



UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA BIOFOTÔNICA

ALESSANDRA LIMA DA SILVA MARTINS

**EFEITOS DA FOTOBIMODULAÇÃO NA DIFERENCIAÇÃO, VIABILIDADE
E MIGRAÇÃO DE MIOBLASTOS C2C12 EXPOSTOS A DIFERENTES
CONCENTRAÇÕES DE DEXAMETASONA DURANTE A INDUÇÃO DA
DIFERENCIAÇÃO**

São Paulo, SP

2025



ALESSANDRA LIMA DA SILVA MARTINS

**EFEITOS DA FOTOBIMODULAÇÃO NA DIFERENCIAÇÃO, VIABILIDADE
E MIGRAÇÃO DE MIOBLASTOS C2C12 EXPOSTOS A DIFERENTES
CONCENTRAÇÕES DE DEXAMETASONA DURANTE A INDUÇÃO DA
DIFERENCIAÇÃO**

**Dissertação apresentada à Universidade Nove de Julho,
para Defesa de Mestrado em Medicina - Biofotônica.**

Orientadora: Prof^a Dr^a. Raquel Agnelli Mesquita Ferrari

**São Paulo, SP
2025**



FICHA CATALOGRÁFICA

Martins, Alessandra Lima da Silva.

Efeitos da fotobiomodulação na diferenciação, viabilidade e migração de mioblastos C2C12 expostos a diferentes concentrações de dexametasona durante a indução da diferenciação. / Alessandra Lima da Silva Martins. 2025.

65 f.

Dissertação (Mestrado)- Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2025.

Orientador (a): Prof^ª. Dr^ª. Raquel Agnelli Mesquita Ferrari.

1. C2C12. 2. Atrofia muscular. 3. Fotobiomodulação. 4. Dexametasona. 5. Regeneração muscular.

I. Ferrari, Raquel Agnelli Mesquita. II. Título

CDU 615.831



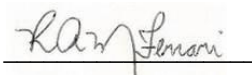
São Paulo, 10 de dezembro de 2025.

TERMO DE APROVAÇÃO

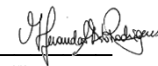
Aluno (a): Alessandra Lima da Silva Martins

Título da Dissertação: “Efeitos da fotobiomodulação na diferenciação, viabilidade e migração de mioblastos C2C12 expostos a diferentes concentrações de dexametasona”.

Presidente: PROF^a. DR^a. RAQUEL AGNELLI MESQUITA FERRARI



Membro: PROF^a. DR^a. MARIA FERNANDA SETUBAL DESTRO RODRIGUES



Membro: PROF^a. DR^a. MONICA ROSAS DA COSTA IEMMA



DEDICATÓRIA

*Aos meus sobrinhos, com amor.
Que o meu exemplo mostre a eles
que nunca é tarde para buscar o
conhecimento e realizar sonhos!*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me sustentar em todos os momentos desta caminhada e me dar forças para seguir em frente, mesmo diante dos desafios.

À minha família, base da minha vida, pelo apoio e amor incondicional.

Aos meus amigos do trabalho, que sempre me incentivaram e compreenderam a importância deste percurso, oferecendo suporte e palavras de encorajamento nos momentos mais necessários.

À Universidade Nove de Julho, pela oportunidade de crescimento acadêmico e pela estrutura oferecida ao longo da realização deste mestrado.

A todos os professores que contribuíram para minha formação, compartilhando conhecimento, experiência e dedicação. Em especial, agradeço à minha orientadora, Prof.^a Raquel, por ter me acolhido como sua aluna, por sua orientação cuidadosa e por acreditar no meu potencial.

À Tainá, pela ajuda indispensável, pela generosidade e por estar sempre disposta a colaborar em cada etapa deste trabalho.

Aos amigos que conquistei ao longo desses dois anos, que me acolheram com carinho e fizeram desta experiência algo mais leve, especial e inesquecível.

Por fim, agradeço ao Claudio e à Rosani pela amizade sincera, parceria e por todos os momentos que compartilhamos durante esse período.

Sou profundamente grata por ter vivido essa jornada ao lado de pessoas tão especiais.

Muito obrigada

FINANCIAMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Universidade Nove de Julho (UNINOVE), por meio do Programa de Bolsas para Formação do Pesquisador, e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), processo nº 88887.133947/2025-00.

RESUMO

O músculo esquelético mantém sua função por meio do equilíbrio entre proliferação, diferenciação e regeneração, processos dependentes da ativação das células satélites. Após lesão, essas células originam mioblastos que se diferenciam e reconstituem as fibras musculares. A dexametasona, apesar de eficaz como anti-inflamatório, compromete esse reparo ao induzir atrofia muscular e outros efeitos metabólicos adversos. A fotobiomodulação apresenta potencial para melhorar viabilidade, proliferação e diferenciação de mioblastos, além de modular a inflamação e favorecer o trofismo muscular, possivelmente por mecanismos mitocondriais. Porém, ainda há poucos estudos avaliando sua ação frente à atrofia induzida por glicocorticoides. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da FBM sobre a diferenciação, viabilidade, migração e síntese de citocinas inflamatórias em mioblastos da linhagem C2C12 expostos a diferentes concentrações de DEXA. Foram analisadas cinco condições experimentais: células C2C12 em meio proliferativo; células em meio de diferenciação expostas à FBM; grupo controle apenas em meio de diferenciação; células tratadas com DEXA (5, 10 ou 200 μM) durante a diferenciação; e células tratadas com DEXA nas mesmas concentrações associadas à FBM. Os grupos FBM foram irradiados utilizando laser de 780 nm, 70 mW de potência, 15 segundos de exposição e exposição radiante de 26,25 J/cm². A viabilidade, proliferação e migração foram avaliadas pelas técnicas de MTT, Cristal Violeta e Ensaio de Ferida respectivamente. A diferenciação dos mioblastos foi avaliada por meio da contagem de núcleos e índice de fusão usando a coloração May Grunwald e Giemsa. As citocinas IL-6 e TNF- α foram quantificadas pela técnica de ELISA. Foram realizados três experimentos independentes e as análises realizadas nos períodos de 24, 48 e 72h. Todos os resultados foram submetidos a análise estatística. Os resultados deste estudo mostraram que a DEXA reduziu a viabilidade dos mioblastos C2C12 de forma dependente do tempo e da concentração, com maior citotoxicidade nas doses de 10 e 200 μM . A FBM atenuou parcialmente esses efeitos, preservando a viabilidade e estimulando a proliferação principalmente entre 24 e 48 h. Na diferenciação, a DEXA diminuiu a formação de miotubos e o índice de fusão, enquanto a FBM isolada favoreceu a miogênese e, quando associada à DEXA, reduziu parte do prejuízo, mantendo células mais alongadas e organizadas. O ensaio de migração mostrou que a DEXA comprometeu o fechamento da ferida ao longo do tempo, e que a FBM não conseguiu reverter esse efeito nas condições testadas. As citocinas IL-6 e TNF- α também foram suprimidas de maneira tempo- e dose-dependente pela DEXA, e a FBM modulou parcialmente essa queda. Em conjunto, os achados indicam que a FBM exerce efeitos protetores sobre mioblastos expostos à dexametasona, favorecendo processos bioenergéticos, proliferativos e iniciais da diferenciação, ainda que suas ações sejam limitadas frente a concentrações mais altas do fármaco. Esses resultados sugerem que a FBM pode ser uma estratégia promissora para mitigar efeitos deletérios de glicocorticoides, embora estudos adicionais sejam necessários para aprofundar seus impactos na migração e na modulação inflamatória.

Palavras-chave: C2C12, atrofia muscular, fotobiomodulação, dexametasona, regeneração muscular.

ABSTRACT

Skeletal muscle preserves its function through a balance of proliferation, differentiation, and regeneration, processes that depend on the activation of satellite cells. Following injury, these cells give rise to myoblasts, which differentiate and restore muscle fibers. Although dexamethasone is an effective anti-inflammatory agent, it compromises muscle repair by inducing atrophy and other adverse metabolic effects. Photobiomodulation has the potential to enhance myoblast viability, proliferation, and differentiation, as well as modulate inflammation and support muscle trophism, possibly through mitochondria-dependent mechanisms. However, few studies have examined its effects in glucocorticoid-induced atrophy. The aim of this study was to assess the effects of PBM on differentiation, viability, migration, and inflammatory cytokine production in C2C12 myoblasts exposed to different concentrations of dexamethasone (DEXA). Five experimental conditions were analyzed: C2C12 cells in proliferation medium; cells in differentiation medium exposed to PBM; a differentiation-medium control; cells treated with DEXA (5, 10, or 200 μ M) during differentiation; and cells treated with the same DEXA concentrations in combination with PBM. PBM groups were irradiated with dosimetric parameters using a 780-nm laser, 70 mW output power, 15-second exposure, and a radiant exposure of 26.25 J/cm². Cell viability, proliferation, and migration were evaluated using the MTT assay, crystal violet staining, and wound-healing assay, respectively. Myoblast differentiation was assessed by nuclear counting and fusion index using May–Grünwald–Giemsa staining. IL-6 and TNF- α levels were quantified by ELISA. Three independent experiments were performed, and analyses were conducted at 24, 48, and 72 hours. All data were subjected to statistical analysis. The results showed that DEXA reduced C2C12 viability in a time- and concentration-dependent manner, with greater cytotoxicity at 10 and 200 μ M. PBM partially attenuated these effects, preserving viability and promoting proliferation, particularly between 24 and 48 hours. During differentiation, DEXA impaired myotube formation and decreased the fusion index, whereas PBM alone enhanced myogenesis and, when combined with DEXA, mitigated part of the damage, maintaining more elongated and organized cells. The migration assay revealed that DEXA impaired wound closure over time, and PBM did not reverse this effect under the tested conditions. IL-6 and TNF- α levels were also suppressed by DEXA in a time- and dose-dependent manner, and PBM partially modulated this reduction. Taken together, these findings indicate that PBM exerts protective effects on myoblasts exposed to dexamethasone by supporting bioenergetic, proliferative, and early differentiation processes, although its efficacy is limited at higher drug concentrations. These results suggest that PBM may be a promising strategy to mitigate glucocorticoid-induced damage, although further studies are needed to clarify its impact on migration and inflammatory modulation.

