensaio imunoenzimático.
- Expressão de proteínas Caspase 3, P 38 Mapk e NF $\kappa$ -B.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

Este estudo foi realizado no laboratório de cultivo celular do curso de Mestrado e Doutorado em Medicina da Universidade Nove de Julho (UNINOVE).

#### **3.1 Células Musculares C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>**

As células, provenientes da linhagem de mioblastos C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>, foram gentilmente doadas pelo professor José Ernesto Belizário, do Instituto de Ciências Biomédicas - USP/SP. As células foram cultivadas no meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Vitrocell, Campinas, SP, Brasil) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB), (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e 1% de solução antibiótica-antimicótica (Cultilab).

#### **3.2 Cultivo Celular**

Os mioblastos foram mantidos em estufa (HEPA class 3110, Thermo Electron Corporation, Marietta, OH, EUA) a 37°C, numa atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. O monitoramento do crescimento celular foi realizado a cada 24 h, utilizando microscópio invertido de fase (Eclipse TE 2000U, Nikon, Melville, NY, EUA).

O subcultivo foi realizado quando a monocamada celular se tornar subconfluenta para a perpetuação da linhagem celular, sempre em fluxo laminar (Linha 400, Pachane, Piracicaba, SP, Brasil). Para tanto, o sobrenadante foi removido, as células lavadas com tampão 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) e tratadas com solução de tripsina 0,25% durante 3 minutos a 37°C. Após a incubação,

foi realizada nova lavagem com meio, centrifugação a 1200 rpm a 10°C por 5 minutos (Centrífuga Excelsa 4-280R, Fanem, São Paulo, SP, Brasil) e posteriormente a ressuspensão em 1 ml de meio DMEM. A viabilidade das células foi avaliada por contagem com corante vital azul de Trypan (0,4%) e assim utilizadas nos ensaios as culturas com viabilidade maior que 95%. A seguir, foram feitas diluições necessárias à semeadura das células, em placas de cultura de 96 poços.

A população de células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> utilizadas, foram subcultivadas (conforme descrito acima). Esse ciclo foi repetido 6 ou 76 vezes, criando um estoque de células que apresentavam duplicações de 6 ou 76 vezes em comparação com a estoque original retida em nitrogênio líquido e que não sofrera duplicação. Assim, as células que sofreram 6 passagens foram denominadas de células de passagem nova p(6) e as de passagem 76 foram denominadas de células antigas p(76).

### **3.3 Terapia Laser de Baixa Intensidade**

O dispositivo laser utilizado foi o Laser da marca DMC® modelo LaserTherapy XT. As células foram irradiadas imediatamente após a adição do LPS na cultura por 24h, e foi aplicado de forma pontual diretamente no poço pela parte inferior da placa. Os experimentos foram realizados em um ambiente com obscuridade parcial para não sofrer interferência da luz externa (Fig. 3).

**Tabela 1.** Parâmetros dosimétricos do LBI.

<b>Comprimento de onda</b>	660nm
<b>Densidade de energia</b>	4 J/cm <sup>2</sup>
<b>Potência de saída</b>	100 mW
<b>Densidade de potência</b>	0.33 W/cm <sup>2</sup>
<b>Área do feixe</b>	0.028/cm <sup>2</sup>
<b>Modo de aplicação</b>	Pontual
<b>Tempo</b>	10 segundos

**Figura 3.** Aparelho de Laser de Baixa Intensidade. (Foto: Luciana Miato)

### **3.4 Magnetoterapia**

Estudo piloto - exposição aguda a um campo magnético oscilante de baixa intensidade e baixa frequência.

O equipamento (NVL70, Linfospin, Brasil) usado para o presente estudo induz um campo magnético oscilante, com frequências (0 a 24 Hz) e tempo de 15 segundos. Cada ciclo de variação induz uma inversão polar, que alterna entre as posições de orientação Norte-Sul e Sul-Norte. A intensidade do campo, medido com um medidor gauss (TMAG-1T, Globalmag, Brasil, precisão de 1 mT), era de 3.000 G (300 mT) na superfície do equipamento.

NVL70, Linfospin, Brasil



**Figura 4.** Magneto - N° ANVISA 809390-3 (Foto: arquivo próprio)

### **3.5 Reparo Tecidual com Colágeno**

Para este ensaio foi preparado uma solução de colágeno 5mg/ml, em ácido acético 1% e esterilizado (auto-clave), um dia antes do experimento, as placas foram preparadas para receber as células; em uma placa de 24 poços foi colocada uma lamínula estéril em cada poço (0,13-0,16mm GLASSCYTO), plaqueado sobre cada lamínula com 100µl do colágeno preparado, deixado na estufa por 24 horas. Após esse período as células foram plaqueadas na quantidade de  $2 \times 10^3$  células em cada poço, onde foram tratadas com LPS, e após 24h, irradiadas com o LBI e tratadas com magnetoterapia. Após o tratamento retornaram para a estufa, e após 1 h foi realizada a lesão celular em fluxo laminar com ponteira estéril, onde foi simulado uma lesão nas células em todos os grupos e observado ao microscópio invertido (ECLIPSE TE 2000 UI, NIKON, MILVILLI, NY,EUA). Os grupos foram fotografados após as lesões, nos tempos de 0 e 24 h. As células foram analisadas, morfológicamente, por coloração de hematoxilina e eosina (H & E).

### **3.6 Métodos Colorimétricos para Determinação de Viabilidade Celular**

A viabilidade celular, foi obtida pelo ensaio de MTT (3-(4,5 dimetiltiazol-2yl)-2-5-difenil-2H tetrazolato de bromo - Sigma, M2128) e cristal violeta (Sigma, HT90-1), que se resume em uma análise colorimétrica que de forma indireta mede a citotoxicidade. O corante cristal violeta também é aplicado para determinar a viabilidade celular por possuir a habilidade de ligação ao DNA.

### **3.6.1 Viabilidade por MTT**

No ensaio de MTT, a citotoxicidade celular é avaliada através da atividade das enzimas desidrogenase mitocondriais. Estas enzimas têm a capacidade de clivar o anel tetrazólio do corante utilizado. Após a solubilização com DMSO (dimetil-sufóxido), obtém-se uma solução cuja absorbância pode ser medida, sendo que a intensidade da cor mensurada será diretamente proporcional a quantidade de células viáveis. Após os procedimentos de cultivo celular,  $1 \times 10^4$  células foram plaqueadas em placas de 96 poços. Depois de 24 h para aderência celular, foi aplicado o LPS, onde novamente ficou com tempo de 24 h. Após o término do tempo de tratamento, os poços foram lavados com 100  $\mu$ L de PBS e logo após adicionou-se MTT (Thyazolyl Blue Tetrazolium Bromide - SIGMA M5655) em uma concentração de 50  $\mu$ L (0,5mg/mL), procedendo-se então o incubação das placas na estufa a 37°C a 5% de CO<sub>2</sub>, por um período de 4 h. Todo o líquido presente nas placas foi retirado, e adicionou-se então 100  $\mu$ L de isopropanol, permitindo a quebra dos cristais de formazan. Foi realizada então a leitura de absorbância, utilizando-se uma leitora ELISA (540nm)

### **3.6.2 Descolamento Celular**

Para efetuar a coloração com cristal violeta em placas de 96 poços, inicialmente o meio de cultura foi desprezado e 50  $\mu$ L da solução de coloração de cristal violeta (5% cristal violeta, 1,7% NaCl, 3,3% paraformaldeído em 33,3% etanol) foram adicionados aos poços e incubados na estufa a 37°C a 5% de CO<sub>2</sub>, por um período 15 min. As placas foram lavadas por 2 min por imersão em água corrente, secas e posteriormente foi adicionado com 100  $\mu$ L de metanol, para a quebra dos cristais. Foi realizada então a leitura de absorbância, utilizando-se uma leitora ELISA (540nm)

### **3.7 Ensaio de ELISA**

Para o ensaio de expressão dessas citocinas, as células foram plaqueadas na quantidade de  $2 \times 10^3$  em cada poço por 24 horas para adesão celular. Após esse período, as células receberam estímulo de LPS por 24 horas. O sobrenadante foi removido das células no tempo de 24 horas o ensaio imunoenzimático (Elisa). As dosagens foram feitas com Kit da 22 R&D Systems (menneapolis, MN, USA). As placas de 96 poços, foram adsorvidas com anticorpo de captura monoclonal anti-citocina para camundongo, diluído em PBS por 12hs. Em seguida as placas foram lavadas com solução de PBS 0,05% de Tween 20. Os sítios inespecíficos, foram bloqueadas com PBS contendo 1% de BSA (soro albumina bovina – Sigma) por 1h. As placas foram lavadas para a remoção da solução de bloqueio. Em seguida, as amostras (100 $\mu$ l) e as curvas foram colocados nos respectivos poços e incubados por 2hs. Ao final do período de incubação as placas foram lavadas. O anticorpo de detecção foi adicionado conjugado a peroxidase e incubado por 2hs. As placas foram novamente lavadas e assim adicionado o substrato da peroxidase (tetrametilbenzidina) deixando reagir de 15 a 20 minutos. Ao final da incubação, foi adicionado solução de parada (H<sub>2</sub>so<sub>4</sub>-2N). As citocinas foram quantificadas pela leitura da absorbância (450nm) usando leitor de placas Spectramax (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

### **3.8 Ensaio de Western Blot**

Foi realizado a coleta das células, para o ensaio de expressão de proteínas de p38 MAPK e NF- $\kappa$ B para a via de inflamação e para a via de regeneração Pax7, Myod, miogenina, Myf5 e caspase 3, após 24h da incubação com LPS e aplicação do LBI e Magneto nas placas de cultura, no tempo de 24 h. Para tanto, os sobrenadantes foram removidos e preparadas as amostras. As amostras foram pipetadas em mini-géis de

acrilamida a uma concentração de 10 a 12% (w/v) em gel de SDS-PAGE, com 1% de glicerol (w/v) e 0,1% de SDS durante 50 min a uma amperagem constante de 20 mA por gel ou durante 155 min com voltagem a 100 V para garantir a separação de bandas de maior peso. Todas as amostras foram aplicadas com um marcador de proteínas de peso molecular conhecido – Precision Plus Protein™ Standards (Bio-Rad). Em seguida foi feita a transferência para membranas de Nitrocelulose (Bio-Rad), previamente hidratadas, utilizando um dispositivo de transferência da Bio-Rad, foi submerso em tampão de transferência 1x. Que foi submetido a uma diferença de potencial constante (100V), durante 15 min, para a transferência dos géis para as membranas, em seguida foram coradas com corante ponceau (com o intuito de visualizar a transferência do gel para a membrana), em seguida as membranas foram lavadas. Seguindo depois o procedimento de bloqueio das membranas foram mergulhadas em tampão de bloqueio (solução de leite magro em pó 2.5%). Por um período de 60 min à temperatura ambiente. Depois do bloqueio foram lavadas três vezes com tampão TBST e incubadas durante a noite, com anticorpos primários de captura monoclonal anti-citocina para camundongo, diluído em tampão de bloqueio. Depois de três lavagens (dois ciclos de 5 min e um final de 10 min) em tampão, foram em seguida incubadas as membranas com os anticorpos secundário diluídos em tampão de bloqueio. Depois foram feitas mais três lavagens de 10 minutos, em seguida colocada em soluções (ECL) para a detecção por quimioluminescência (ECL) em equipamento de leitura (Scanner Storm 860 Molecular Imager)

### **3.9 Ensaio de Teor de Cálcio Intracelular por Medições Qualitativa e Quantitativa**

As células foram carregadas com (Molecular Probes, Oregon, EUA) um corante sensível ao cálcio Fluo-4, (1%) onde foram pipetado 10ul da solução nas células, (este volume está em relação ao volume de células por poço). As células ficaram em contato

com o corante Fluo-4 por 60 minutos em temperatura ambiente com uma concentração de 1 mmol/L (com mais 0,005% de Pluronic F-127, pipetando o volume de 10ul do reagente, em relação ao volume de células (Invitrogen, Oregon, EUA) seguindo orientação do protocolo do fabricante, onde foi monitorada em microscópio invertido de fluorescência e fotografadas os campos.( Nikon, Eclipse TS100/ TS 100F), em comprimento de onda de excitação e emissão de 494nm e 516nm, respectivamente.

### **3.10 Ensaio de Potencial de Membrana por Medições Qualitativa e Quantitativa**

As células foram carregadas com (TMRE Mityochondrial Membran e Potencial-Cayman Chemical) um corante sensível TRME (1%) onde foram pipetado 10ul da solução nas células, (este volume está em relação ao volume de células por poço). As células ficaram em contato com o corante TRME por 60 minutos em estufa a 37°, com uma concentração de 1 mmol/L. Seguindo orientação do protocolo do fabricante, onde foi monitorada em microscópio invertido de fluorescência e fotografadas os campos. (Nikon, Eclipse TS100/ TS 100F), em comprimento de onda de excitação e emissão de 494nm e 516nm, respectivamente.

### **3.11 Análise Estatística**

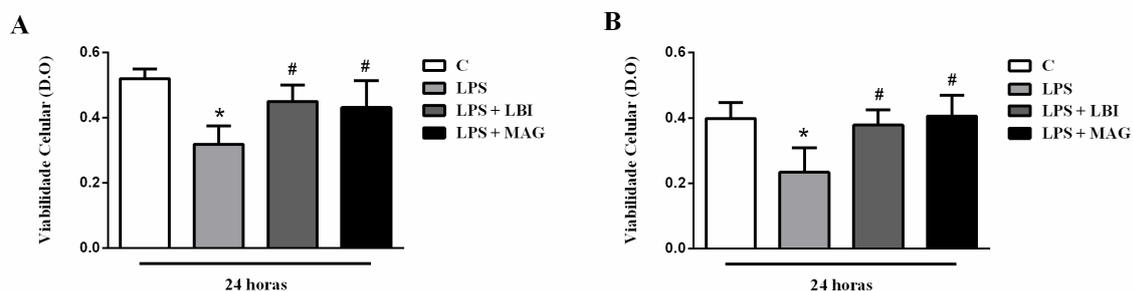
Para a análise dos dados foram utilizados média, desvio padrão e análise de variância (ANOVA) de uma via, com auxílio do software GraphPadPrism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, E.U.A.). Foram realizados pós teste Tukey e considerada aceitável quando  $p < 0,05$ . Todas as amostras foram feitas em quadruplicatas e três experimentos independentes

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Efeito da Terapia com LBI e Magnetoterapia na Viabilidade de Células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> de Passagem Nova (p6) e Antiga (p76).