Keywords: C2C12, muscle atrophy, photobiomodulation, dexamethasone, muscle regeneration.

DESTAQUES

1. O estudo investiga a interação entre fotobiomodulação e dexametasona, tema pouco explorado na literatura, especialmente em modelos de atrofia muscular *in vitro*.
2. Inclui ampla faixa de concentrações de dexametasona para simular diferentes condições de exposição farmacológica.
3. Utiliza múltiplos parâmetros de avaliação celular (viabilidade, proliferação, migração, morfologia e síntese de citocinas), permitindo análise abrangente dos efeitos.
4. Emprega protocolo padronizado de fotobiomodulação com parâmetros precisos, garantindo reprodutibilidade experimental.
5. Potencial de aplicação translacional para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas destinadas a minimizar a perda muscular associada ao uso prolongado de glicocorticoides.

HIGHLIGHTS

1. The study investigates the interaction between photobiomodulation and dexamethasone, a topic scarcely explored in the literature, especially in *in vitro* models of muscle atrophy.
2. It includes a wide range of dexamethasone concentrations to simulate different pharmacological exposure conditions.
3. It uses multiple cellular evaluation parameters (viability, proliferation, migration, morphology, and cytokine synthesis), allowing a comprehensive analysis of the effects.
4. It employs a standardized photobiomodulation protocol with precise parameters, ensuring experimental reproducibility.
5. It holds translational application potential for the development of therapeutic strategies aimed at minimizing muscle loss associated with prolonged glucocorticoid use.

RESUMO PARA LEIGOS

Os nossos músculos são importantes para tudo o que fazemos: caminhar, levantar da cadeira, segurar objetos e manter a postura. Para que funcionem bem, eles contam com células especiais capazes de se renovar e ajudar na recuperação quando há algum machucado. Porém, alguns remédios muito usados, como a dexametasona, podem enfraquecer os músculos quando tomados por muito tempo ou em altas dosagens. Neste trabalho, estudamos se a fotobiomodulação, uma técnica que usa luz, parecida com a de um laser terapêutico, poderia ajudar a proteger as células dos músculos contra esses efeitos ruins da dexametasona. Para isso, usamos células musculares cultivadas em laboratório e observamos se elas conseguiam sobreviver melhor, crescer, formar novas fibras e se movimentar para “fechar” uma ferida simulada. O que encontramos foi que a dexametasona realmente prejudica essas células, mas a fotobiomodulação ajudou a diminuir parte desse dano. As células tratadas com luz conseguiram se manter mais vivas, crescer mais e começar o processo de formar novas fibras musculares. Por outro lado, a luz não conseguiu melhorar totalmente a capacidade dessas células de se moverem, que também é importante para a cicatrização. No geral, nossos resultados mostram que a fotobiomodulação pode ser uma aliada importante para reduzir os efeitos negativos da dexametasona sobre os músculos. Embora não resolva tudo, ela ajuda as células a continuarem funcionando e iniciando o processo de regeneração. No futuro, mais estudos poderão mostrar como essa técnica pode ser aplicada de forma ainda mais eficaz para proteger o músculo.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Fluxograma do delineamento experimental	30
Figura 2	Contagem manual das células utilizando o software ImageJ	37
Figura 3	Delimitação manual da área de ferida utilizando o software ImageJ	38
Figura 4	Viabilidade celular em mioblastos na presença de diferentes concentrações de DEXA	42
Figura 5	Viabilidade das células musculares C2C12 expostas à DEXA e/ou à FBM por 24, 48 e 72 h, avaliada pelo ensaio de MTT	44
Figura 6	Proliferação celular de mioblastos C2C12 avaliada pelo ensaio de cristal violeta após 24, 48 e 72 h de exposição à DEXA em diferentes concentrações, isoladamente ou em combinação com a FBM	45
Figura 7	Distribuição percentual de núcleos em células C2C12 após 24, 48 e 72 h de diferenciação	46
Figura 8	Índice de fusão (%) de mioblastos C2C12 expostos à DEXA e/ou à FBM por 24, 48 e 72 horas	48

Figura 9	Coloração de May-Grünwald e Giemsa das células musculares C2C12 expostas à DEXA e/ou à FBM por 24, 48 e 72 h	50
Figura 10	Fechamento da ferida (%) em células C2C12 de acordo com os grupos experimentais, nos períodos de 6, 12 e 24h de exposição à DEXA em diferentes concentrações, isoladamente ou em combinação com a FBM	52
Figura 11	Ensaio de migração celular (ferida) das células musculares C2C12 expostas à DEXA e/ou à FBM por 0, 6, 12 e 24 h	53
Figura 12	Níveis de IL-6 em células C2C12 nos diferentes grupos experimentais após 24, 48 e 72 h de tratamento	55
Figura 13	Níveis de TNF- α em células C2C12 nos diferentes grupos experimentais após 24, 48 e 72 h de tratamento	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Revisão da literatura incluindo estudos que objetivaram avaliar a atrofia muscular induzida por diferentes concentrações de dexametasona	23
Tabela 2.	Parâmetros dosimétricos utilizados para o tratamento da FBM...	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina Trifosfato
C2C12	Linhagem de células musculares derivadas de camundongos
CCO	Citocromo C Oxidase
cm ²	centímetro quadrado
DEXA	Dexametasona
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FBM	Fotobiomodulação
IL-6	Interleucina 6
J	Joule
J/cm ²	Joules por centímetro quadrado
LED	Light Emitting Diode
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
mW	miliwatts
mW/cm ²	milliwatt por centímetro quadrado
nm	nanometros
NO	Óxido nítrico
PBS	Phosphate-buffered saline
pH	Potencial hidrogênico
rpm	Rotações por minuto
SC	Soro de cavalo
SFB	Soro fetal bovino
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
μ L	microlitros
μ M	micromolar
°C	graus Celsius

SUMÁRIO

1	CONTEXTUALIZAÇÃO	19
1.1	Células musculares	19
1.2	Dexametasona.....	20
1.3	Fotobiomodulação	23
2	JUSTIFICATIVA.....	27
3	OBJETIVOS.....	28
3.1	Geral	28
3.2	Específicos	28
4	METODOLOGIA	29
4.1	Delineamento experimental	29
4.2	Cultura celular	29
4.3	Grupos experimentais	30
4.4	Tratamento das células com dexametasona.....	31
4.5	Tratamento das células utilizando a FBM	32
5	RESULTADOS	40
5.1	Curva dose resposta considerando diferentes concentrações de dexametasona e viabilidade de C2C12	40
5.2	Viabilidade Celular - MTT	41
5.3	Proliferação Celular - Cristal Violeta	43
5.4	Morfologia - Coloração May-Grunwald e Giemsa.....	45
5.5	Migração celular – Ensaio de Ferida	50
5.6	Expressão Proteica de IL-6	53
5.7	Expressão Proteica de TNF- α	54
6	DISCUSSÃO.....	56
7	CONCLUSÃO	60
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

1 CONTEXTUALIZAÇÃO

1.1 Células musculares

O músculo esquelético é um dos principais tecidos do organismo, sendo fundamental para a sustentação do esqueleto, locomoção e postura (Li *et al.*, 2023). Apresenta relevância central no metabolismo energético, sendo o principal sítio de captação de glicose após ingestão alimentar, o que é determinante para a homeostase glicêmica. Alterações nesse processo favorecem a resistência à insulina, condição frequentemente observada em indivíduos com obesidade ou sedentários (Merz; Thurmond, 2020).

O tecido muscular é um tecido extremamente suscetível a lesões, sobretudo em situações de sobrecarga mecânica ou estresse oxidativo. Contudo, possui notável capacidade regenerativa após lesão ou em doenças como distrofias musculares. Esse processo é conduzido principalmente pelas células satélites localizadas entre a lâmina basal e a membrana das fibras musculares (Li *et al.*, 2025; Tedesco *et al.*, 2010). Em condições fisiológicas, as células satélites permanecem em estado quiescente, sendo ativadas por estímulos como lesão, sobrecarga mecânica ou sinais provenientes do próprio miócito. Uma vez ativadas, proliferam e diferenciam-se em mioblastos, que se fundem a fibras pré-existentes ou formam novas fibras, contribuindo para a adição de mionúcleos e preservação do domínio mionuclear (Li *et al.*, 2025; Pallafacchina *et al.*, 2013).

Assim a integridade estrutural e funcional do tecido muscular esquelético depende de um equilíbrio dinâmico entre os processos de proliferação, diferenciação e regeneração celular, os quais podem ser comprometidos em diversas condições fisiopatológicas (Bentzinger *et al.*, 2012).

Lesões musculares representam um dos traumas mais frequentes em indivíduos fisicamente ativos, exigindo intervenções terapêuticas eficazes para garantir recuperação tecidual adequada (Kim *et al.*, 2018). Além disso, condições como câncer, infecções crônicas, doenças neurodegenerativas, envelhecimento e o uso prolongado de determinados fármacos podem desencadear um processo

multifatorial de perda de massa e função, caracterizando a atrofia muscular esquelética (Yin *et al.*, 2021).

Nesse contexto, os mioblastos da linhagem C2C12, derivados de músculo esquelético de camundongos, constituem um modelo experimental amplamente utilizado para investigar a biologia muscular, incluindo processos de regeneração, degeneração e estratégias terapêuticas (Bentzinger *et al.*, 2012; Lovisetto *et al.*, 2022). Essas células apresentam elevada capacidade proliferativa e de diferenciação, formando miotubos multinucleados quando submetidas a condições indutoras específicas (Li *et al.*, 2023). No entanto esse processo pode ser comprometido em diversas condições fisiopatológicas e pelo uso prolongado de determinados fármacos como os glicocorticoides, amplamente utilizado na prática clínica, porém associados a importantes efeitos adversos sobre o tecido muscular (Lee *et al.*, 2021).