A análise da viabilidade celular foi realizada utilizando o ensaio do MTT nas células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> com estímulo de LPS por 24 h. Após esse período, as células do grupo LPS+LBI receberam a aplicação pontual do LBI por 10 s e as células do grupo LPS+MAG receberam aplicação com o aparelho magneto por 15 s.

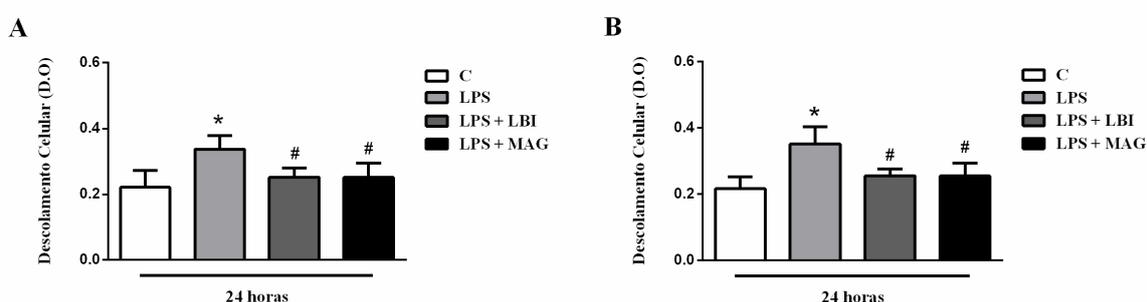
Nas amostras de células de passagem nova, os resultados demonstraram diminuição da viabilidade no grupo de células incubadas com LPS em relação ao grupo controle. Os grupos LPS+LBI e LPS+MAG apresentaram uma elevação significativa em relação ao grupo LPS (C:  $0,51 \pm 0,03$  pg/ml; LPS:  $0,31 \pm 0,05$  pg/ml; LPS+LBI:  $0,45 \pm 0,05$  pg/ml; LPS+MAG:  $0,43 \pm 0,08$  pg/ml) (Fig. 5 A). Os resultados do grupo de células de passagem antiga mostraram diminuição da viabilidade em células do grupo LPS em relação ao controle. Os grupos LPS+LBI e LPS+MAG demonstraram aumento significativo da viabilidade celular em relação ao grupo LPS (C:  $0,39 \pm 0,04$  pg/ml; LPS:  $0,23 \pm 0,07$  pg/ml; LPS+LBI:  $0,37 \pm 0,04$  pg/ml; LPS+MAG:  $0,40 \pm 0,06$  pg/ml) (Fig. 5 B).



**Figura 5. Efeito do LBI e MAG na viabilidade celular de células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> de passagem nova (p6) e antiga (p76).** Células musculares C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 h para adesão celular. Após esse período, as células de passagem nova (A) e passagem antiga (B) receberam estímulo de LPS por 24 h. Após 24h do LPS aplicado, as células do grupo LPS+LBI receberam a aplicação pontual do laser por 10 segundos e as células do grupo LPS+MAG receberam aplicação com o aparelho magneto por 15 segundos. Cada valor representa a média ± SEM de três experimentos independentes. \* p<0,05 vs C. #p<0,05 vs LPS. (One-way ANOVA).

#### 4.2 Efeito da Terapia com LBI e Magnetoterapia no Descolamento de Células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> de Passagem Nova (p6) e Antiga (p76).

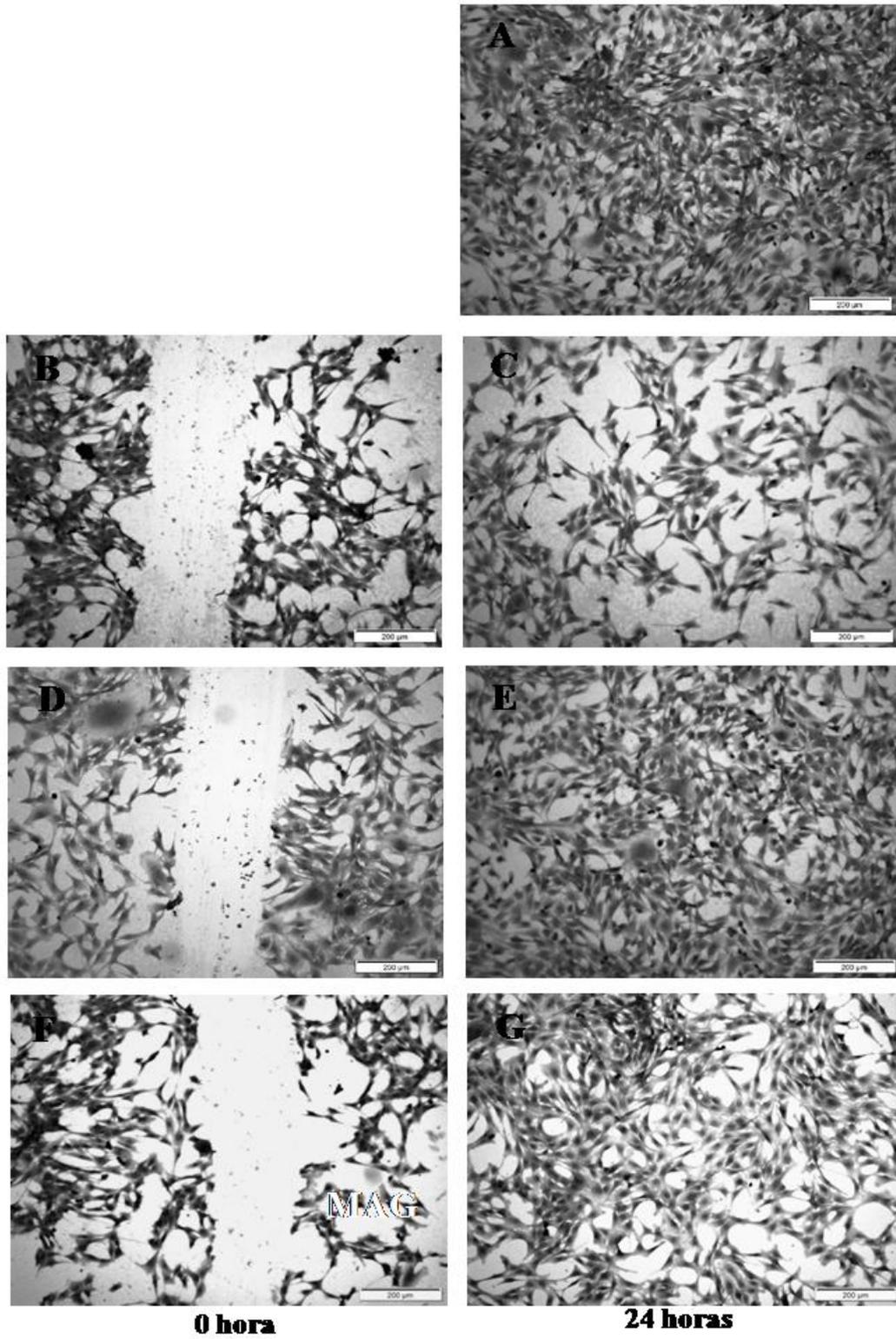
Os resultados demonstraram um aumento do descolamento nas células de passagem nova do grupo LPS em relação ao controle. O grupo LPS+LBI denotou diminuição significativa em relação ao grupo LPS, assim como grupo LPS+MAG: (C:  $0,22 \pm 0,05$  pg/ml; LPS:  $0,33 \pm 0,04$  pg/ml; LPS+LBI:  $0,25 \pm 0,02$  pg/ml; LPS+MAG:  $0,25 \pm 0,04$  pg/ml) (Fig.6 A). O resultado das células de passagem antiga demonstraram um aumento do descolamento do grupo LPS em relação ao controle. O grupo LPS+LBI mostrou diminuição significativa em relação ao grupo LPS. O grupo LPS+MAG também teve redução significativa em relação ao grupo LPS. (C:  $0,21 \pm 0,03$  pg/ml; LPS:  $0,35 \pm 0,05$  pg/ml; LPS+LBI:  $0,25 \pm 0,02$  pg/ml; LPS+MAG:  $0,25 \pm 0,03$  pg/ml) (Fig. 6 B).



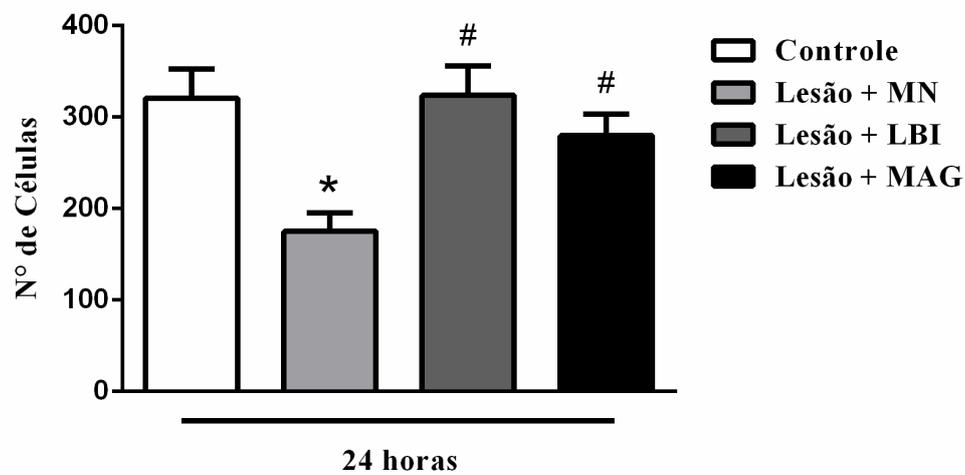
**Figura 6. Efeito do LBI e MAG no descolamento celular em amostras de células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> de passagem nova (p6) e antiga (p76).** Células musculares C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 h para adesão celular. Após esse período, as células de passagem nova (A) e passagem antiga (B) receberam estímulo de LPS por 24 h. Após 24h do LPS aplicado, as células do grupo LPS+LBI receberam a aplicação pontual do laser por 10 segundos e as células do grupo LPS+MAG receberam aplicação com o aparelho magneto por 15 segundos. Cada valor representa a média  $\pm$  SEM de três experimentos independentes. \*  $p < 0,05$  vs C. #  $p < 0,05$  vs LPS. (One-way ANOVA).

### **4.3 Efeito da Terapia com LBI e Magnetoterapia na Migração de Células de Passagem Nova (p 6).**

A figura 7 demonstra o ensaio de migração celular (24h) comparando os efeitos de LBI e MAG com a migração natural (MN). As rupturas nas células foram feitas através de fricção com ponteira de pipeta, e logo após as células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> do grupo LBI receberam a aplicação pontual do laser por 10 s e as células do grupo MAG receberam aplicação com o aparelho magneto por 15 s. A imagem 7A mostra as células integras. As figuras 7B, D e F demonstram a ruptura causada imediatamente no tempo da fricção. A figura 7C e H mostra o infiltrado celular para o local da ruptura decorrente da migração natural após 24 h. A Figura 7E e H demonstra o infiltrado celular após o uso do LBI, onde foi notado maior número de células em comparação ao grupo MN após 24 h. A Figura 7G e H mostra o efeito do MAG em relação à ruptura após 24h, notando-se a reorganização celular, com número de células também superior ao grupo MN.