1.2 Dexametasona

A dexametasona (DEXA) é um glicocorticoide sintético de ação prolongada, amplamente reconhecido por seus potentes efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores (Chang; Kong, 2020). Segundo De Bosscher *et al.* (2010a), os glicocorticoides são aplicados no tratamento de doenças inflamatórias e autoimunes, transplantes de órgãos e tecidos e alguns tipos de câncer. Sua estrutura química confere maior estabilidade e afinidade pelo receptor de glicocorticoides, resultando em uma resposta farmacológica mais intensa e duradoura quando comparada aos glicocorticoides endógenos, como o cortisol (Rhen; Cidlowski, 2005).

No entanto, a administração crônica ou em concentrações elevadas de glicocorticoides, como a DEXA, pode provocar efeitos adversos expressivos, incluindo imunossupressão, resistência à insulina e atrofia do tecido muscular esquelético (Lee *et al.*, 2021; Oakley; Cidlowski, 2013). A atrofia é caracterizada pela redução do tamanho das fibras musculares, resultante do catabolismo de proteínas musculares, com consequente diminuição da massa e função muscular (Bonaldo; Sandri, 2013).

Estudos demonstram que a atrofia muscular induzida pela DEXA ocorre por mecanismos que envolvem aumento de proteólise, estresse oxidativo e regulação negativa de fatores miogênico (Chang; Kong, 2020; Ulla *et al.*, 2021). Para De Bosscher *et al.* (2010a), tais efeitos decorrem em grande parte da ativação do receptor de glicocorticoide e da subsequente indução de genes relacionados com a expressão de mediadores do catabolismo muscular. Segundo De Bosscher *et al.* (2010b), os efeitos da ativação dos receptores de glicocorticoides atuam tanto em mecanismos de transativação, induzindo a expressão de genes relacionados ao metabolismo energético, quanto de transrepressão, inibindo fatores de transcrição pró-inflamatórios. Essa dualidade explica a combinação entre os efeitos terapêuticos e colaterais dos glicocorticoides em geral.

Schakman *et al.* (2009) destacam que, no tecido muscular, a DEXA provoca um desequilíbrio entre síntese e degradação de proteínas. Esse efeito ocorre porque o fármaco suprime a atividade anabólica associada à via IGF-1/Akt/mTOR e, paralelamente, intensifica mecanismos catabólicos, especialmente o sistema ubiquitina-proteassoma, favorecendo o aumento de Atrogin-1 e MuRF-1. A droga também estimula a produção de miostatina, reforçando o caráter antianabólico do processo. Em conjunto, esses eventos fazem da dexametasona um modelo amplamente utilizado para indução de atrofia muscular tanto *in vitro* quanto *in vivo*, o que explica o crescente interesse em investigar seus efeitos em mioblastos C2C12.

Jiang *et al.* (2019) observaram que a proteína total de Panax Ginseng, um composto bioativo, aumentou a viabilidade celular e o diâmetro de miotubos C2C12 tratados com 200 μ M de DEXA por 24 horas, além de melhorar o consumo de glicose por meio da ativação das vias AMPK e PI3K/Akt, reduzindo assim marcadores de atrofia muscular.

Em outro estudo, Wang *et al.* (2021), induziram a diferenciação de células C2C12 em miotubos para investigar os efeitos do 20(S)-ginsenoside Rg3 (S-Rg3) na atrofia muscular induzida por DEXA nas concentrações 25, 50, 100 e 200 μ M por 24 e 48h. Foi observado que o S-Rg3 protege os miotubos C2C12 contra a atrofia induzida por DEXA, restaurando a função mitocondrial e reduzindo a ativação da via AMPK/FoxO3.

Sani *et al.* (2021) também estudaram a atrofia muscular induzida por DEXA e demonstraram que curcuminoides extraídos de cúrcuma longa foram capazes de reduzir a expressão dos genes Atrogin-1 e MuRF-1, sugerindo efeito inibitório sobre a via proteolítica associada à atrofia.

Entretanto, os efeitos da DEXA em células C2C12 podem variar conforme o estágio de diferenciação celular. Han *et al.* (2017) observaram que, quando aplicada em mioblastos, a DEXA pode exercer efeito anabólico, favorecendo a fusão celular, o aumento do diâmetro e a expressão de proteínas estruturais, além de reduzir marcadores catabólicos. Por outro lado, em miotubos já diferenciados, a DEXA induziu atrofia, evidenciada pela redução do diâmetro, diminuição da expressão de miosina de cadeia pesada e aumento de atrogin-1.

Belanto *et al.*, (2010) ao estudarem a disferlinopatia, que é uma distrofia muscular rara, demonstraram que a DEXA foi capaz de reverter parcialmente o defeito na fusão miogênica em células C2C12 deficientes em disferlina. Esses achados demonstram que os efeitos da DEXA sobre o músculo esquelético podem tanto induzir atrofia quanto favorecer a diferenciação miogênica em condições específicas, podendo ser modulados por intervenções associadas.

Tabela 1. Revisão da literatura incluindo estudos que objetivaram avaliar a atrofia muscular induzida por diferentes concentrações de dexametasona.

Artigo	DEXA (μM)	Tratamento aplicado na pesquisa
Chang; Kong, (2020)	100	Irisina (associada ao exercício)
Hah <i>et al.</i> , (2022)	1	β -sitosterol
Han <i>et al.</i> , (2017)	1, 10 e 100	Insulina
Jeong <i>et al.</i> , (2024)	1	Acetyl genistin
Jiang <i>et al.</i> , (2019)	200	Panax Ginseng
Kurera <i>et al.</i> , (2024)	10	Crassostrea nippona
Lee <i>et al.</i> , (2021)	5	Chrysanthemum zawadskii Herbich
Sani <i>et al.</i> , (2021)	1	Curcuminoides purificados da cúrcuma longa

Wang <i>et al.</i> , (2021)	25, 50, 100 e 200	20(S)-ginsenoside Rg3
Yoo <i>et al.</i> , (2024)	50	Extrato da raiz de Gromwell
Yoshioka <i>et al.</i> , (2023)	1	Diosgenina (Sapogenina esteroide de plantas)

Embora a DEXA configure-se como uma ferramenta terapêutica altamente eficaz na modulação da inflamação e da resposta imune, seu uso requer individualização e monitoramento rigoroso, considerando a delicada relação entre benefícios terapêuticos e potenciais efeitos adversos (Oakley; Cidlowski, 2013; Rhen; Cidlowski, 2005; Schakman *et al.*, 2009; Schakman *et al.*, 2013). A compreensão abrangente de seus mecanismos moleculares de ação, bem como de seus impactos fisiológicos, é essencial não apenas para seu uso clínico seguro, mas também para a condução de estudos experimentais que visem explorar estratégias capazes de mitigar seus efeitos deletérios. Nesse contexto, abordagens não farmacológicas com potencial citoprotetor e modulador do metabolismo células têm despertado crescente interesse, como a fotobiomodulação.

1.3 Fotobiomodulação

A fotobiomodulação (FBM) consiste na aplicação de fontes de luz não ionizantes, incluindo lasers e LEDs, em comprimentos de onda do espectro visível e infravermelho (620 – 1440 nm), com capacidade de modular processos celulares e biológicos sem causar aquecimento local (Hernández-Bule *et al.*, 2024). É uma terapia reconhecida por seus efeitos anti-inflamatórios e analgésicos, sendo utilizada em diferentes contextos clínicos, como lesões musculoesqueléticas, doenças neurodegenerativas, cicatrização de feridas e neuropatias periféricas (De Freitas; Hamblin, 2016).

A FBM exerce influência direta sobre a atividade mitocondrial interagindo com o citocromo c oxidase (CCO), desencadeando uma série de respostas bioenergéticas e sinalizadoras. Esse processo aumenta a síntese de ATP, modula espécies reativas de oxigênio (ROS), óxido nítrico (NO) e cálcio

intracelular, ativando vias de transcrição como NF- κ B, PI3K/Akt e ERK, associadas a efeitos anti-inflamatórios, citoprotetores e regenerativos (De Freitas; Hamblin, 2016; Hernández-Bule *et al.*, 2024). Como descrito por Quirk e Whelan (2020), certos comprimentos de onda conseguem alterar a relação entre a CCO e o óxido nítrico (NO), desfazendo a ligação inibitória do NO ao sítio heme da enzima e permitindo que a respiração mitocondrial seja restabelecida. Essa modulação inicial desencadeia ajustes na produção de ATP, espécies reativas e sinalização redox. Hamblin *et al.* (2017) destaca que essas alterações mitocondriais repercutem em vias anti-inflamatórias, reduzindo mediadores pró-inflamatórios e favorecendo mecanismos de reparo. Assim, a FBM atua combinando efeitos fotoquímicos imediatos na mitocôndria com respostas celulares mais amplas que contribuem para sua ação terapêutica.

A literatura demonstra que a FBM com laser modula parâmetros essenciais da biologia de mioblastos C2C12, incluindo viabilidade, proliferação e diferenciação miogênica. As células C2C12, derivadas de células satélites de músculo esquelético murino, constituem modelo consolidado para o estudo dos estágios de ativação, proliferação e fusão mioblástica, bem como para análise da expressão de fatores reguladores da miogênese, como MyoD e myogenin (Oliveira *et al.*, 2014). Segundo Hamblin *et al.* (2017), a FBM em modelos musculares mostrou ser capaz de atenuar o estresse oxidativo, reduzir a expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e TNF- α , além de preservar a integridade das fibras musculares, contribuindo para a recuperação da função contrátil.