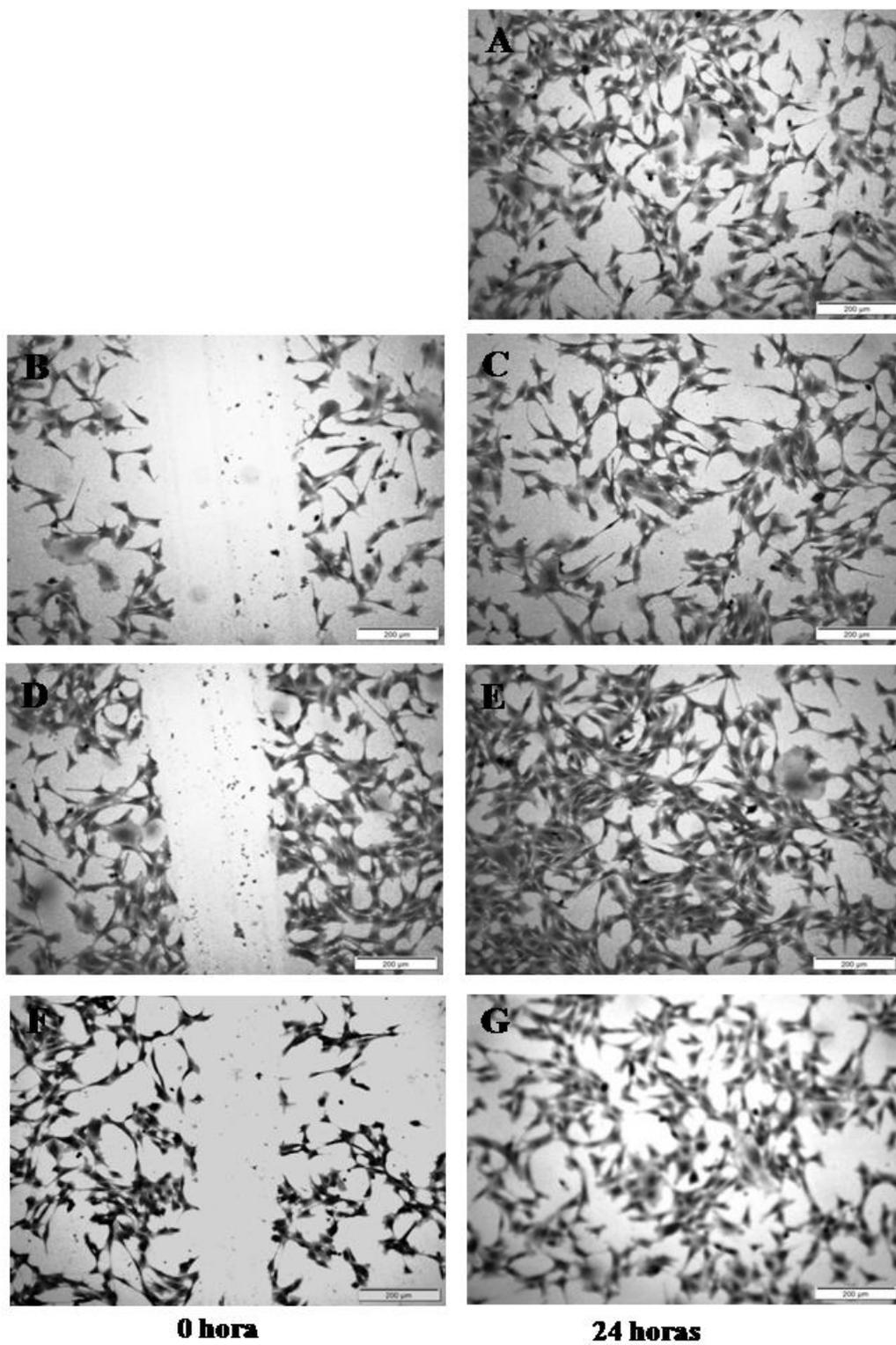
H



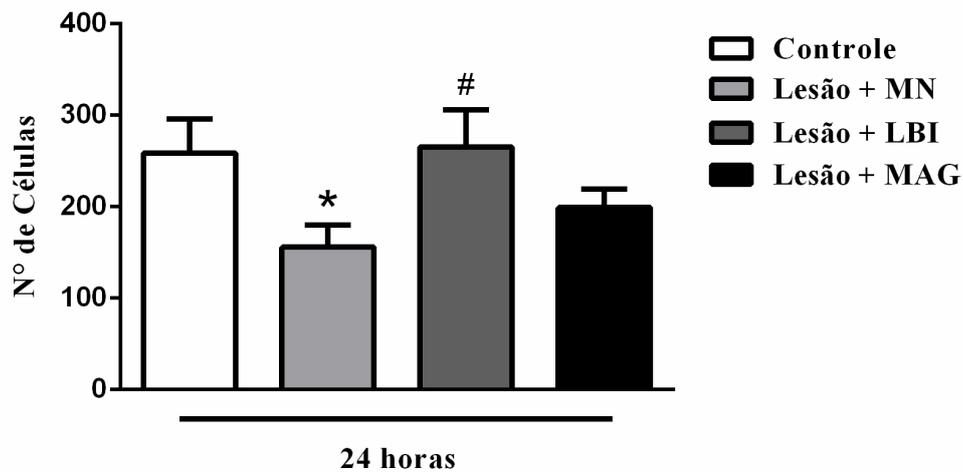
**Figura 7. Efeito do LBI e MAG na migração de células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> de passagem nova.** (A) Células integras, (B, D e F) ruptura causada por fricção, (C) migração natural após 24h. Migração após 24h com uso do LBI660nm (E); migração após 24h com utilização da MAG (G). A contagem de células foi realizada utilizando o programa imageJ, onde foi calculada a média de quatro imagens. Barra de escala | 200  $\mu$ m | e objetiva de 10x. Em (H), gráfico que mostra contagem de células em quatro imagens, \*  $p < 0,05$  vs C; #  $p < 0,05$  vs Lesão+MN. (One-way ANOVA).

#### **4.4 Efeito da Terapia com LBI e Magnetoterapia na Migração de Células de Passagem Antiga (p76).**

A Figura 8 demonstra o ensaio de migração celular (24h) comparando os efeitos de LBI e MAG com a migração natural (MN). As rupturas dos grupos foram realizadas através de fricção com ponteira de pipeta, e logo após as células do grupo LBI receberam a aplicação pontual do laser por 10 s e as células do grupo MAG receberam aplicação com o aparelho magneto por 15 s. A imagem 8A mostra células integra. As figuras 8B, D e F demonstram ruptura causada por fricção. A figura 8C e H mostra o infiltrado celular para o local da ruptura decorrente da migração natural após 24 h. A Figura 8 E e H demonstra o infiltrado celular após o uso do LBI, onde foi notado maior número de células em comparação ao grupo MN após 24 h. As Figuras 8G e H mostram o efeito do MAG em relação à ruptura após 24h, notando-se a reorganização celular.



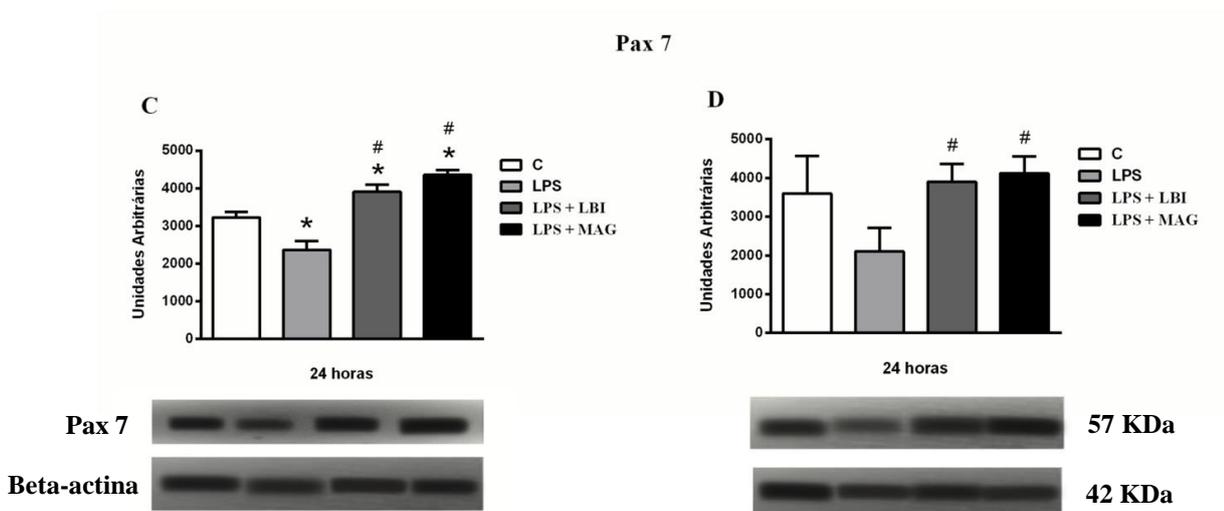
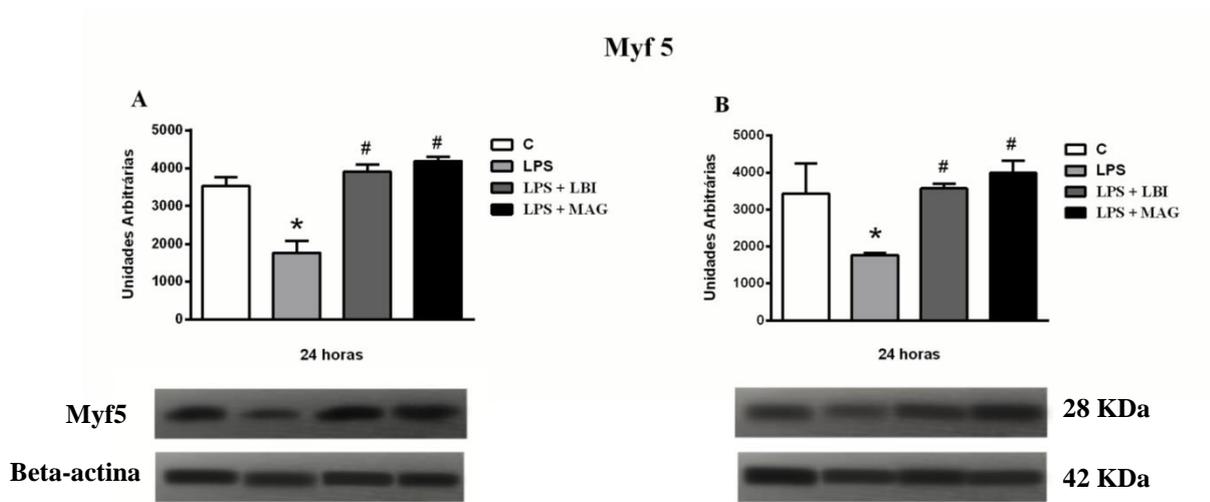
H

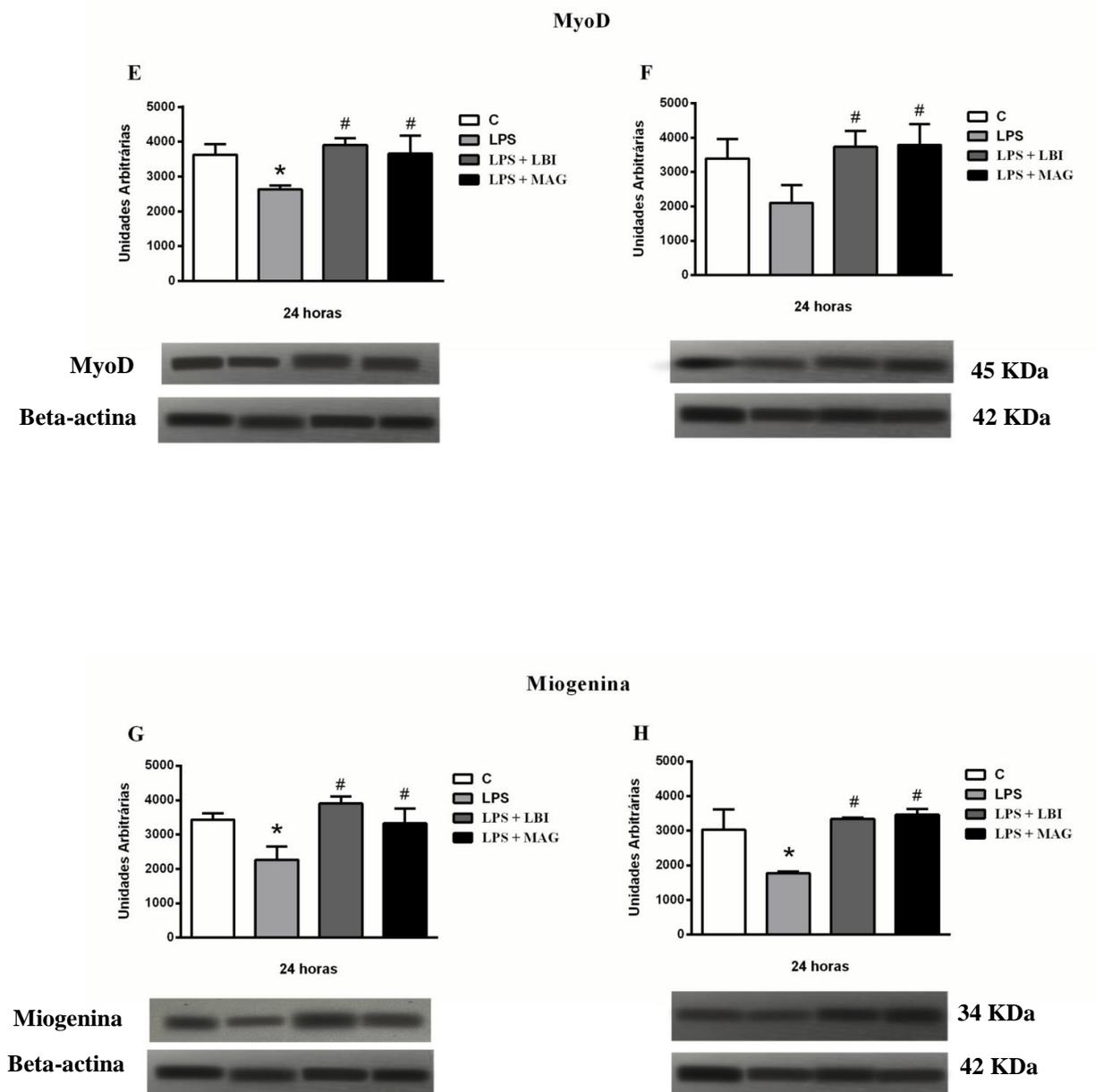


**Figura 8. Efeito do LBI e MAG na migração de células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> de passagem antiga.** (A) Células integras, (B, D e F) ruptura causada por fricção, (C) migração natural após 24h. Migração após 24h com uso do LBI660nm (E) e migração após 24h com utilização da MAG (G). A contagem de células foi realizada utilizando o programa imageJ, onde foi calculada a média de quatro imagens. Barra de escala  $200\ \mu\text{m}$  e objetiva de 10x. Em (H), gráfico que mostra contagem de células de quatro imagens, \*  $p < 0,05$  vs C; #  $p < 0,05$  vs Lesão+MN. (One-way ANOVA).

#### **4.5 Efeito da Terapia com LBI e Magnetoterapia na Expressão de Proteínas Envolvidas nas Vias de Diferenciação e Regeneração Muscular.**

A análise da expressão de proteínas foi realizada através do método de western blot para avaliar os níveis de MyF5, Pax 7, MyoD e Miogenina envolvidos na diferenciação e regeneração muscular, para células de passagem nova e antiga. O grupo com LPS nas células de passagem nova, mostra diminuição significativa de todos os fatores miogênicos avaliados para MyF5, Pax 7, MyoD e Miogenina, em relação ao grupo controle. A aplicação do LBI, assim como MAG, aumentou significativamente a expressão desses fatores miogênicos para MyF5, Pax 7, MyoD e Miogenina, respectivamente em relação ao grupo LPS (Fig. 9 A, C, E e G). Nas células de passagem antiga, o LPS teve diminuição significativa de Myf 5 e Miogenina em relação ao grupo controle (Fig. 9 B e H). As terapias de LBI e MAG elevaram os níveis em relação ao grupo LPS para MyF5, Pax 7, MyoD e Miogenina (Fig. 9 B, D, F e H). A  $\beta$ -actina foi utilizada como controle de carregamento.