Em estudos conduzidos previamente por nosso grupo de pesquisa foi demonstrado o efeito modulatório de lasers e LEDs em células musculares C2C12. Dentre esses trabalhos, Andreo *et al.* (2018) avaliaram o impacto da FBM associada ao transplante de mioblastos C2C12 em músculo esquelético lesionado. O grupo com lesão muscular que recebeu mioblastos inoculados apresentou, no primeiro dia pós-lesão, aumento do infiltrado inflamatório, maior número de fibras imaturas e redução na quantidade de macrófagos. Em contraste, o grupo lesão + mioblastos inoculados + fotobiomodulação apresentou um comportamento distinto com aumento do infiltrado inflamatório aos dias 1 e 3, aumento do número de macrófagos no dia 3, aumento da densidade de vasos

sanguíneos aos dias 3 e 7, além de redução da mionecrose, redução do infiltrado inflamatório e melhor organização das fibras colágenas no sétimo dia. Esses resultados demonstram que a FBM modula dinamicamente fases iniciais e tardias do reparo muscular, favorecendo angiogênese, organização da matriz e resolução progressiva da inflamação, potencializando os efeitos biológicos do transplante de mioblastos C2C12.

Estudos mais recentes também têm ampliado a compreensão dos efeitos da FBM em mioblastos. Lovisetto *et al.* (2022) investigaram a ação de fontes infravermelhas (laser 780 nm e LED 850 nm, 40–70 mW) sobre proliferação, migração e índice de fusão em C2C12. A FBM aumentou significativamente a proliferação e a migração, especialmente na potência de 70 mW; entretanto, não houve alteração no índice de fusão, indicando que, sob os parâmetros testados, a FBM atua principalmente nas fases iniciais da miogênese, sem influenciar a fusão mioblástica.

Em ambiente inflamatório complexo, Dos Santos *et al.* (2020) investigaram C2C12, tratadas ou não com laser, cultivadas com meio condicionado por macrófagos M1, previamente tratados ou não com FBM (780 nm, 70 mW, 1 J). A irradiação reduziu a síntese de óxido nítrico (NO) tanto em mioblastos cultivados em condição de proliferação e diferenciação e diminuiu a produção de IL-6 e TNF- α , demonstrando que a FBM exerce ação anti-inflamatória e redutora de estresse oxidativo mesmo na presença de mediadores pró-inflamatórios derivados de macrófagos M1. O estudo demonstrou que o uso combinado da FBM em macrófagos e mioblastos, potencializa os efeitos benéficos na recuperação muscular. Esses achados sugerem que a FBM favorece um microambiente mais adequado para a progressão da diferenciação miogênica.

Victor *et al.* (2021) avaliaram mioblastos expostos ao lipopolissacarídeo (LPS) tratados com FBM (780 nm, 10 ou 40 mW), observando modulação dependente da dose na viabilidade celular e redução da síntese de NO, sem modificação nos níveis de IL-6. Esses resultados reforçam que os efeitos da FBM em ambientes inflamatórios são predominantemente relacionados à regulação de vias bioenergéticas e redox.

Em conjunto, os estudos disponíveis demonstram que a FBM modula processos essenciais da biologia de mioblastos C2C12, incluindo viabilidade, proliferação e migração, além de atuar de forma significativa sobre vias inflamatórias e oxidativas, especialmente na presença de mediadores pró-inflamatórios. Os achados de Andreo *et al.* (2018) revelam que esses efeitos celulares se traduzem em benefícios funcionais no reparo muscular *in vivo*, destacando o potencial da FBM como estratégia adjuvante em protocolos de regeneração muscular. No entanto, parâmetros relacionados à fusão mioblástica permanecem pouco responsivos a determinados regimes de irradiação, indicando a necessidade de otimização dos parâmetros ópticos e aprofundamento dos mecanismos moleculares envolvidos (Andreo *et al.*, 2018; Lovisetto *et al.*, 2022; Dos Santos *et al.*, 2020; Victor *et al.*, 2021).

Em adição, outros estudos na literatura descrevem o efeito modulatório da FBM sobre células musculares. Neste contexto Ferraresi *et al.*, (2015), observaram que a FBM (irradiação de 780 nm, 10 mW) em células C2C12 induzidas a diferenciação, favoreceu o aumento da atividade de CK após 72h e da viabilidade celular após 24, 48 e 72h. Entretanto, Lovisetto *et al.*, (2022) avaliou os efeitos da FBM em mioblastos utilizando diferentes fontes de luz infravermelha e com diferentes parâmetros dosimétricos, onde a potência de 70 mW mostrou-se mais eficaz na proliferação e migração destas células.

Nguyen *et al.*, (2014) demonstraram que a exposição de células C2C12 à luz no infravermelho próximo promoveu a fosforilação de proteínas sinalizadoras como AMPK e p38 MAPK, com consequente aumento da expressão de PGC-1 α e SIRT1, componentes fundamentais para a adaptação bioenergética e diferenciação muscular. Esses mecanismos sugerem que a FBM não apenas preserva a viabilidade celular, mas também pode otimizar o metabolismo oxidativo, favorecendo a regeneração muscular mesmo em condições adversas.

Apesar das evidências de que a FBM modula processos essenciais da biologia dos mioblastos, como a viabilidade e proliferação, ainda não há estudos que avaliem seus efeitos em modelos de atrofia muscular induzida por glicocorticoides, como a DEXA.

2 JUSTIFICATIVA

Apesar dos avanços recentes demonstrando que a fotobiomodulação (FBM) modula processos fundamentais da biologia dos mioblastos, como viabilidade, proliferação, migração e resposta inflamatória, até o momento não foram identificados estudos que investiguem sua aplicação em modelos de atrofia muscular induzida por glicocorticoides, como a dexametasona. Esse tipo de atrofia permanece um desafio clínico relevante, uma vez que o uso prolongado de glicocorticoides compromete a integridade estrutural e funcional do músculo esquelético. Assim, compreender mecanismos capazes de mitigar os efeitos catabólicos induzidos por dexametasona é essencial para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais seguras e eficazes.

Nesse contexto, o presente estudo se justifica pela necessidade de investigar se a FBM é capaz de atenuar o dano celular, modular vias associadas à inflamação e ao estresse oxidativo e favorecer a progressão miogênica em mioblastos expostos à dexametasona. A hipótese é que a FBM, ao influenciar vias redox e bioenergéticas previamente descritas na literatura, possa aumentar a viabilidade celular, preservar o potencial proliferativo, estimular a diferenciação e melhorar a capacidade migratória das células mesmo em condições adversas induzidas pelo fármaco.

Adicionalmente, a FBM destaca-se como um recurso não invasivo, de fácil aplicação e com perfil de segurança favorável, características que reforçam seu potencial translacional para futuras aplicações clínicas. A utilização da linhagem C2C12, amplamente reconhecida como modelo confiável para investigação da miogênese e dos efeitos de estímulos externos sobre células musculares, fortalece a robustez metodológica e a relevância dos resultados esperados.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar os efeitos da FBM sobre viabilidade, migração, a diferenciação, e a síntese proteica de citocinas em células musculares C2C12 expostas a diferentes concentrações de dexametasona durante o processo de indução da diferenciação.

3.2 Específicos

Avaliar, *in vitro*, os efeitos da FBM em mioblastos C2C12 em meio de diferenciação, expostos às concentrações de 5, 10 e 200 μ M de dexametasona, nos períodos de 24, 48 e 72h, no que se refere:

- Viabilidade celular por meio do ensaio de MTT
- Proliferação celular por meio da avaliação da coloração de Cristal Violeta;
- Aspecto morfológico por meio da coloração May-Grunwald e Giemsa
- Migração celular por meio do ensaio de ferida;
- Síntese das citocinas inflamatórias Interleucina-6 (IL-6) e Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α) por meio de ELISA.

4 METODOLOGIA

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

4.1 Delineamento experimental

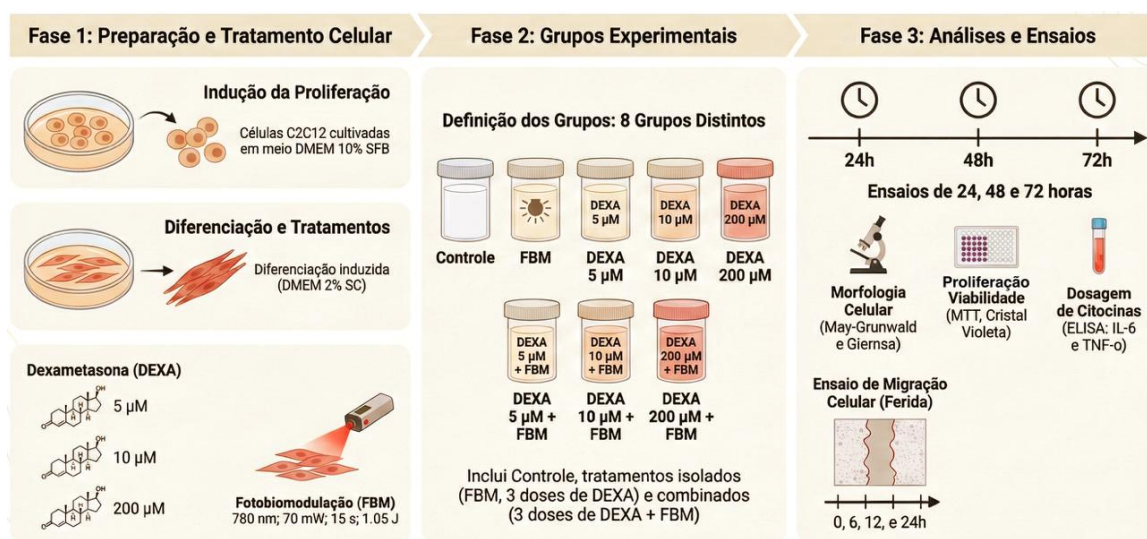


Figura 1. Delineamento experimental. Imagem criada com auxílio da IA (NotebookLM, 2025).

4.2 Cultura celular

Foram utilizadas células miogênicas da linhagem C2C12 (ATCC® CRL-1772™), derivadas de camundongos. As células foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Vitrocell, Campinas, SP, Brasil), pH 7,4, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) para induzir a proliferação e com 2% de soro de cavalo (SC) para induzir a diferenciação.