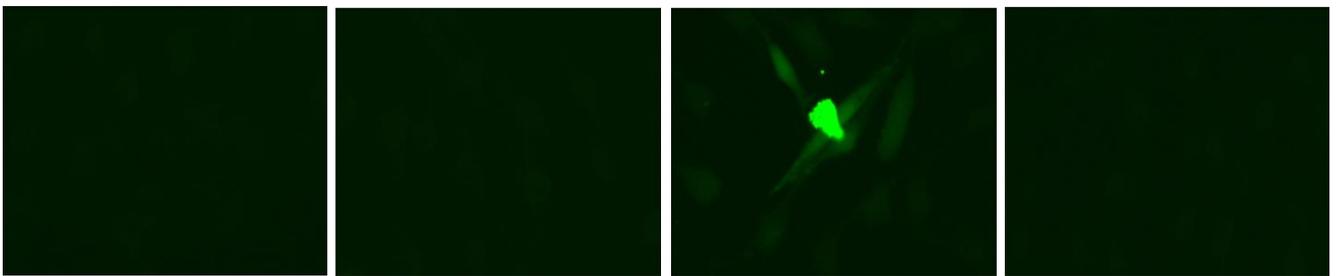




**Figura 9. Efeito do LBI e MAG na expressão de proteínas envolvidas nas vias de diferenciação e regeneração em células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> de passagem nova (p6) e antiga (p76)** Gráficos e bandas imunoreativas mostrando o nível de proteína nas células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> incubadas com LPS em células de passagem nova (A, C, E e G) e células de passagem antiga (B, D, F e H), o controle utilizado era de células sem LPS. Foi feito tratamento com LBI (660nm) e MAG analisado após 24 h. A  $\beta$ -actina foi usada como controle de carregamento. Os experimentos foram realizados em triplicata, e o valor relativo da intensidade da banda foi quantificado. \* $p < 0,05$  versus grupo controle; # $p < 0,05$  versus grupo LPS.

#### 4.6 Efeito da Terapia com LBI e Magnetoterapia na Concentração de Cálcio Intracelular Causada Pelo Uso de LPS.

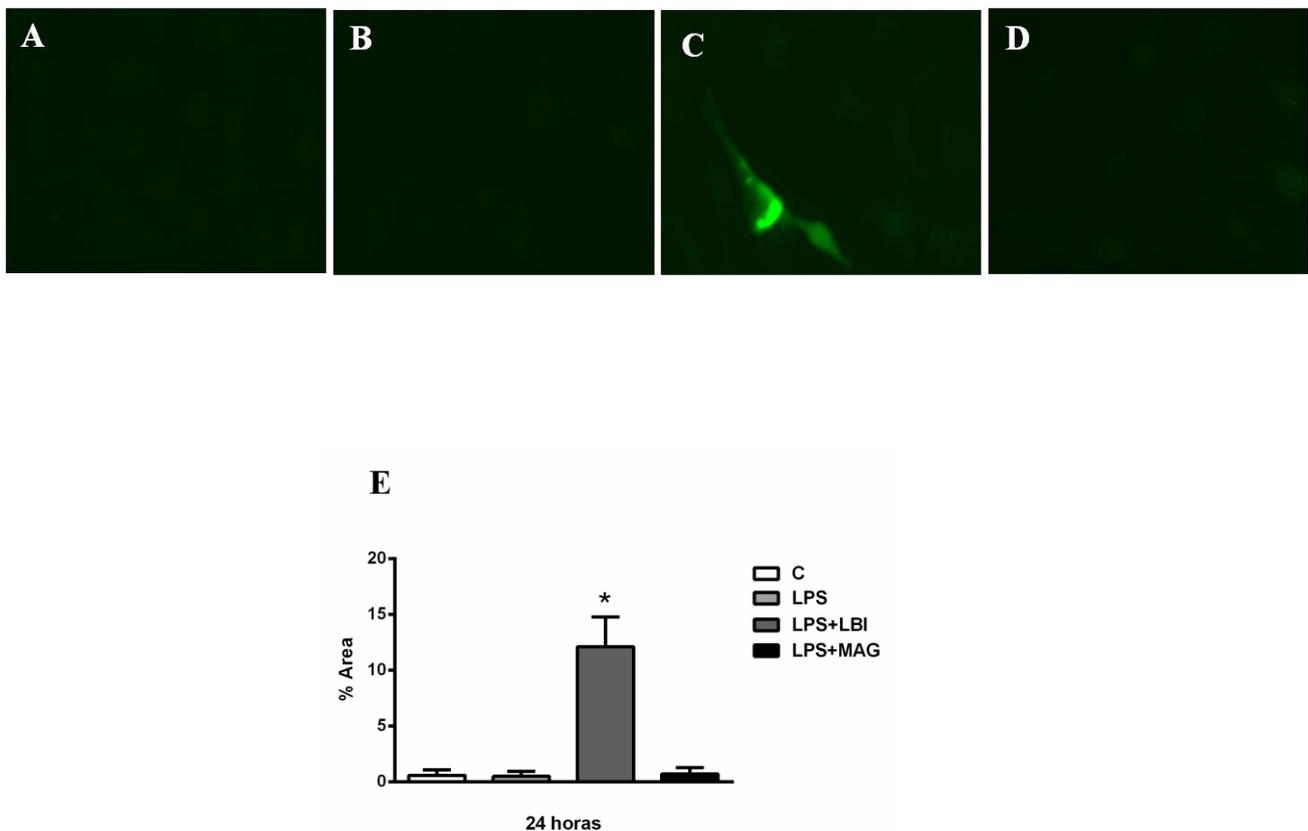
A mensuração de Fluo-4 do revelou que a concentração de cálcio intracelular esta aumentada em células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> de passagem nova irradiadas com LBI (fig. 10 C). Nos demais grupos não houve elevação significativa da concentração de cálcio intracelular (fig. 10 B, C e D).



**Figura 10.** Efeito do LBI e MAG na concentração de cálcio intracelular causada pelo uso de LPS em células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> de passagem nova (p6). As concentrações intracelulares de cálcio, foram avaliadas pela medição do fluxo de oxigênio sensível a cálcio-4 (verde) nas células musculares C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> (A) controle, (B) LPS, (C) LPS+LBI e (D) LPS + MAG. Em (E) gráfico que mostra a intensidade de fluorescência de cálcio nas células musculares C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os dados expressos como média  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$  em relação ao controle e \* $p < 0,05$  em relação aos grupos C, LPS e MAG+LPS. (One-way ANOVA).

#### 4.7 Efeito da Terapia com LBI e Magnetoterapia na Concentração de Cálcio Intracelular Causada Pelo Uso de LPS.

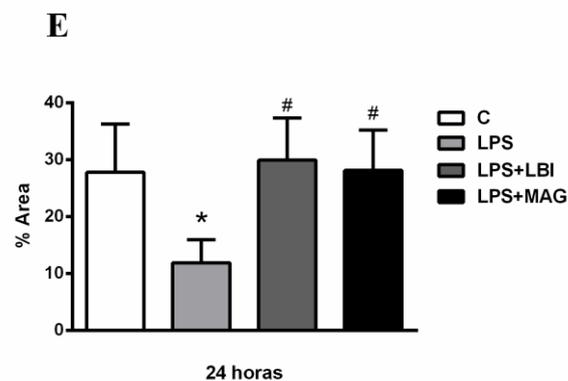
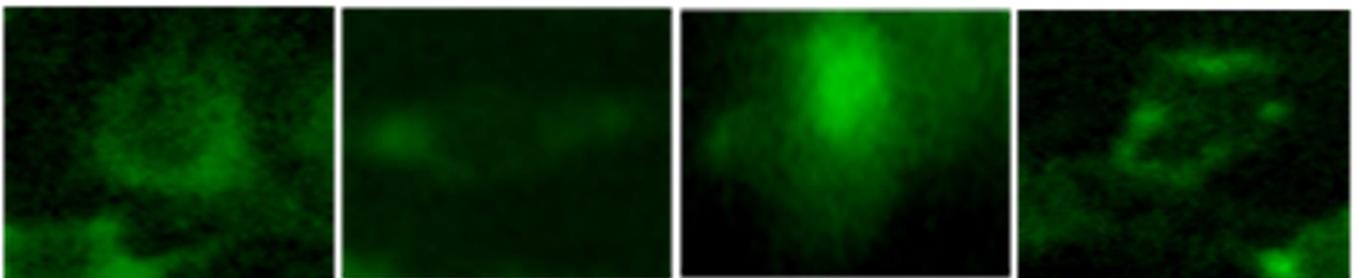
A mensuração de Fluo-4 do revelou que a concentração de cálcio intracelular esta aumentada em células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> de passagem antiga irradiadas com LBI (fig. 11 C). Nos demais grupos não houve elevação significativa da concentração de cálcio intracelular (fig. 11 B, C e D).



**Figura 11. Efeito do LBI e MAG na concentração de cálcio intracelular causada pelo uso de LPS em células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> de passagem antiga (p76).** As concentrações intracelulares de cálcio, foram avaliadas pela medição do fluxo de oxigênio sensível a cálcio-4 (verde) nas células musculares C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> (A) controle, (B) LPS, (C) LPS+LBI e (D) LPS + MAG. Em (E) gráfico que mostra a intensidade de fluorescência de cálcio nas células musculares C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os dados expressos como média ± SEM. \*p < 0,05 em relação ao controle (One-way ANOVA).

#### 4.8 Efeito da Terapia com LBI e Magnetoterapia na Concentração do Potencial de Membrana Causada Pelo Uso de LPS.

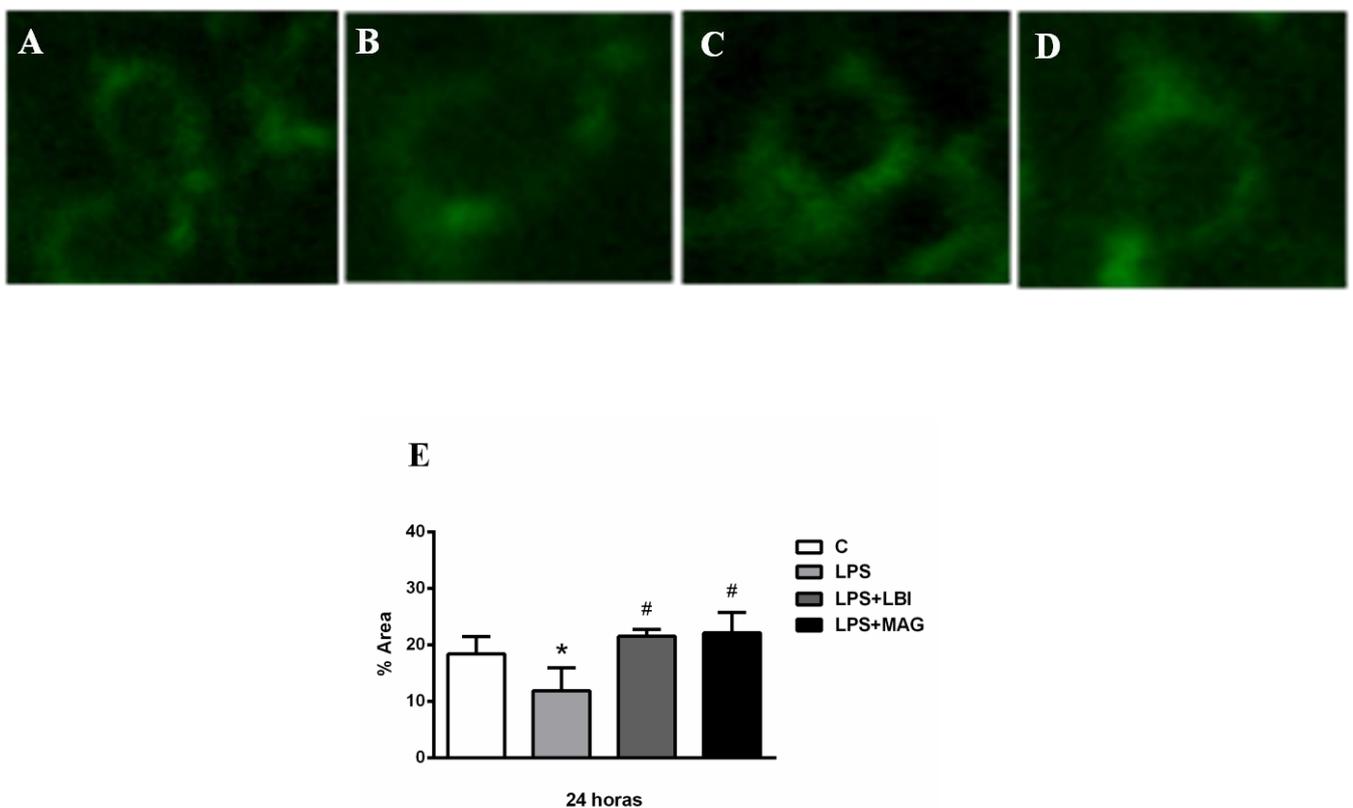
A mensuração de TRME em células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> de passagem nova, revelou diminuição do potencial de membrana mitocondrial no grupo LPS em relação ao grupo controle (Fig. 12 A e B). Os grupos tratados com LBI e Magneto tiveram aumento significativo em relação ao grupo LPS (Fig. 12 C e D).



**Figura 12.** Efeito do LBI e da MAG na concentração do potencial de membrana de mioblastos causada pelo uso de LPS em células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> de passagem nova (p6). As concentrações do potencial de membrana, foram avaliadas pela medição do fluxo de oxigênio sensível ao TRME (verde) nas células musculares C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>:(A) controle, (B) LPS, (C) LPS+LBI e (D) LPS + MAG. O gráfico mostra a intensidade de fluorescência nas membranas das células musculares C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>(E). Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os dados expressos como média  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$  em relação ao controle e # $p < 0,05$  em relação ao grupo LPS. (One-way ANOVA).

#### 4.9 Efeito da Terapia com LBI e Magnetoterapia na Concentração do Potencial de Membrana Causada Pelo Uso de LPS.

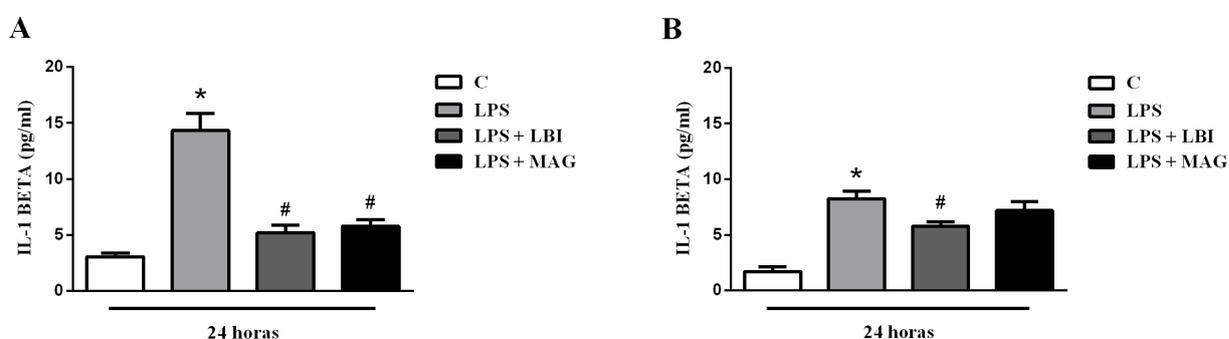
A mensuração de TRME em células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> de passagem antiga, revelou diminuição na concentração de potencial de membrana mitocondrial no grupo LPS em relação ao grupo controle (Fig. 13 A e B). Os grupos tratados com LBI e Magneto tiveram aumento significativo em relação ao grupo LPS (Fig. 13 C e D).



**Figura 13. Efeito do LBI e MAG na concentração do potencial de membrana de mioblastos causada pelo uso de LPS em células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> de passagem antiga (p76).** As concentrações do potencial de membrana, foram avaliadas pela medição do fluxo de oxigênio sensível ao TRME (verde) nas células musculares C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>: (A) controle, (B) LPS, (C) LPS+LBI e (D) LPS + MAG. O gráfico mostra a intensidade de fluorescência nas membranas das células musculares C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> (E). Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os dados expressos como média ± SEM. \*p < 0,05 em relação ao controle e # p < 0,05 em relação ao grupo LPS. (One-way ANOVA).

#### 4.10 Efeito da Terapia com LBI e Magnetoterapia na Liberação de IL-1 $\beta$ em Células de Passagem Nova (p6) e Passagem Antiga (p76) Estimuladas por LPS.

Os resultados em células de passagem nova demonstraram uma elevação de citocina inflamatória IL-1 $\beta$  em células do grupo LPS em relação ao controle. Os grupos LPS+LBI e LPS+MAG apresentaram uma redução significativa dessa citocina em relação ao uso de LPS (C:  $3,06 \pm 0,32$  pg/ml; LPS:  $14,33 \pm 1,52$  pg/ml; LPS+LBI:  $5,19 \pm 0,70$  pg/ml; LPS+MAG:  $5,78 \pm 0,57$  pg/ml) (Fig.14 A). Nas células de passagem antiga, os resultados demonstraram um aumento da citocina inflamatória IL-1 $\beta$  nas células do grupo LPS em relação ao controle. O grupo LPS+LBI apresentou diminuição significativa dessa citocina em relação ao grupo LPS. O grupo LPS+MAG não denotou mudança significativa (C:  $1,70 \pm 0,40$  pg/ml; LPS:  $8,26 \pm 0,64$  pg/ml; LPS+LBI:  $5,77 \pm 0,42$  pg/ml; LPS+MAG:  $7,21 \pm 0,77$  pg/ml) (Fig.14 B).

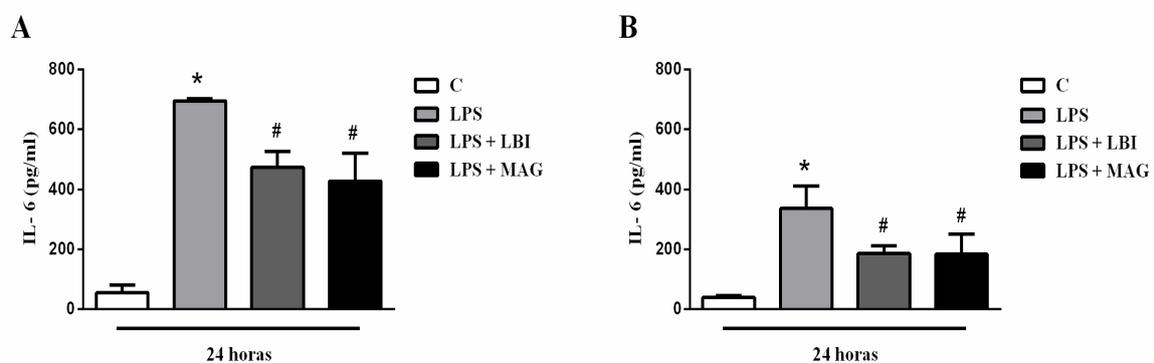


**Figura 14. Avaliação da liberação do mediador IL-1 $\beta$  em células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> de passagem nova (p6) e passagem antiga (p76).** Células musculares C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 h para adesão celular. Após esse período, as células de passagem nova (A) e passagem antiga (B) receberam estímulo de LPS por 24 horas. Após 24h do LPS aplicado, as células do grupo LPS+LBI receberam a aplicação pontual do laser por 10 s e as células do grupo LPS+MAG receberam aplicação com o aparelho magneto por 15 s. Cada valor representa a média  $\pm$  SEM de três experimentos independentes. \* $p < 0,05$  vs C. # $p < 0,05$  vs LPS. (One-way ANOVA).

#### 4.11 Efeito da Terapia com LBI e Magnetoterapia na Liberação de IL-6 em Células de Passagem Nova (p6) e Passagem Antiga (p76) Estimuladas por LPS.

O perfil da dosagem da citocina IL-6 nas células de passagem novas apresentou-se semelhante aos resultados anteriores, sendo que o grupo LPS aumentou a produção desta citocina. Já os grupos LPS+LBI e LPS+MAG diminuíram essa produção (C  $54,93 \pm 25,47$  pg/ml; LPS  $695,33 \pm 6,42$  pg/ml; LPS+LBI  $473,33 \pm 53,67$  pg/ml; LPS+MAG  $427,66 \pm 92,35$  pg/ml) (Fig.15 A).

No perfil da dosagem da citocina IL-6 nas células de passagem antiga, o grupo LPS também aumentou a produção desta citocina em relação ao grupo C e os grupos LPS+LBI e LPS+MAG incorreu em decréscimo significativodessa produção (C  $39,62 \pm 5,75$  pg/ml; LPS  $336,6 \pm 75,14$  pg/ml; LPS+LBI  $186,63 \pm 25,55$  pg/ml; LPS+MAG  $183,62 \pm 66,57$  pg/ml) (Fig.15 B).

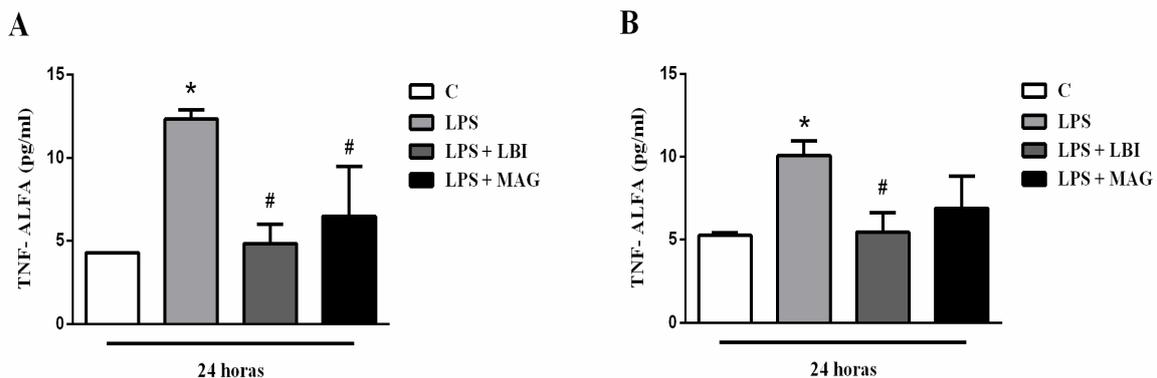


**Figura 15. Avaliação da liberação do mediador IL-6 em células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> de passagem nova (p6) e passagem antiga (p76).** Células musculares C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 h para adesão celular. Após esse período, as células passagem nova (A) e passagem antiga (B) receberam estímulo de LPS por 24 horas. Após 24h do LPS aplicado, as células do grupo LPS+LBI receberam a aplicação pontual do laser por 10 s e as células do grupo LPS+MAG receberam aplicação com o aparelho magneto por 15 s. Cada valor representa a média  $\pm$  SEM de três experimentos independentes. \*  $p < 0,05$  vs C. #  $p < 0,05$  vs LPS. (One-way ANOVA).

#### 4.12 Efeito da terapia com LBI e Magnetoterapia na Liberação de TNF- $\alpha$ em Células de Passagem Nova (p6) e Passagem Antiga (p76) Estimuladas por LPS.

Quanto a liberação do TNF- $\alpha$  nas células de passagem nova, houve uma elevação no grupo LPS, enquanto nos grupos tratados LPS+LBI e LPS+MAG obtiveram uma redução significativa (C  $4,29 \pm 0,01$  pg/ml; LPS  $12,33 \pm 0,57$  pg/ml; LPS+LBI  $4,83 \pm 1,15$  pg/ml; LPS+MAG  $6,49 \pm 2,98$  pg/ml) (Fig.16A).

Na liberação do TNF- $\alpha$  nas células de passagem antiga, também houve aumento no grupo LPS em relação ao grupo C. O grupo LPS+LBI teve diminuição enquanto o grupo LPS+MAG não se observou declínio significativo (C  $5,27 \pm 0,15$  pg/ml; LPS  $10,06 \pm 0,90$  pg/ml; LPS+LBI  $5,45 \pm 1,17$  pg/ml; LPS+MAG  $6,90 \pm 1,94$  pg/ml) (Fig.16 B).

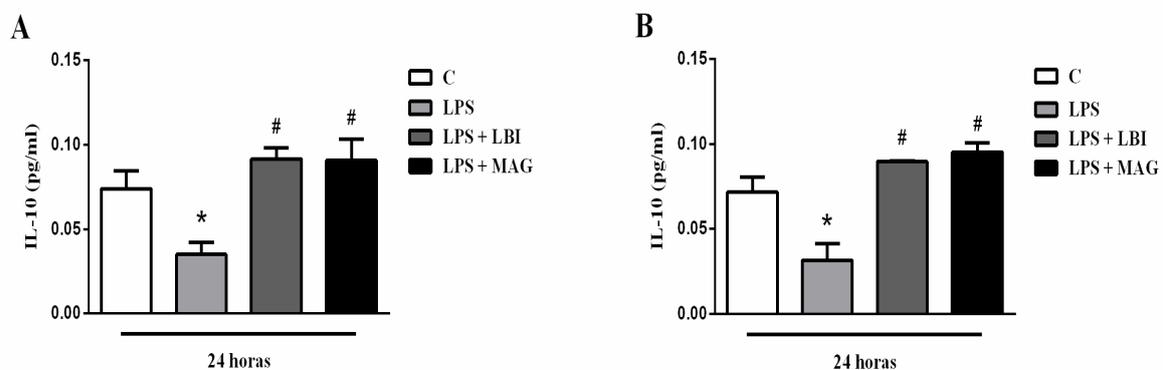


**Figura 16. Avaliação da liberação do mediador TNF- $\alpha$  em células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> de passagem nova (p6) e passagem antiga (p76).** Células musculares C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 h para adesão celular. Após esse período, as células passagem nova (A) e passagem antiga (B) receberam estímulo de LPS por 24 horas. Após 24h do LPS aplicado, as células do grupo LPS+LBI receberam a aplicação pontual do laser por 10 s e as células do grupo LPS+MAG receberam aplicação com o aparelho magneto por 15 s. Cada valor representa a média  $\pm$  SEM de três experimentos independentes. \* $p < 0,05$  vs C. # $p < 0,05$  vs LPS; (One-way ANOVA).

#### 4.13 Efeito da Terapia com LBI e Magnetoterapia na Liberação de IL-10 em Células de Passagem Nova (p6) e Passagem Antiga (p76) Estimuladas por LPS.

Quando analisado a produção da citocina anti-inflamatória IL-10 nas células de passagem nova, foi observado uma diminuição no grupo LPS em relação ao grupo C, e um incremento significativo desse mediador nos grupos LPS+LBI e LPS+MAG em relação ao grupo LPS (C  $0,07 \pm 0,01$  pg/ml; LPS  $0,03 \pm 0,01$  pg/ml; LPS+LBI  $0,09 \pm 0,00$  pg/ml; LPS+MAG  $0,09 \pm 0,01$  pg/ml)(Fig.17 A).