As culturas celulares foram mantidas em incubadora com atmosfera controlada (HEPA Class 3110, Thermo Electron Corporation, OH, EUA), a 37 °C, em ambiente umidificado contendo 5% de CO₂. O monitoramento do crescimento celular foi realizado a cada 24 horas, por meio de microscopia de contraste de fase (Eclipse TE 2000U, Nikon, Melville, NY, EUA). Os experimentos foram realizados nos períodos de 24, 48 e 72h.

O subcultivo das células foi conduzido em cabine de fluxo laminar (Linha 400, Pachane, Piracicaba, SP, Brasil) sempre que a monocamada atingia o estágio de subconfluência. Inicialmente, o sobrenadante foi removido, seguido por lavagens com tampão fosfato salino (PBS 1X). Em seguida, os mioblastos foram incubados com solução de tripsina 0,1% EDTA por cinco minutos a 37 °C para promoção da desadesão. As células foram transferidas para um tubo cônico de 50ml e submetidas a centrifugação a 1200 rpm por cinco minutos (Centrífuga Excelsa 4-280R, Fanem, São Paulo, SP, Brasil). As células foram então ressuspensas em 1 mL de DMEM.

A viabilidade celular e a contagem das células foram avaliadas em câmara de Neubauer, utilizando coloração com Azul de Trypan 0,4%. Apenas culturas com viabilidade superior a 95% foram utilizadas nos experimentos subsequentes.

4.3 Grupos experimentais

Na literatura, há uma ampla variação nas concentrações de dexametasona empregadas em diferentes estudos, como pode ser observado na Tabela 1. Sendo assim, os grupos experimentais finais foram definidos com base na construção de uma curva de concentração do fármaco, a partir da análise de viabilidade celular da linhagem utilizada no presente estudo. Para esta etapa, as células C2C12 em meio de proliferação foram expostas às concentrações de 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100 e 200 μ M, permitindo avaliar a resposta basal das células frente ao fármaco sem interferência das alterações metabólicas e morfológicas provocadas pela diferenciação. Cada concentração foi testada em quadruplicata e as análises de viabilidade, conforme métodos descritos no item 4.5., foram realizadas de forma independente em três repetições. Importante destacar que, nesta fase, nenhum dos grupos recebeu aplicação de FBM.

Com base nos resultados obtidos nessa análise preliminar, foram selecionadas as concentrações de 5, 10 e 200 μ M para os experimentos subsequentes com aplicação de FBM. Os grupos experimentais são descritos abaixo:

- 1) **Controle:** Mioblastos C2C12 cultivados em meio de diferenciação (DMEM + 2% de SC), sem tratamento.
- 2) **FBM:** Mioblastos C2C12 cultivados em meio de diferenciação (DMEM + 2% de SC), submetidos à FBM.
- 3) **DEXA 5 μ M:** Mioblastos C2C12 cultivados em meio de diferenciação (DMEM + 2% de SC) e expostos a 5 μ M de dexametasona.
- 4) **DEXA 10 μ M:** Mioblastos C2C12 cultivados em meio de diferenciação (DMEM + 2% de SC) e expostos a 10 μ M de dexametasona.
- 5) **DEXA 200 μ M:** Mioblastos C2C12 cultivados em meio de diferenciação (DMEM + 2% de SC) e expostos a 200 μ M de dexametasona.
- 6) **DEXA 5 μ M + FBM:** Mioblastos C2C12 cultivados em meio de diferenciação (DMEM + 2% de SC), expostos a 5 μ M de dexametasona e tratados com FBM.
- 7) **DEXA 10 μ M + FBM:** Mioblastos C2C12 cultivados em meio de diferenciação (DMEM + 2% de SC), expostos a 10 μ M de dexametasona e tratados com FBM.
- 8) **DEXA 200 μ M + FBM:** Mioblastos C2C12 cultivados em meio de diferenciação (DMEM + 2% de SC), expostos a 200 μ M de dexametasona e tratados com FBM.

4.4 Tratamento das células com dexametasona

Para este estudo foi utilizado o fármaco fosfato dissódico de dexametasona ($C_{22}H_{28}FNa_2O_8P$ - peso molecular 516,41 g/mol) na forma de solução injetável a 4mg/mL (4.000 μ g/mL = 7,75 mM), sob o nome comercial Decadron (Aché Laboratórios Farmacêuticos S.A., São Paulo, SP, Brasil. MS n. 1.0573.0302).

As concentrações de interesse de 5, 10 e 200 μ M utilizadas nos ensaios experimentais foram obtidas por adição da solução estoque ao meio de cultura DMEM suplementado com 2% de SC, respeitando-se as condições de esterilidade e assegurando a homogeneidade da mistura. As soluções de

estoque foram preparadas a partir do frasco comercial 4mg/mL em diluições 1:10 ($\approx 400 \mu\text{g/mL}$) e 1:100 ($\approx 40 \mu\text{g/mL}$) em meio DMEM, garantindo que as concentrações mais baixas de 5 e 10 μM não fossem prejudicadas pelo baixo volume durante a pipetagem.

O volume (μL) e a concentração (μM) finais desejados foram calculados utilizando-se a seguinte fórmula:

$$C_1.V_1 = C_2.V_2$$

Onde:

C_1 = concentração solução estoque (μM)

C_2 = concentração final desejada (μM)

V_2 = volume final total de meio (μL)

V_1 = volume da solução estoque a ser adicionado (μL)

4.5 Tratamento das células utilizando a FBM

Após confirmação da viabilidade celular, conforme métodos descritos no item 4.2., as células C2C12 foram submetidas a um único protocolo de irradiação no início de cada ensaio experimental, utilizando o equipamento Twin-laser (MM Optics, São Carlos, SP, Brasil) e protocolo de irradiação baseado em estudos prévios que demonstraram efeitos modulatórios positivos para estas células (Lovisetto *et al.*, 2022; Santos *et al.*, 2020). Os parâmetros dosimétricos estão descritos na Tabela 2.

Para isso, utilizou-se tubos de centrifugação contendo o precipitado celular. A ponteira do equipamento laser foi posicionada perpendicularmente à base dos tubos, a uma distância mínima, garantindo que o feixe luminoso incidisse diretamente sobre o pellet celular, antes de atravessar qualquer porção significativa do meio de cultura, com o objetivo de otimizar a absorção da radiação pelas células-alvo (Santos *et al.*, 2020; Lovisetto *et al.*, 2022). Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos em ambiente de baixa luminosidade, a fim de evitar interferências provenientes da luz externa.

Tabela 2. Parâmetros dosimétricos utilizados para o tratamento da FBM

Parâmetros	Valores
Comprimento de onda (nm)	780
Largura espectral (nm)	10
Modo de funcionamento	Contínuo
Potência (mW)	70
Polarização	Random
Diâmetro de abertura (cm)	0.23
Irradiância na abertura (W/cm ²)	1.75
Área do feixe (cm ²)	0.04
Tempo (s)	15
Exposição radiante (J/cm ²)	26.25
Número de pontos irradiados	1
Área irradiada (cm ²)	0.04
Técnica de aplicação	Contato
Número de sessões e frequência	1
Energia total (J)	1.05

4.6 Viabilidade celular – MTT

Para a avaliação da viabilidade celular, foi empregada a técnica de MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide – CAS 57360-69-7 – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). O MTT é reduzido pela enzima succinato desidrogenase, localizada predominantemente nas mitocôndrias, mas também presente no nucléolo, lisossomos e complexo de Golgi, formando cristais insolúveis de formazan. A quantidade de formazan gerada é diretamente proporcional à viabilidade celular e pode ser quantificada por análise colorimétrica.

As células (1×10^4 por poço), previamente cultivadas em placas de 96 poços de fundo chato (KASVI, K12-096, Paraná, Brasil) e mantidas em seus

respectivos meios, conforme apresentado no item 4.3, foram avaliadas após 24, 48 e 72 horas de incubação. Cada grupo experimental foi analisado em quintuplicata e os ensaios foram realizadas de forma independente em três repetições.

Após o período de incubação, o sobrenadante de cada poço foi cuidadosamente armazenado e as células mortas removidas por lavagem com solução tampão PBS (pH 7,4). Em seguida, adicionou-se 50 µL da solução de MTT a 0,5% (p/v) a cada poço, com posterior incubação por 3 horas em incubadora (HEPA class 3110, Thermo Electron Corporation) a 37 °C, sob atmosfera umidificada com 5% de CO₂. Ao final desse período, os cristais de formazan formados foram solubilizados pela adição de 100 µL de isopropanol (Synth, Diadema, SP, Brasil) por poço. A leitura da densidade óptica foi realizada em leitor de microplacas (Anthos2020®, Anthos Labtec Instruments, Wals, Áustria), com comprimento de onda de 620 nm (Dos Santos *et al.*, 2020). Os dados do ensaio de MTT foram normalizados e expressos como porcentagem em relação controle (100%) do período de 24h, afim de reduzir variações associadas à absorbância e permitir comparações consistentes entre os tratamentos (Carreño *et al.*, 2021)

4.7 Proliferação celular – Cristal violeta

As células C2C12 (1×10⁴ por poço) de todos os grupos experimentais foram previamente semeadas em placas de 96 poços de fundo chato (KASVI, K12-096, Paraná, Brasil) e mantidas em seus respectivos meios, conforme descrito no item 4.3. As análises foram realizadas após 24, 48 e 72 horas de incubação. Cada grupo experimental foi avaliado em quintuplicata, com três experimentos conduzidos de forma independente.

Após o período de incubação, o sobrenadante foi cuidadosamente coletado e armazenado, seguido da lavagem dos poços com tampão PBS (pH 7,4) para a remoção de células não aderentes e detritos. Em seguida, adicionou-se 40 µL da solução de Cristal Violeta (5% p/v em 20% v/v de metanol) a cada poço, com incubação à temperatura ambiente por 15 minutos. Após esse

período, os poços foram lavados duas vezes com água destilada para eliminar o excesso de corante. A fixação e lise celular foram realizadas com a adição de 100 µL de metanol (Synth, Diadema, SP, Brasil) em cada poço e homogeneizadas. Em seguida, a absorbância foi medida a 620 nm utilizando um leitor de microplacas (Anthos2020®, Anthos Labtec Instruments, Wals, Áustria), permitindo a quantificação da proliferação celular com base na intensidade da coloração obtida (Dos Santos *et al.*, 2020). A absorbância obtida foi normalizada em relação grupo controle (100%) do período de 24h, reduzindo as variações experimentais e possibilitando comparações mais consistentes entre os diferentes tratamentos.