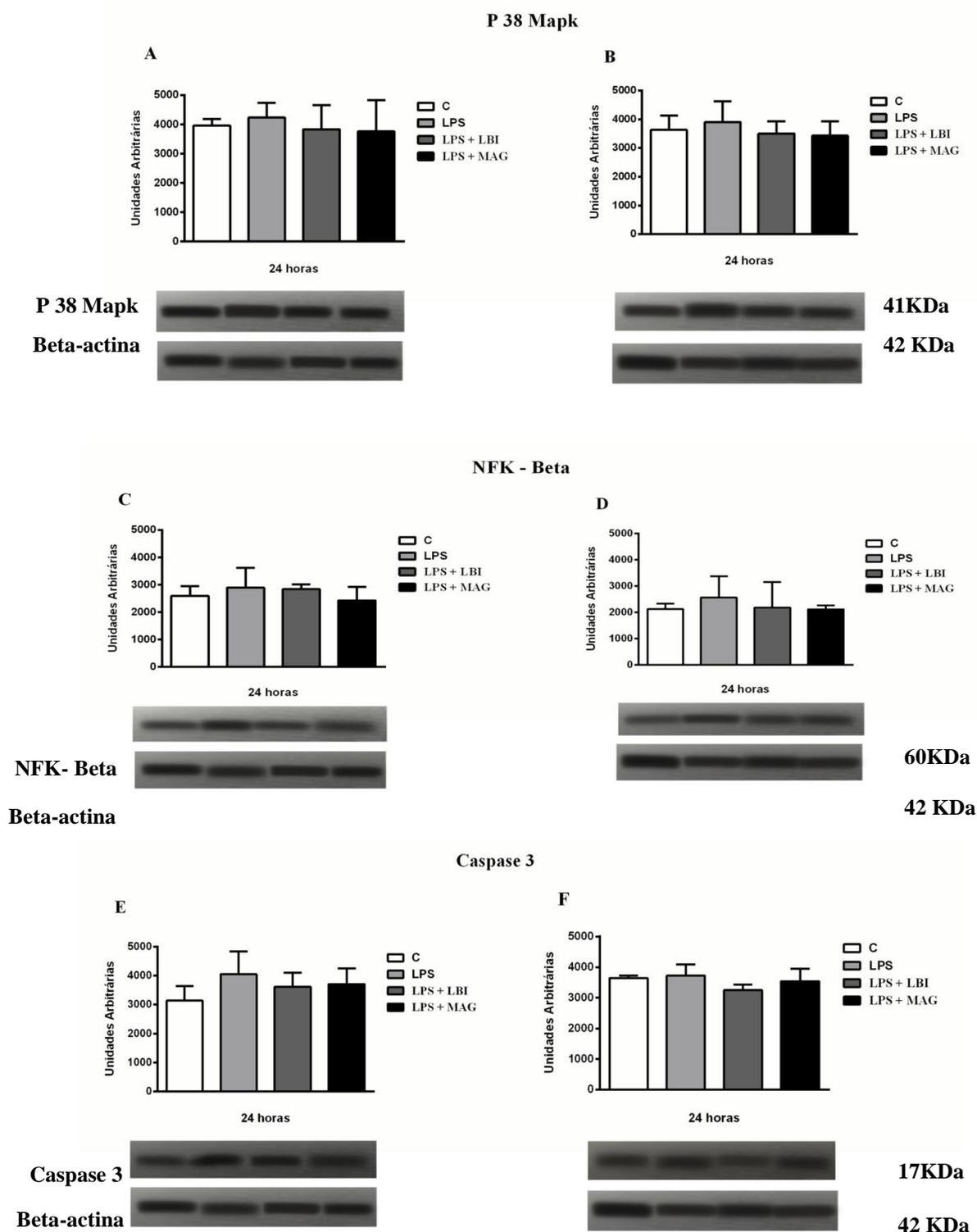
Quando analisado a produção da citocina IL-10 nas células de passagem antiga, foi observado uma diminuição no grupo LPS em relação ao grupo C, e elevação significativa desse mediador nos grupos LPS+LBI e LPS+MAG em relação ao grupo LPS (C  $0,07 \pm 0,00$  pg/ml; LPS  $0,03 \pm 0,01$  pg/ml; LPS+LBI  $0,08 \pm 0,00$  pg/ml; LPS+MAG  $0,09 \pm 0,01$  pg/ml) (Fig.17 B).



**Figura 17. Avaliação da liberação do mediador IL-10 em células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> de passagem nova (p6) e passagem antiga (p76).** Células musculares C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 h para adesão celular. Após esse período, as células passagem nova (A) e passagem antiga (B) receberam estímulo de LPS por 24 horas. Após 24h do LPS aplicado, as células do grupo LPS+LBI receberam a aplicação pontual do laser por 10 s e as células do grupo LPS+MAG receberam aplicação com o aparelho magneto por 15 s. Cada valor representa a média ± SEM de três experimentos independentes. \* p<0,05 vs C. #p<0,05 vs LPS; (One-way ANOVA).

#### **4.14 Efeito da Terapia com LBI e Magnetoterapia na Expressão de p38 MAPK, NFk-B e caspase-3**

A análise da expressão de proteínas foi realizada através do método de western blot para avaliar os níveis de P 38 Mapk, NFK- Beta e Caspase 3 para células de passagem nova e antiga. Não houve diferença significativa na expressão dessas proteínas, em nenhum dos grupos estudados. Células de passagem nova (Fig. 18 A, C e E). Células de passagem Antiga (Fig. 18 B,D e F). A  $\beta$ -actina foi utilizada como controle de carregamento.



**Figura 18. Efeito do LBI e MAG na expressão de proteínas envolvidas na fase de inflamação em células  $C_2C_{12}$  de passagem nova (p6) e antiga (p76).** Gráficos e bandas imunorreativas mostrando o nível de proteína P 38 Mapk, NFK- Beta e Caspase 3 nas células  $C_2C_{12}$  incubadas com LPS. Células de passagem nova (A, C e E) e passagem antiga (B, D e F). Foi feito tratamento com LBI (660nm) e Magneto analisado após 24 h. A  $\beta$ -actina foi usada como controle de carregamento. Todos os experimentos foram realizadas em triplicata, e o valor relativo da intensidade da banda foi quantificado.

## 5. DISCUSSÃO

Em pleno Século XXI, qualquer dificuldade que venha a reduzir a mobilidade na nossa vida cotidiana, acaba motivando os pesquisadores, desencadeando pesquisas que acabam levando ao desenvolvimento de equipamentos e inovações na área médica em conjunto com bioengenharia, engenharia cibernética, mecatrônica ou mesmo engenharia robótica.

Muitas são as patologias musculoesqueléticas que acometem o indivíduo. Dentre elas, doenças musculares como doença de Duchene, dermatomiosites, miastenia grave, ou lesões diretamente no tecido muscular, como infarto do miocárdio. Todas estas são problemas que acometem enfermos, os quais dependem diretamente de reparação e cicatrização tissular no mais breve tempo possível.

Neste trabalho foi investigado o uso de terapias inovadoras não invasivas, como o laser de baixa intensidade (LBI) e a Magnetoterapia (MAG), em células musculares C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> de camundongos, incubadas com lipopolissacarídeo (LPS).

Segundo Johns,<sup>(64)</sup> a cultura celular permite que o investigador tenha um controle rigoroso sobre diversas variáveis do processo e possa fazer questionamentos de maneira mais sistemática. Portanto, estudos *in vitro* avaliando o potencial do LBI e MAG são importantes complementos dos estudos *in vivo*, e podem trazer maiores conhecimentos de forma a permitir a utilização desse recurso de forma mais eficaz e segura.

As células satélites são responsáveis e indispensáveis para o processo de regeneração do músculo esquelético.<sup>(65)</sup> Estas sobrevivem ao evento traumático inicial e resistem ao ambiente deletério. São células mononucleadas, fusiformes e estão presentes entre a lâmina basal e a membrana plasmática da fibra muscular. Estas células-tronco latentes são consideradas mioblastos inativos que podem proliferar após qualquer pequena lesão para dar origem a novos mioblastos.<sup>(66)</sup>

Em estudo de Sharples et al., (2011)<sup>(67)</sup>, utilizando a mesma célula do nosso estudo e com 58 passagens observaram evidências de deterioração da capacidade de diferenciação, observada pela diminuição de fatores como MyoD e miogenina, como consequência de múltiplas duplicações populacionais em células do músculo esquelético que potencialmente contribuiriam para o processo de envelhecimento. Assim, neste estudo utilizamos células que sofreram 6 passagens e foram denominadas de células de passagem nova p(6) e células que sofreram 76 passagem e foram denominadas de células antigas p(76) com o objetivo de verificar se existe diferença nas terapias estudadas em diferentes estágios de passagem celular.

Utilizamos o LPS como estímulo para as células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>. Nossos resultados demonstraram que o LPS apresentou efeito tóxico nas células musculares, resultando na diminuição da viabilidade celular. Esses resultados corroboram os efeitos citotóxicos do LPS em células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub><sup>(68)</sup> confirmando o potente efeito citotóxico causado pelo LPS em células musculares.

A literatura sugere a fotobiomodulação (FBM), utilizando o laser de baixa intensidade (LBI) ou o light emitting diode (LED), como uma terapia alternativa para o tratamento de doenças musculoesqueléticas.<sup>(69)</sup>No entanto, os mecanismos biológicos relacionados à proteção causado pela FBM contra os efeitos deletérios sobre o envelhecimento do músculo esquelético não são compreendidos. Além disso, não existem dados na literatura sobre a Magnetoterapia e células musculares isoladas.

Nossos resultados demonstram que tanto o LBI quanto a MAG foram capazes de aumentar a viabilidade e a integridade de células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> na presença de LPS, esse resultado foi semelhante para as células de passagem nove e antiga. Da mesma maneira, já foi demonstrado que o LBI aumentou a viabilidade de células dendríticas, fibroblastos e células epiteliais em resposta ao LPS.<sup>(70, 71)</sup> Cossarizza em 1989<sup>(72)</sup> demonstrou que a

aplicação de campos eletromagnéticos pulsáteis de extrema baixa frequência são capazes de aumentar a proliferação de linfócitos de idosos, quando submetidos a estímulo pela fito-hemaglutinina. Ainda, Ikeda et al.<sup>(73)</sup> avaliaram o efeito de campos eletromagnéticos pulsáteis também sobre culturas de mioblastos C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>, porém os parâmetros dosimétricos utilizados foram diferentes, e as células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> foram cultivadas já em meio de diferenciação. Estes autores verificaram que existe uma diferenciação das células musculares em osteoblastos e condroblastos em resposta ao tratamento, nos parâmetros de 1,5 MHz a uma intensidade de 70 mW/cm<sup>2</sup> por 20 min.

Como os resultados demonstraram que o tratamento com o LBI e MAG, causaram citoproteção em células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> quando incubadas com o LPS, fomos verificar o efeito do LBI e da MAG sobre as características migratórias dessas células em situação de lesão, efeito importante para o processo de regeneração muscular.<sup>(74)</sup> Nosso resultado revelou que, além da citoproteção em células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> causada pelo LBI e MAG essas células também foram capazes de migrar, verificado através do fechamento da ferida realizada em lamínulas, o que pode significar um dos mecanismos para a melhora no processo de regeneração muscular causado pelo LBI.

Após a lesão tecidual, a miogênese é iniciada pela ativação das células miogênicas através da expressão sequencial de fatores de transcrição e ativação de genes que culminam na regeneração tecidual. As células satélites quiescentes expressam Pax7, enquanto a ativação da expressão de MyoD, e a miogenina é expressa posteriormente no processo de diferenciação. A diferenciação envolve várias alterações celulares, incluindo fisiologia, arquitetura estrutural e funções. Portanto, todo evento no curso da diferenciação deve ser acompanhado por expressão coordenada e/ou repressão de certos subconjuntos de genes.<sup>(75)</sup> Além disso, o fator miogênico Pax7 é um regulador chave da

diferenciação de células musculares em populações específicas de células-tronco adultas e é um bom candidato para distinguir células-satélite ativadas. <sup>(76)</sup>

Ainda, a diferenciação das células musculares esqueléticas dos mamíferos é regulada por membros da família MyoD de fatores reguladores miogênicos (MRFs). Estes incluem MyoD, Myf5, miogenina e MRF4.<sup>(77)</sup> Foi relatado que a miogenina e o MRF4 desempenham um papel na diferenciação terminal dos mioblastos.<sup>(78)</sup> Os MRFs e Pax7 parecem desempenhar papéis críticos durante a ativação, proliferação e diferenciação de células satélites. <sup>(79)</sup>

Nossos resultados demonstraram que no período de 24 h, o LPS causou diminuição de todos dos fatores miogênicos estudados (Pax7, Myf5, MyoD e miogenina) nas células novas e de Myf5 e miogenina nas células de passagem antiga. Esses dados sugerem que células mais velhas apresentam menos capacidade de regeneração. No presente trabalho, o grupo com aplicação tanto do LBI quanto do magneto se mostrou eficaz causando aumento da expressão dos fatores miogênicos estudados, envolvidos na fase de regeneração. Esses resultados confirmam que os usos de campos eletromagnéticos são capazes de incrementar a proliferação e regeneração celular e podem ser uma alternativa de tratamento de doenças degenerativas esqueléticas em idosos.

Já foi demonstrado que o LBI é capaz de fornecer e induzir respostas fotobioquímicas-biológicas no interior das células e tecido-alvos, como também alterar os níveis de ROS, após a absorção de luz. <sup>(39)</sup> Além disso, estudos confirmam que a ação da LBI e seus efeitos anti-inflamatórios estão diretamente relacionados à diminuição das citocinas pró-inflamatórias, bem como da quantidade de mediadores químicos. <sup>(80-82)</sup> Neste estudo avaliamos a capacidade do LBI e MAG induziram um efeito anti-inflamatório, caracterizado por inibição diferencial ou total de citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ . Verificamos diminuição de todas as citocinas pró-inflamatórias pelo LBI e

MAG e pelas duas situações de passagem celular. Também houve resultado positivo quando avaliamos a citocina anti-inflamatória IL-10, no qual os grupos com terapia LBI e MAG denotaram incremento em relação ao grupo LPS. Esses dados corroboram com a literatura que mostra diminuição dessas citocinas pró- e anti-inflamatórias em modelos de inflamação.<sup>(83)</sup> Ainda, Albertini et al.<sup>(84)</sup> observaram a diminuição da expressão de mRNA de TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 após irradiação com LBI, tanto em comprimentos de onda 660 nm quanto em 684 nm,<sup>(85)</sup> comprimento de onda também usado em nosso estudo com sucesso. Não existe dados da literatura quanto ao efeito da MAG em respostas inflamatórias.

Existem alguns estudos que mostram que sinais de Ca<sup>2+</sup> apresentam efeitos que podem estimular a proliferação celular. Por exemplo, Ca<sup>2+</sup> nuclear ativa fatores de transcrição CREB e Elk-1<sup>(86,87)</sup> e estimula a atividade intracelular da PKC.<sup>(88)</sup> Ademais, a literatura demonstra que o LBI, em diferentes comprimentos de onda, pode afetar a captação de Ca<sup>2+</sup> em vários modelos.<sup>(89)</sup> Os resultados obtidos em nosso estudo demonstraram aumento significativo de cálcio intracelular nas células que foram irradiadas com comprimento de onda de  $\lambda$ 660nm. Neste sentido, Young et al. (1990),<sup>(90)</sup> usando o LBI no comprimento de onda de 660 nm, verificaram que a terapia de luz pode estimular o influxo do íon Ca<sup>2+</sup> na célula. Ainda, o efeito do LBI He-Ne de 632,8 nm causou um aumento da concentração intracelular de cálcio em linfócitos humanos e neurônios de rato, *in vitro*.<sup>(91)</sup> Lan et al. (1988)<sup>(92)</sup> identificaram que um dos primeiros eventos induzidos pelo laser He-Ne 632,28 nm que envolve atividades imediatas de incremento do citocromo C oxidase e níveis intracelulares elevados de Ca<sup>2+</sup>. Wang et al. (2014)<sup>(93)</sup> mostraram que a irradiação pelo LBI na faixa visível e no infravermelho, bem como na UV, pode modular a função e a expressão dos canais iônicos. Como canais de íons permeável ao Ca<sup>2+</sup>, sua ativação pode contribuir para o acréscimo induzido pelo LBI

no  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular que desencadeia a desgranulação e a liberação endocitótica de ATP. Nesse sentido, a literatura mostra que a irradiação com o LBI, nos comprimentos de onda de 685 e 830 nm, impediu a liberação de ATP extracelular e aumentou seus níveis intracelulares em células C2C12 que sofreram lesão por veneno botrótico, esses autores sugerem que o efeito biomodulatório causado pela irradiação do LBI nos níveis de ATP possa iniciar uma cascata de sinalização que promova a citoproteção celular observada no estudo.<sup>(94)</sup> É possível que em nosso estudo o aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  tenha favorecido o aumento de ATP e com isso iniciado a cascata de sinalização promovendo a melhora da regeneração celular.

Quando avaliada a concentração do potencial de membrana causada pelo uso de LPS, os grupos com tratamento de LBI e MAG tiveram elevação significativa em relação ao grupo LPS, nas duas amostras de passagem de células (nova e antiga). Segundo Zanotti et al.<sup>(95)</sup>, doses excitatórias (até 8J/cm<sup>2</sup>) são indicadas quando o objetivo da intervenção inclui a potencialização da bomba sódio/potássio; estímulo à produção de ATP; restabelecimento do potencial de membrana; aumento do metabolismo e proliferação celular.

A família das proteínas quinases ativadas por mitogênio (MAPKs) está associada a numerosas respostas celulares, como proliferação, mitogênese, oncogênese diferenciação e apoptose (Zhang et al.).<sup>(96)</sup> A p38 MAPK foi originalmente descoberta como alvo molecular para a inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL-1. Neste trabalho foi avaliada a expressão da p38 MAPK no tempo de 24 h após a adição do LPS, nossos resultados demonstraram que o LPS não causou aumento dessa proteína nesse período em relação ao controle, assim como os grupos com terapia LBI e MAG, não demonstraram mudança significativa em relação ao LPS, é possível que

o período em que estudamos (24h) não tenha sido o ideal para avaliarmos a expressão dessa citocina.

O presente estudo também avaliou a expressão da proteína NFκ-B, está liberada na fase de inflamação. A família de proteínas NF-κB/Rel, originalmente descrita por Sen e Baltimore(1986)<sup>(97)</sup> é constituída por fatores de transcrição que medeiam a resposta celular frente a uma diversidade de estímulos ligados à inflamação, infecção e apoptose, tais como TNF-Alfa, IL1β, espécies reativas do oxigênio (ROS), agentes anti-neoplásicos e radiação gama, como descreve Fraser, (2006).<sup>(98)</sup> O estímulo promovido pelo TNF-Alfa e IL-1β induz, não apenas estimulação do fator de transcrição, como o aumento da regulação da própria expressão dessas citocinas, pelo mesmo mecanismo.<sup>(99)</sup> Em função da importância do NF-κB nas doenças inflamatórias crônicas, há crescente interesse no estabelecimento de estratégias de inibição de sua ativação<sup>(98)</sup> que é realmente efetiva em promover a redução na expressão de citocinas pró-inflamatórias, como TNF-Alfa e IL-6, como demonstrado, por exemplo, por Wu et al.,<sup>(100)</sup> Fong et al., Greten et al.,<sup>(101, 102)</sup> obtiveram resultados em suas pesquisas, onde revelam outro lado do NF-κB, tendo um papel no término da inflamação. Neste estudo, a expressão para a proteína NFκ-B não demonstrou diferença significativa, quando avaliado o grupo LPS em relação ao grupo controle, e também quando avaliado os grupos com terapia utilizada, em relação ao grupo LPS. É possível que tempo em que analisamos não foi o ideal para vermos modulação na expressão dessa proteína.

## CONCLUSÕES

- ✓ A terapia do LBI e MAG aumentaram a viabilidade e a integridade celular;
- ✓ A terapia com LBI e MAG aumentaram a migração das células;
- ✓ A terapia com LBI e MAG aumentaram a expressão de proteínas MyF5, Pax 7, MyoD, Miogenina, envolvidas nas vias de diferenciação e regeneração muscular;
- ✓ O uso do LBI aumenta a concentração de cálcio intracelular causada pelo uso de LPS;
- ✓ A terapia de LBI e MAG aumentaram a concentração do potencial de membrana causada pelo uso de LPS;
- ✓ O LBI, como também a MAG, mostraram-se eficazes, diminuindo a liberação de mediadores pró inflamatórios, assim como contribuíram para o aumento da citocina IL-10, anti-inflamatória;
- ✓ A terapia com LBI e MAG não mostrou diferença na expressão de proteínas Caspase 3, p38 Mapk e NFK-B;
- ✓ Os resultados das análises mostraram que nos dois tempos de passagem, nova e antiga (p6 e p76), as células obtiveram melhora em relação aos grupos com lesão. As células com passagem antiga tiveram resposta positiva, quando comparadas com as células de passagem nova.

## **CONSIDERAÇÕES FUTURAS**

Em função dos conceitos explorados, análises realizadas e resultados obtidos, sugere-se continuidade de estudos utilizando as terapias de aparelhos com base em energia (LBI e MAG), tendo em pauta objetivos como:

- Analisar o efeito dessas terapias *in vivo*;
- Utilizar as terapias para avaliar recuperação de traumas em articulações;
- Explorar e comparar diferentes tempos de aplicação das terapias;
- Explorar e comparar diferentes dosimetrias dessas terapias.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Narici MV, Maganaris CN, Reeves ND, Capodaglio P. Effect of aging on human muscle architecture. *J Appl Physiol*;95(6):2229-34, 2003
2. Mandelbaum SH, Di Santis EP, Mandelbaum MHS. Cicatrization: current concepts and auxiliary resources - Part I. *Continuing Medical Education*. 78(4):393-410, 2003.
3. Ferrari RJ et al. Processo de Regeneração na Lesão Muscular: uma revisão. In: *Revista Fisioterapia em Movimento*. v.18,p. 63 -71, 2005.
4. Junqueira LCU, Carneiro J. *Biologia Celular e Molecular*. 8ª. Edição. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 352p,2005.
5. Sadeh M, Czyzewski K, Stern LZ. Chronic myopathy induced by repeated Bupivacaine injections. *J. Neurol. Sci.* 67:229-238,1985.
6. Ham RG, St. Clair JA, Meyer SD. Improved media for rapid clonal growth of normal human skeletal muscle satellite cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 280:193-200,1990.
7. Hill M, Goldspink G. Expression and splicing of the insulin-like growth factor gene in rodent muscle is associated with muscle satellite (stem) cell activation following local tissue damage. *Journal of Physiology*. v. 549, n. 2, p. 409-418, 2003.
8. Anderson JE. The satellite cell as a companion in skeletal muscle plasticity: currency, conveyance, clue, connector and colander. *The Journal of Experimental Biology*, v. 209, p. 2276-2292, 2006.
9. Beccafico S, Puglielli C, Pietrangelo T, Bellomo R, Fanò G, Fulle S. Age-Dependent Effects on Functional Aspects in Human Satellite Cells. *Annals of New York Academy of Sciences*. v. 1100, p. 345-352, 2007.
10. Carosio S, Berardinelli MG, Aucello M, Musaro A. Impact of ageing on muscle cell regeneration. *Ageing Res Rev*, 10, 35-42, 2011.
11. Kwak KB, Chung SS, Kim OM, Kang MS, Ha DB, Chung CH. Increase in the level of m-calpain correlates with the elevated cleavage of filamin during myogenic differentiation of embryonic muscle cells. *Biochim Biophys Acta*, 1175, 243-9, 1993.
12. Coulton GR, Morgan JE, Partridge TA, Sloper JC. The mdx mouse skeletal muscle myopathy: I. A histological, morphometric and biochemical investigation. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 14, 53-70, 1988.
13. Tidball JG. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 288, R345-53, 2005.
14. Belcastro AN, Arthur GD, Albisser TA, Raj DA. Heart, liver, and skeletal muscle myeloperoxidase activity during exercise. *J Appl Physiol*, 80, 1331-5, 1996.

15. Merly F, Lescaudron L, Rouaud T, Crossin F, Gardahaut M F. Macrophages enhance muscle satellite cell proliferation and delay their differentiation. *Muscle Nerve*, 22, 724-32, 1999.
16. Teixeira CF, Zamuner SR, Zuliani JP, Fernandes CM, Cruz-Hofling MA, Fernandes I, Chaves F, Gutierrez JM. Neutrophils do not contribute to local tissue damage, but play a key role in skeletal muscle regeneration, in mice injected with Bothrops asper snake venom. *Muscle Nerve*, 28, 449-59, 2003.
17. Summan M, Warren GL, Mercer RR, Chapman R, Hulderman T, Van Rooijen N, Simeonova PP. Macrophages and skeletal muscle regeneration: a clodronate-containing liposome depletion study. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 290, R1488-95, 2006.
18. Turner NJ, Badylak SF. Regeneration of skeletal muscle. *Cell Tissue Res*. 2011.
19. Schultz E, Jaryszak DL, Gibson MC, Albright DJ. Absence of exogenous satellite cell contribution to regeneration of frozen skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil*, 7, 361-7, 1986.
20. Yaffe D, Saxel D. Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature*. 270:725-7, 1977
21. Lee MH, Jang MH, Kim EK, Han SW, Cho SY, Kim CJ. Nitric oxide induces apoptosis in mouse C2C12 myoblast cells. *J Pharmacol Sci*. 97(3):369-76, 2005.
22. Georges B, Galland S, Rigault C, Le Borgne F, Demarquoy J. Beneficial effects of L-carnitine in myoblastic C2C12 cells. Interaction with zidovudine. *Biochem Pharmacol*. 65: 1483-1488, 2003
23. Decary S, Mouly V, Hamida CB, Sautet A, Barbet JP, Butler-Browne GS. Replicative potential and telomere length in human skeletal muscle: Implications for satellite cell-mediated gene therapy. *Hum Gene Ther* 8:1429-1438, 1997.
24. Mota MP, Figueiredo PA, Duarte JA. Teorias biológicas do envelhecimento. *Revista Portuguesa de Ciências do Desporto*; 4(1): 81-110, 2004.
25. Marx J. Chromosome ends catch fire. *Science*. 265(1): 1656-1658, 1994.
26. Lezza AM. et al. Mitochondrial DNA 4977 bp deletion and OH8Dg levels correlate in the brain of aged subjects but not Alzheimer's disease patients. *FASEB J*. 13(13): 1083-1088, 1999.
27. Setúbal AMG et al. Micronúcleo: um importante marcador biológico intermediário na prevenção do câncer bucal. *Rev Odontol Ciênc - Fac. Odontol/PUCRS*. 20(28). 9-24, 2005.

28. Bigot A, Jacquemin V, Debacq-Chainiaux F, Butler-Browne GS, Toussaint O, Furling D, Mouly V. Replicative aging down-regulates the myogenic regulatory factors in human myoblasts. *Biol Cell* 100:189–199, 2008.
29. Cornelison DD, Wold BJ. Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells. *Dev Biol*. 191(2):270-83, 1997.
30. Megeney LA, Kablar B, Garrett K, Anderson JE, Rudnicki MA. MyoD is required for myogenic stem cell function in adult skeletal muscle. *Genes Dev*. 10(10):1173-83, 1996.
31. Koishi K, Zhang M, McLennan IS, Harris AJ. MyoD protein accumulates in satellite cells and is neurally regulated in regenerating myotubes and skeletal muscle fibers. *Dev Dyn*. 202(3):244-54, 1995.
32. Cooper RN, Tajbakhsh S, Mouly V, Cossu G, Buckingham M, Butler-Browne GS. In vivo satellite cell activation via Myf5 and MyoD in regenerating mouse skeletal muscle. *J Cell Sci*. 112(Pt 17):2895-901, 1999.
33. Seale P, Sabourin LA, Girgis-Gabardo A, Mansouri A, Gruss P, Rudnicki MA. Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *102(3):777-86*, 2000.
34. Grounds MD, Garrett KL, Lai MC, Wright WE, Beilharz MW. Identification of skeletal muscle precursor cells in vivo by use of MyoD1 and myogenin probes. *Cell Tissue Res*. 267(1):99-104, 1992.
35. Seger R, Krebs EG. "The MAPK signaling cascade." *FASEB J* 9(9): 726-735, 1995.
36. Henriques ACG, Cazal C, Castro JFL. Ação da laserterapia no processo de proliferação celular: revisão de literatura. *Ver Col Bras Cir.*;37, n. 4, 295-302, 2010.
37. Catão MHCV. Os benefícios do laser de baixa intensidade na clínica odontológica na estomatologia. *Rev Bras Patol Oral*. 3:214-8, 2004.
38. Rocha Junior AM, Vieira BJ, Andrade LCF, Monteiro A. Effects of low-level laser therapy on the progress of wound healing in humans: the contribution of in vitro and in vivo experimental studies. *J Vasc Bras*.6:258-66, 2007.
39. Karu TI, Kalendo GS, Letokhov VS. Biostimulation of HeLe cells by low intensity visible light. *Nuovo Cim D*, v. 1, n. 6, p. 828, 1982.
40. Holanda VM, Chavantes MC, Wu X, Anders JJ. The Mechanistic Basis for Photobiomodulation Therapy of Neuropathic Pain by Near Infrared Laser Light. *Lasers in Surgery and Medicine*. 49(5):516-524, 2017.
41. Bourguignon Filho AM, Feitosa ACF, Beltrão GC, Pagnoncelli GC. Utilização do laser de baixa intensidade no processo de cicatrização tecidual. Revisão de literatura. *Rev Port Estomatol Cir Maxilofac*. 46(1);37-43, 2005.