4.8 Morfologia - Coloração May-Grunwald e Giemsa

Com o objetivo de avaliar a morfologia celular após os procedimentos experimentais, foi realizada a coloração das células utilizando a técnica combinada com os corantes May-Grunwald e Giemsa (Pansters *et al.*, 2011). Essa metodologia permite a visualização detalhada dos núcleos e da estrutura dos mioblastos e miotubos, possibilitando também o cálculo do índice de fusão celular decorrente do processo de diferenciação, bem como a estimativa da distribuição nuclear associada às fases de proliferação ou diferenciação das células C2C12 (Veliça; Bunce, 2011).

Para isso, células C2C12 (1×10^4 células/poço) de todos os grupos experimentais foram previamente semeadas em placas de 96 poços (KASVI, K12-096, Paraná, Brasil) e mantidas em seus respectivos meios, conforme apresentado no item 4.3, pelos períodos de 24, 48 e 72 horas. Cada condição foi avaliada em quintuplicata, sendo os experimentos realizados de forma independente em três repetições.

Após os períodos de incubação, o sobrenadante foi cuidadosamente removido, e os poços foram lavados com PBS gelado. Em seguida, as células foram fixadas com a adição de 40 µL de álcool metílico (Synth, Diadema, SP, Brasil) por 5 minutos. As placas foram então secas por 10 minutos em fluxo laminar. Na etapa seguinte, adicionou-se 40 µL do corante May-Grunwald

(Renylab, Barbacena, MG, Brasil), previamente diluído na proporção 1:3 em tampão fosfato de sódio (1 mM NaH_2PO_4 e 1 mM Na_2HPO_4 , pH 5,8), com tempo de incubação de 5 minutos. Após esse período, os poços foram lavados duas vezes com água destilada e, posteriormente, incubados com 40 μL do corante Giemsa (Renylab, Barbacena, MG, Brasil), diluído 1:20 no mesmo tampão, por 10 minutos. Por fim, os poços foram lavados duas vezes com PBS e as placas foram secas à temperatura ambiente (Dos Santos *et al.*, 2020). As imagens foram obtidas utilizando microscópio invertido de contraste de fase (Eclipse TE300, Nikon, Tokyo, Japan – 40X). A análise foi feita através do software ImageJ, por meio da contagem manual de células mono, bi e multinucleadas (Figura 2). A distribuição de núcleos (%) por campo foi calculada: $[(\text{número de núcleos compondo os mioblastos ou miotubos por campo}) / (\text{total de núcleos presente por campo}) \times 100]$. Posteriormente foi calculada a média de cinco campos. O índice de fusão foi calculado a partir da soma dos núcleos das células binucleadas e multinucleadas em cinco campos, dividido pelo número total de núcleos e multiplicado por 100 (Dos Santos *et al.*, 2020).

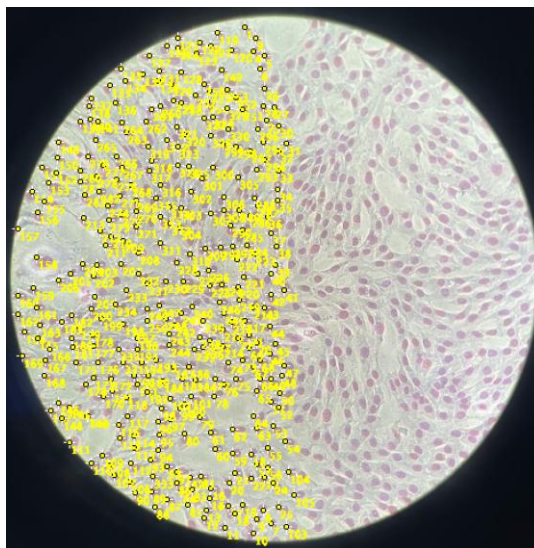


Figura 2 – Contagem manual das células utilizando o software ImageJ.

4.9 Migração celular - Ensaio de Ferida

O ensaio de ferida *in vitro* é uma técnica simples, de baixo custo, reprodutível e eficaz para avaliar o processo de migração celular (Liang, *et al.* 2007). Esse método consiste na simulação de uma “ferida” na monocamada celular por meio da raspagem com a ponteira de uma micropipeta (200 µL) no centro do poço da placa de cultura, induzindo, assim, a migração das células de forma perpendicular às bordas da área lesionada (Lovisetto *et al.*, 2022).

As células C2C12 ($1,4 \times 10^5$ por poço) de todos os grupos experimentais foram previamente semeadas em placas de 6 poços de fundo chato (KASVI, K12-006, Paraná, Brasil) e mantidas em seus respectivos meios, conforme apresentado no item 4.3, pelo período de 24h a 37 °C, sob atmosfera umidificada com 5% de CO₂. Em seguida, o ensaio de ferida foi realizado com o auxílio de uma ponteira de micropipeta (200 µL), gerando uma lacuna linear no centro de cada poço. As placas foram então retornadas à incubadora, onde permaneceram até os momentos programados para análise de 6, 12 e 24h (Lovisetto *et al.*, 2022).

As imagens foram obtidas imediatamente após a realização do risco (tempo zero) e nos tempos experimentais subsequentes (6, 12 e 24h) utilizando microscópio invertido de contraste de fase (Eclipse TE 2000U, Nikon, Melville, NY, EUA). A análise foi feita através do software ImageJ, por meio da delimitação manual em pixel da área livre de células (Figura 3).

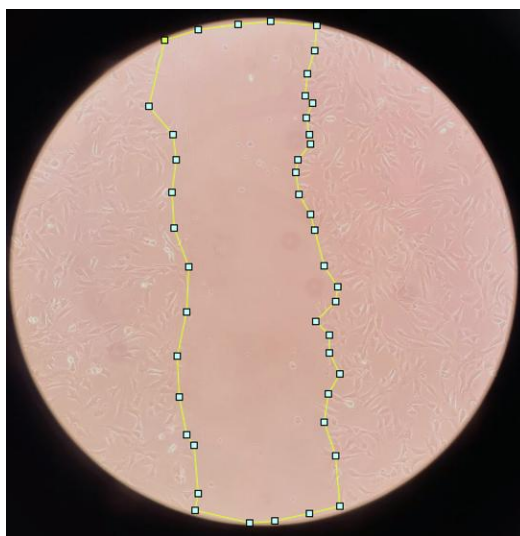


Figura 3 – Delimitação manual da área de ferida utilizando o software ImageJ.

A taxa de migração celular foi determinada por meio do cálculo da porcentagem de fechamento da ferida, conforme descrito por Grada *et al.*, (2017). Onde $A_{t=0h}$ corresponde a área inicial da ferida medida logo após o risco e $A_{t=\Delta h}$ à área remanescente após os períodos de incubação. Desta forma, valores mais elevados indicam maior migração celular e, conseqüentemente, maior porcentagem de fechamento da ferida, uma vez que refletem um deslocamento mais eficiente das células para o interior da área lesionada.

$$\text{Fechamento da ferida \%} = \left[\frac{A_{t=0h} - A_{t=\Delta h}}{A_{t=0h}} \right] \times 100\%$$

4.10 Dosagem proteica das citocinas IL-6 e TNF- α

As proteínas pró-inflamatórias Interleucina-6 (IL-6) e Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- α) desempenham papéis centrais na regulação da resposta imunológica e do microambiente inflamatório no tecido muscular esquelético, especialmente durante processos de lesão e regeneração (Tidball, 2005, 2017). A ação dessas citocinas é dependente do tempo de exposição e da intensidade da inflamação. Sendo assim, exercem diferentes efeitos ao longo do processo de regeneração muscular, podendo tanto estimular quanto inibir as diversas etapas da miogênese (Tidball, 2011).

As células C2C12 ($0,4 \times 10^6$ por poço) de todos os grupos experimentais foram previamente semeadas em placas de petri 5mm e mantidas em seus respectivos meios, conforme apresentado no item 4.3, pelo período de 24, 48 e 72h. Após os períodos de incubação, o sobrenadante foi cuidadosamente removido e a dosagem das citocinas foi realizada por meio da técnica de imunoensaio – ELISA. Foram utilizados os kits comerciais para IL-6 (Biolegend mouse IL-6-ELISA MAXTM Standard Sets-431301, Pacific Heights Blvd., San Diego, CA 92121) e TNF- α (Biolegend mouse TNF- α – ELISA MAXTM Standard Sets -430901, Pacific Heights Blvd., San Diego, CA 92121), seguindo os protocolos descritos pelo fabricante. Foram realizados três experimentos independentes.

4.11 Normalização das amostras de acordo com a proteína total

Para a correção das variações das análises, a proteína total foi quantificada em um NanoDrop 2000 (ThermoScientific) a partir do sobrenadante de todos os grupos experimentais, nos diferentes períodos de avaliação (24, 48 e 72h). A proteína total (mg/mL) de cada grupo foi então utilizada como proporção para os valores de absorbância obtidos a partir da dosagem proteica de IL-6 e TNF- α .

4.12 Análise estatística

A distribuição da normalidade dos dados foi avaliada pelo teste Kolmogorov-Smirno. Todos os valores foram expressos em média $\pm$ erro padrão e a comparação entre os tratamentos foi verificada utilizando o teste de Variância de uma via (*one-way analyses of variance*, ANOVA). A significância estatística entre os grupos experimentais foi verificada pelo teste de Tukey com nível de aceitação igual ou superior a 95%. Os dados foram analisados utilizando-se o *software* GraphPad Prism 8.0.

5 RESULTADOS

5.1 Curva dose resposta considerando diferentes concentrações de dexametasona e viabilidade de C2C12

Para auxiliar a definição dos grupos experimentais, foi realizada uma curva com diferentes concentrações de DEXA em células C2C12 em meio de proliferação. A análise por MTT permitiu avaliar a viabilidade das células C2C12 após exposição ao fármaco durante período proliferativo, sem interferência das modificações metabólicas e morfológicas inerentes a diferenciação celular. Os resultados estão apresentados na Figura 4.

Após 24h (Figura 4A), não houve diferença significativa entre os grupos, indicando que a exposição inicial à dexametasona, independentemente da concentração, não foi suficiente para reduzir de forma expressiva a atividade metabólica das células no curto prazo.

Considerando o período de 48h (Figura 4B), observa-se queda significativa da viabilidade celular em todas as concentrações de dexametasona avaliadas. O efeito deletério torna-se mais evidente, sugerindo que a toxicidade celular é dependente do tempo de exposição. Por fim, após 72h (Figura 4C), a redução na viabilidade é mantida, sendo mais pronunciada nas concentrações mais altas (100 e 200 μ M), demonstrando o efeito cumulativo do fármaco e reforçando a dependência tanto de tempo quanto de dose para indução de dano celular.

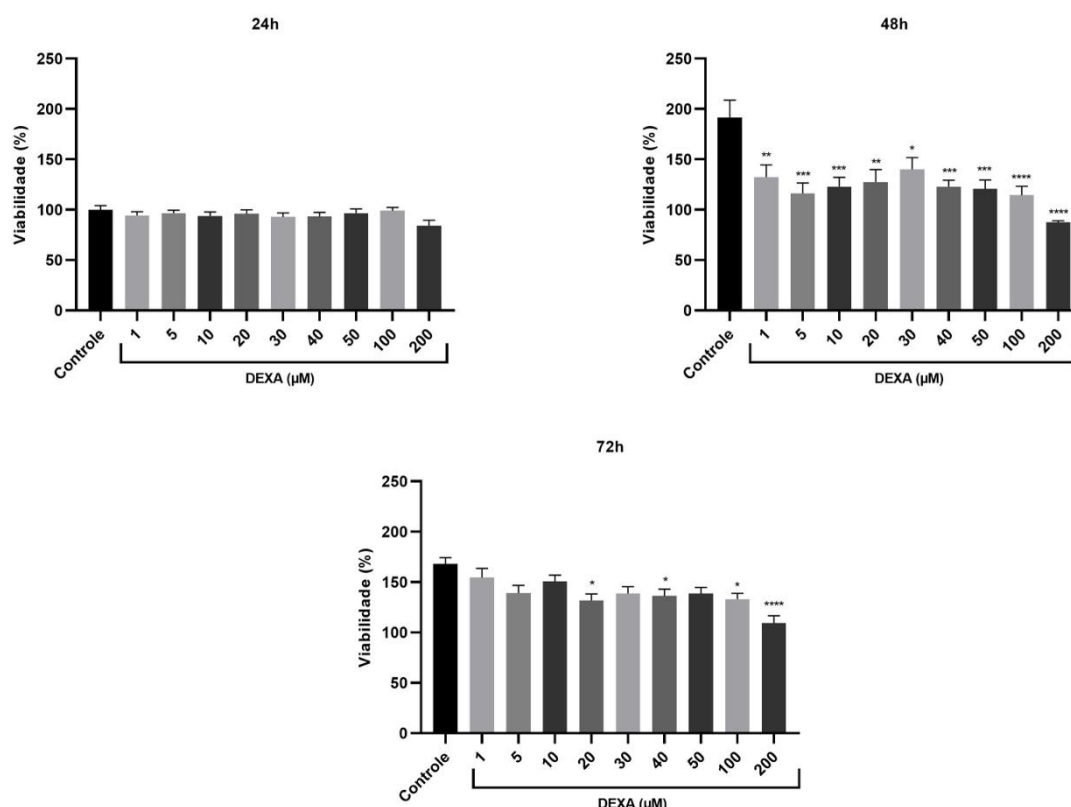


Figura 4 – Viabilidade celular em mioblastos na presença de diferentes concentrações de dexametasona. As células C2C12 (1×10^4 células/poço) em meio de proliferação foram avaliadas após 24h (A), 48h (B) e 72h (C). Análise da diferença significativa realizada em comparação ao grupo controle. ANOVA / Tukey: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

5.2 Viabilidade Celular - MTT

Os resultados referentes à análise de viabilidade das células C2C12 expostas isoladamente a DEXA, nas diferentes concentrações avaliadas, ou quando esta foi combinada a FBM estão demonstrados na figura 5.

Nas 24h (Figura 5A) de exposição, os grupos tratados com DEXA (5, 10 e 200 μM) apresentaram valores de viabilidade celular muito próximos ao controle. Não se observou uma queda significativa dependente de dose neste tempo inicial e a associação DEXA + FBM mostrou diferenças em relação aos respectivos grupos com DEXA isolada.

Após 48h (Figura 5B), as células C2C12 tratadas somente com dexametasona apresentaram redução significativa da viabilidade celular, com queda progressiva conforme o aumento da concentração do fármaco. Os grupos

tratados com 5, 10 e 200 μM de DEXA exibiram diminuições estatisticamente significativas em relação ao controle em todas as concentrações.

A fotobiomodulação aplicada isoladamente não alterou a viabilidade celular em relação ao controle. Entretanto, quando associada à DEXA, a FBM atenuou parcialmente a redução de viabilidade, especialmente nas concentrações de 5 e 10 μM , que apresentaram valores superiores aos grupos tratados apenas com DEXA. Essa diferença estatística entre os grupos DEXA vs. DEXA + FBM demonstra o efeito da FBM na recuperação parcial da viabilidade.

Em conjunto, os dados mostram que, após 48h, a DEXA reduz a viabilidade de maneira concentração-dependente, enquanto a FBM exerce efeito protetor parcial, mas não suficiente para restaurar totalmente os níveis observados no grupo controle.

Após 72 h de incubação (Figura 5C), observa-se que o tratamento com dexametasona continua reduzindo a viabilidade celular de modo concentração-dependente. A concentração de 5 μM apresenta redução significativa em relação ao controle ($p < 0,05$), enquanto 200 μM promove queda acentuada ($p < 0,0001$), indicando um efeito citotóxico mais pronunciado com o prolongamento da exposição. A fotobiomodulação aplicada isoladamente mantém a viabilidade em níveis comparáveis ao controle, sem efeito deletério. Nos grupos DEXA + FBM, nota-se que a FBM atenua parcialmente os efeitos da DEXA nas concentrações de 5 e 10 μM , resultando em valores significativamente superiores aos grupos tratados apenas com DEXA. No entanto, para 200 μM , mesmo com a aplicação de FBM, a viabilidade permanece com redução significativa em relação ao controle ($p < 0,0001$),

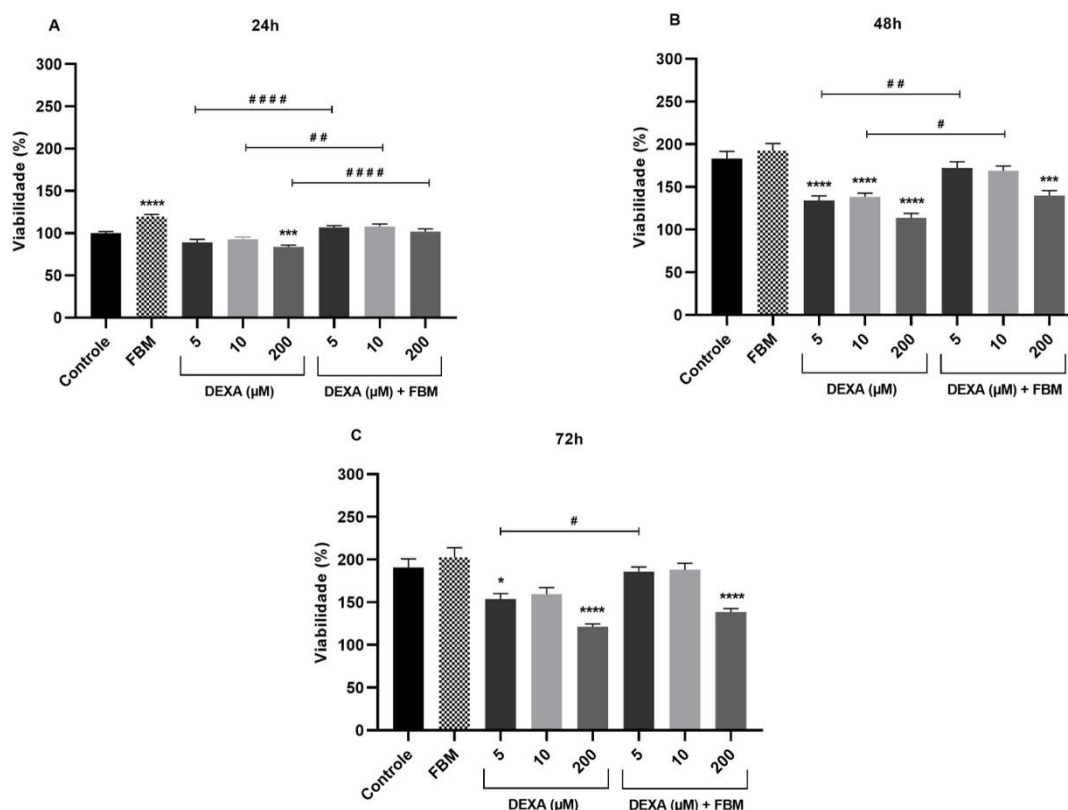


Figura 5. Viabilidade das células musculares C2C12 expostas à DEXA e/ou à FBM por 24 h (A), 48 h (B) e 72 h (C), avaliada pelo ensaio de MTT (620 nm). Observa-se redução da viabilidade celular nos grupos tratados com DEXA de forma dependente do tempo e da concentração, enquanto a FBM atenuou parcialmente esses efeitos. Os dados estão expressos como média $\pm$ erro padrão. As diferenças significativas em relação ao grupo controle estão indicadas por asteriscos (*) e as diferenças significativas entre grupos tratados com a mesma concentração de DEXA estão indicadas por hashtags (#). ANOVA seguida do teste de Tukey: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$; #### $p < 0,0001$.