42. Channual J, Choi B, Osann K, Pattanachinda D, Lotfi J, Kelly KM. Vascular effects of photodynamic and pulsed dye laser therapy protocols. *Lasers Surg Med.*; v. 40, n. 9, p. 644-50, 2008.
43. Alves C, Vieira R, Leal-Junior E, Santos S, Ligeiro A, Albertini R, Junior J, Carvalho P. Effect of low-level laser therapy on the expression of inflammatory mediators and on neutrophils and macrophages in acute joint inflammation. *Arthritis Research & Therapy* 15:R116, 2013.
44. Ben-dov N, Shefer G, Irintchev A, Werning A, Oron U, Halevy O. Low-energy laser irradiation affects satellite cell proliferation and differentiation in vitro. *Biochim Biophys Acta.* 1448:372-380, 1999.
45. Martin R. Laser-accelerated inflammation/pain reduction and healing. *Practical Pain Management.* 3(6):20-25, 2003.
46. Walsh LJ. The current status of low level laser therapy in dentistry. Part 1. Soft tissue applications. *Austr Dental J.* 42:247-54, 1997.
47. Yu HS, Chang KL, Yu CL, Chen JW, Chen GS. Low-energy helium-neon laser irradiation stimulates interleukin-1 alpha and interleukin-8 release from cultured human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 107:593-596, 1996.
48. Bibikova A, Oron U. Promotion of muscle regeneration in the toad (*Bufo viridis*) gastrocnemius muscle by low-energy laser irradiation. *Anat Rec* 235:374-380, 1993.
49. Conlan MJ, Rapley JW, Cobb CM. Biostimulation of wound healing by low-energy laser irradiation. A review. *J Clin Periodontol* 23:492-496, 1996.
50. Stadler I, Evans R, Kolb B, Naim JO, Narayan V, Buehner N, Lanzafame RJ. In vitro effects of low-level laser irradiation at 660 nm on peripheral blood lymphocytes. *Lasers Surg Med* 27:255-261, 2000.
51. Shefer G, Partridge TA, Heslop L, Gross JG, Oron U, Halevy O. Low-energy laser irradiation promotes the survival and cell cycle entry of skeletal muscle satellite cells. *J Cell Sci* 115:1461-1469, 2002.
52. Jia YL, Guo ZY. Effect of low-power He-Ne laser irradiation on rabbit articular chondrocytes in vitro. *Lasers Surg Med* 34:323-328, 2004.
53. Stein A, Benayahu D, Maltz L, Oron U. Low-level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. *Photomed Laser Surg* 23:161-166, 2005.
54. Nakano J, Kataoka H, Sakamoto J, Origuchi T, Okita M, Yoshimura T. Low-level laser irradiation promotes the recovery of atrophied gastrocnemius skeletal muscle in rats. *Exp Physiol.* 94(9):1005-15, 2009.
55. Huang Y, Sharma S, Carroll J. and Hamblin, M. Biphasic dose response in low level light therapy an update. *Dose-Response*, 9, 2011.

56. Pinto NC, Pereira HC, Stolf NAG, Chavantes MC. Laser de baixa intensidade em deiscência aguda safenectomia: proposta terapêutica. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* ;24(1), P. 88-91, 2009.
57. Balint G, Barabas Z, Zeitler Z, Bakos J. Kékesi KA, Pethes A, Nagy E, Lakatos T, Bálint PV, Szekanez Z.. Ex Vivo Soft-Laser Treatment Inhibits the Synovial Expression of Vimentin and-Enolase, Potential Autoantigens in Rheumatoid Arthritis. *PHYS THER*, 91, 2011
58. Goodman R, Wei LX, Chu J, Xu A. Exposure of human cells to low-frequency electromagnetic fields results in quantitative changes in transcripts. *Biochim Biophys Acta* , 1009 (3):216-20, 1989.
59. Disponível em <https://www.greenme.com.br>
- 60.. Yoshimura TM, Meneguzzo DT, Lopes-Martins RAB. A pilot study – acute exposure to a low intensity, low-frequency oscillating magnetic field: effects on carrageenan-induced paw edema in mice. *Revista Brasileira de Física Médica.* 5(1):53-6, 2011.
61. Canedo-Dorantes L, Garcia-Cantu R, Barrera R, Mendez-Ramirez I, Navarro VH, Serrano G. Healing of chronic arterial and venous leg ulcers through systemic effects of electromagnetic fields. *Arch Med Res.* 33:281-9, 2002.
62. Patino O, Grana D, Bolgiani A, Prezzavento G, Mino J, Merlo A, Benaim F. in experimental cutaneous wound healing in rats. *J Burn Care Rehabil.* 17:528-31, 1996.
63. Stiller MJ, Pak GH, Shupack JL, Thaler S, Kenny C, Jondreau L. A portable pulsed electromagnetic field (PEMF) device to enhance healing of recalcitrant venous ulcers: a double-blind, placebo controlled clinical trial. *Br J Dermatol.* 127:147-54, 1992.
64. Johns LD. Nonthermal effects of therapeutic ultrasound: the frequency resonance hypothesis. *J Athl Train.* 37(3):293-9, 2002.
65. Bassoli DA. A importância das Células Satélites na regeneração de músculos esqueléticos (artigo de revisão). In: CLARETIANO - Revista do Centro Universitário. v. 1, n. 3, p. 166-174, 2003.
66. Ferrari RJ, Picchi LD, Botelho AP, Minamoto V. Processo de Regeneração na Lesão Muscular: uma revisão. In: *Revista Fisioterapia em Movimento.* v.18, n.2, p. 63 -71, 2005.
67. Sharples PS, Nasser Al-Shanti, Mark PL, Claire ES. Reduction of Myoblast Differentiation Following Multiple Population Doublings in Mouse C2C12 Cells: A Model to Investigate Ageing? *Journal of Cellular Biochemistry* 112, 3773-3785, 2011.
68. Shang K, Zhang J, Amna T, Yang J, Cheng X, Zhang C, Hwang I. Attenuation of cellular toxicity by calpain inhibitor induced by bacterial endotoxin: a mechanistic study using muscle precursor cells as a model system. *Mol Biol Rep.* 42(8):1281-8, 2015.
69. Macedo AB, Moraes LH, Mizobuti DS, Fogaça AR, Moraes Fdos S, Hermes T de A, Pertille A, Minatel E. Low-Level Laser Therapy (LLLT) in Dystrophin-Deficient Muscle

Cells: Effects on Regeneration Capacity, Inflammation Response and Oxidative Stress. *PLoS One*. 10(6):e0128567, 2015.

70. Chen AC, Huang YY, Sharma SK, Hamblin MR. Effects of 810-nm laser on murine bone-marrow-derived dendritic cells. *Photomed Laser Surg*. 29(6):383-9, 2011.

71. Pansani TN, Basso FG, Soares DG, Turrioni APDS, Hebling J, de Souza Costa CA. Photobiomodulation in the Metabolism of Lipopolysaccharides-exposed Epithelial Cells and Gingival Fibroblasts. *Photochem Photobiol*. 94(3):598-603, 2018.

72. Cossariza, Monti D, Bersani F, Cantini M, Cadossi R, Sacchi A, Franceschi C. Extremely low frequency pulsed electromagnetic fields increase cell proliferation in lymphocytes from young and aged subjects. *Biochem Biophys Res Commun*, 160(2), 692-8, 1989.

73. Ikeda K, Takayama T, Suzuki N, Shimada K, Otsuka K, Ito K. Effects of low-intensity pulsed ultrasound on the differentiation of C2C12 cells. *Life Sci*. 79(20):1936-43, 2006.

74. Dimchev DA, Al-Shanti N, Stewart CE. Phospho-tyrosine phosphatase inhibitor Bpv(Hopic) enhances C2C12 myoblast migration in vitro. Requirement of PI3K/AKT and MAPK/ERK pathways. *J Muscle Res Cell Motil*. 34, 125–136, 2013.

75. Weintraub H. The MyoD family and myogenesis: Redundancy, networks, and thresholds. *Cell*. 75:1241–1244, 1993.

76. Collins CA, Gnocchi VF, White RB, Boldrin L, Perez-Ruiz A, Relaix F, Morgan JE, Zammit PS. Integrated functions of Pax3 and Pax7 in the regulation of proliferation, cell size and myogenic differentiation. *PloS one*. 4:e4475, 2009.

77. Caliaro F, Maccatrozzo L, Toniolo L, Reggiani C, Mascarello F, Patrino M. Myogenic regulatory factors expressed during postnatal hyperplastic growth in porcine muscles. *Basic Appl Myol*. 15:55–60, 2005.

78. Abe S, Rhee S, Iwanuma O, Hiroki E, Yanagisawa N, Sakiyama K, Ide Y. Effect of mechanical stretching on expressions of muscle specific transcription factors MyoD, Myf-5, myogenin and MRF4 in proliferated myoblasts. *Anat Histol Embryol*. 38(4):305-10, 2009.

79. Cruvinel WM, Júnior DM, Araújo JAP, Catelan TTT, Souza AWS, Silva Andrade, L.E.C. Sistema Imunitário – Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. *Rev Bras Reumatol*, 50, 2010.

80. Chavantes MC. *Laser em Bio-Medicina*. Atheneu, SP. 2009.

81. Mafra de Lima F, Costa MS, Albertini R, Silva Jr JA, Aimbire F. Low level laser therapy (LLLT): Attenuation of cholinergic hyperactive activity,  $\beta$ 2-adrenergic hyporesponsiveness and TNF- $\alpha$  mRNA expression in rat bronchi segments in E.

colilipopolysaccharide-induced airway inflammation by a NF- $\kappa$ B dependent mechanism. *Lasers Med Sci.* 41(1): 68–74, 2009.

82. Boschi ES, Leite CE, Saciura VC, Caberlon E, Lunardelli A, Bitencourt S, et al. Anti-Inflammatory Effects of Low-Level Laser Therapy (660 nm) in the Early Phase in Carrageenan-Induced Pleurisy in Rat. *Lasers Surg Med.* 40:500-8, 2008.

83. Ouyang W, Rutz S, Crellin NK, Valdez PA, Hymowitz SG. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annu Rev Immunol.* 29:71-109, 2011.

84. Albertini R, Villaverde AB, Aimbire F, Salgado MA, Bjordal JM, Alves LP, Munin E, Costa MS. Antiinflammatory effects of low-level laser therapy (LLLT) with two different red wave lengths (660 nm and 684 nm) in carrageenan-induced rat paw edema. *J Photochem Photobiol B.* 89:50-5, 2007.

85. Albertini R, Villaverde AB, Aimbire F, Bjordal J, Brugnera A, Mittmann J, Silva JA, Costa M. Cytokine mRNA expression is decreased in the subplantar muscle of rat paw subjected to carrageenan-induced inflammation after low-level laser therapy. *Photomed Laser Surg.* 26:19-24, 2008.

86. Hardingham GE, Chawla S, Johnson CM, Bading H. Distinct functions of nuclear and cytoplasmic calcium in the control of gene expression. *Nature* 385:260-265, 1997.

87. Pust T, Wu JJ, Zimmerman TL, Zhang L, Ehrlich BE, Berchtold MW, Hoek JB, Karpen SJ, Nathanson MH, Bennett AM. Epidermal growth factor-mediated activation of the ETS domain transcription factor Elk-1 requires nuclear calcium. *J Biol Chem* 277: 27517-27527, 2002.

88. Echevarria W, Leite MF, Guerra MT, Zipfel WR, Nathanson MH. Regulation of calcium signals in the nucleus by a nucleoplasmic reticulum. *Nat. Cell Biol.* 5 440–6, 2003.

89. Amaroli A, Ferrando S, Benedicenti S. Photobiomodulation Affects Key Cellular Pathways of all Life-Forms: Considerations on Old and New Laser Light Targets and the Calcium Issue. *Photochem Photobiol.* 95(1):455-459, 2019.

90. Young S, Dyson RM, Bolton P. Effect of light on calcium uptake by macrophages. *Laser Ther.* 2, 53-57, 1990.

91. Yanmei T, Juan W, Yu W, Zuxuan ZH, Jinxi J, Zhengrong H. Effects of low level laser irradiation on intracellular free calcium concentration and SOD activity in vitro and in vivo study. *Appl Laser* 17:89–93, 1997.

92. Lan CC, Wu SB, Wu CS, Shen YC, Chiang TY, Wei YH, Yu HS. Induction of primitive pigment cell differentiation by visible light (helium-neon laser): a photoacceptor-specific response not replicable by UVB irradiation. *J Mol Med (Berl).* 90, 321-30, 2012.

93. Wang L, Zhang D and Schwarz W. TRPV channels in mast cells as a target for low-level-laser therapy. *Cells.* 3, 662–673, 2014.

94. Silva LMG, Silva CA, Silva Ad, Vieira RP, Mesquita-Ferrari RA, Cogo JC, Zamuner SR. Photobiomodulation Protects and Promotes Differentiation of C2C12 Myoblast Cells Exposed to Snake Venom .PLoSOne. 8;11(4):e0152890, 2016.
95. Zanotti GB, Oliveira PI, Reis SFS, Silva FS, Araújo AR. Efeitos do laser de baixa potência sobre a regeneração da cartilagem na osteoartrose. Rev fisio bras. 12(2):139-46, 2011.
96. Zhang YY, Wu JW, Wang ZX. Mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase 3-mediated cross-talk between MAPKs ERK2 and p38alpha. J Biol Chem. 286(18):16150-62, 2011.
97. Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. Cell. 46 (5): 705–16, 1986.
98. Fraser CC. Exploring the positive and negative consequences of NF-kappaB inhibition for the treatment of human disease. Cell Cycle. 5(11):1160-3, 2006.
99. Schwartz SA, Hernandez A, Mark Evers B. The role of NF-kappaB/IkappaB proteins in cancer: implications for novel treatment strategies. SurgOncol. 8(3):143-53, 1999.
100. Wu D, Ren Z, Pae M, Guo W, Cui X, Merrill AH, Meydani SN. Aging up-regulates expression of inflammatory mediators in mouse adipose tissue. J Immunol. 179(7):4829-39, 2007.
101. Fong YC, Maa MC, Tsai FJ, Chen WC, Lin JG, Jeng LB, Yang RS, Fu WM, Tang CH. Osteoblast-derived TGF-beta1 stimulates IL-8 release through AP-1 and NF-kappaB in human cancer cells. J Bone Miner Res. (6):961-70, 2008.
102. Greten FR, Arkan MC, Bollrath J, Hsu LC, Goode J, Miething C, Göktuna SI, Neuenhahn M, Fierer J, Paxian S, Van Rooijen N, Xu Y, O'Cain T, Jaffee BB, Busch DH, Duyster J, Schmid RM, Eckmann L, Karin M. NF-kappaB is a negative regulator of IL-1beta secretion as revealed by genetic and pharmacological inhibition of IKKbeta. Cell. 130(5):918-31, 2007.