5.3 Proliferação Celular - Cristal Violeta

Os resultados referentes a análise de proliferação das células C2C12 expostas isoladamente a DEXA, nas diferentes concentrações avaliadas, ou quando esta foi combinada a FBM estão demonstrados na Figura 6.

Na avaliação de 24h (Figura 6A), não houve diferença significativa na absorbância entre os grupos tratados apenas com DEXA (5, 10 e 200 μ M) e o controle. Em contrapartida, os grupos que receberam DEXA associada à FBM apresentaram aumento de proliferação em relação aos grupos tratados apenas com DEXA e em relação ao controle. A diferença entre DEXA isolada e DEXA + FBM foi estatisticamente significativa em todas as concentrações analisadas.

Após 48 h (Figura 6B), não houve alteração significativa na proliferação dos grupos tratados apenas com DEXA (5, 10 ou 200 μ M) em relação ao controle. Os grupos tratados com DEXA + FBM apresentaram aumento significativo da proliferação em comparação ao controle. Na comparação entre grupos com a mesma concentração, a diferença entre DEXA isolada e DEXA + FBM foi estatisticamente significativa em todas as concentrações analisadas.

Considerando o período de 72h (Figura 6C), novamente não houve alteração significativa na proliferação dos grupos tratados apenas com DEXA (5, 10 ou 200 μ M) em relação ao controle. Contudo, os grupos DEXA 5 μ M + FBM e DEXA 10 μ M + FBM mostraram aumento significativo da proliferação em comparação ao controle. Na comparação dentro da mesma concentração, o grupo DEXA 5 μ M + FBM apresentou proliferação significativamente maior do que o respectivo grupo de mesma concentração tratado apenas com DEXA.

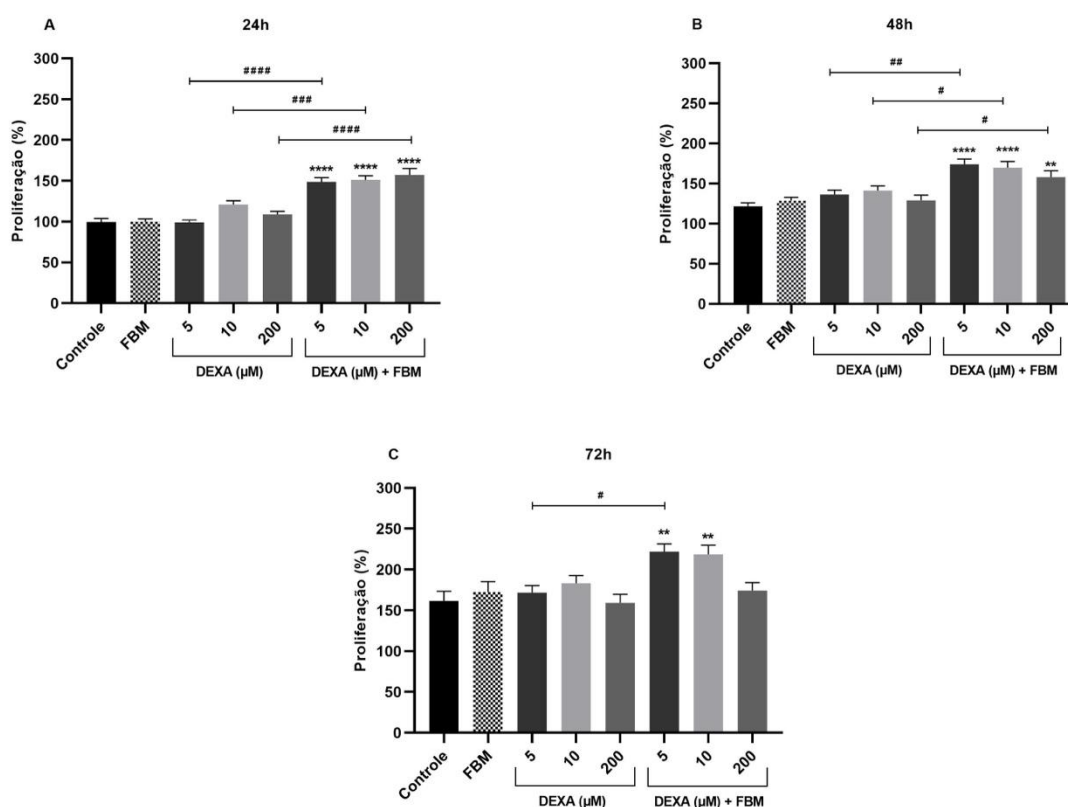


Figura 6. Proliferação celular de mioblastos C2C12 avaliada pelo ensaio de cristal violeta após 24 h (A), 48 h (B) e 72 h (C) de exposição à DEXA em diferentes concentrações, isoladamente ou em combinação com a FBM. Os dados estão expressos como média $\pm$ erro padrão. Diferenças significativas em relação ao grupo controle estão indicadas por asteriscos (*), e diferenças entre grupos tratados com a mesma concentração de DEXA estão indicadas por hashtags (#). A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey: *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001; #p < 0,05; ##p < 0,01; ###p < 0,001; ####p < 0,0001.

5.4 Morfologia - Coloração May-Grunwald e Giemsa

A distribuição do número de núcleos por célula ao longo do tempo de diferenciação é apresentada na Figura 7. Em 24 h (Figura 7A), a maioria das células manteve-se mononucleada, indicando fase inicial do processo de diferenciação. Após 48 h (Figura 7B), observou-se aumento gradual da proporção de células binucleadas e multinucleadas, especialmente nos grupos controle e submetidos à FBM, refletindo o avanço da fusão celular. Após 72 h (Figura 7C), a predominância de células multinucleadas foi ainda mais evidente, caracterizando o estágio de formação de miotubos maduros.

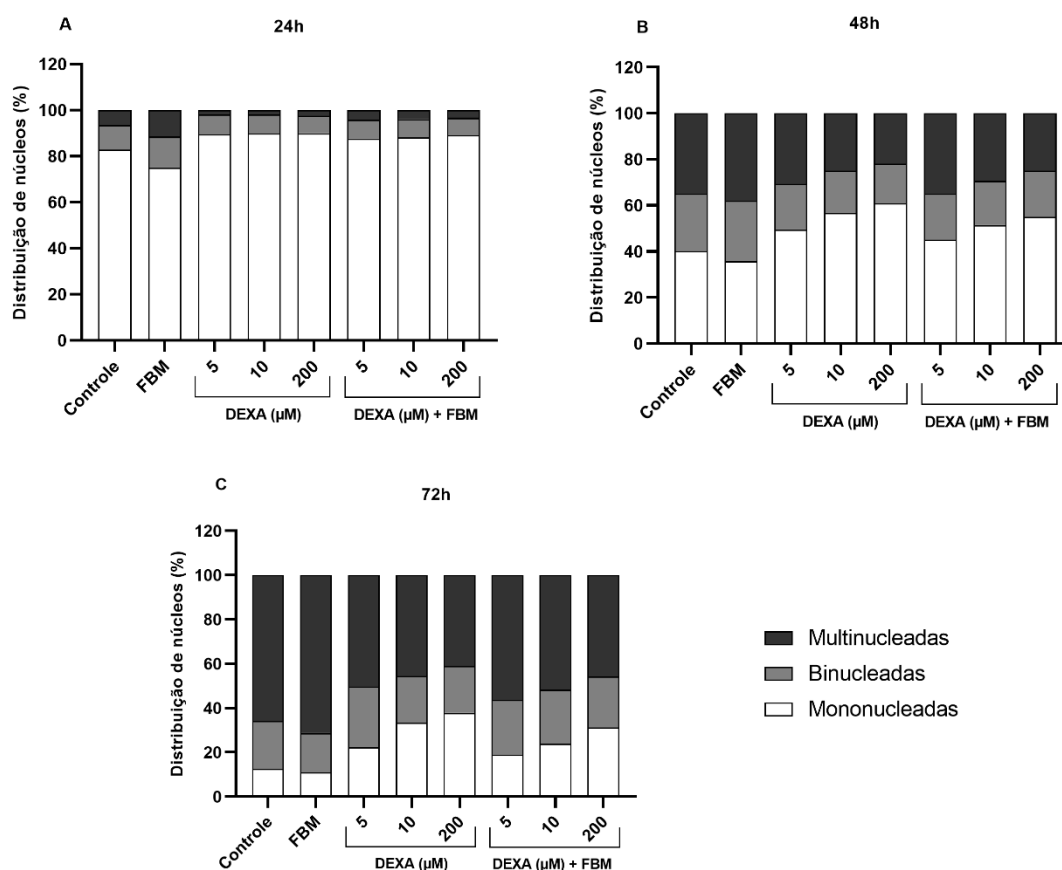


Figura 7. Distribuição percentual de núcleos em células C2C12 após 24 h (A), 48 h (B) e 72 h (C) de diferenciação. A dexametasona (DEXA) reduziu a proporção de células multinucleadas de forma dose-dependente, enquanto a fotobiomodulação (PBM) reverteu parcialmente esse efeito, aumentando a formação de células multinucleadas.

Os resultados referentes ao índice de fusão das células C2C12 estão apresentados na Figura 8. Após 24 h (Figura 8A), todos os grupos tratados com

DEXA (5, 10 e 200 μ M), com ou sem FBM, apresentaram redução significativa do índice de fusão em comparação ao controle. O grupo tratado apenas com FBM mostrou aumento significativo do índice de fusão em relação ao controle. Nenhum grupo DEXA ou DEXA + FBM apresentou valores semelhantes ao controle.

Após 48 h (Figura 8B), os grupos tratados com DEXA (5, 10 e 200 μ M) apresentaram redução significativa do índice de fusão quando comparados ao controle. Os grupos DEXA + FBM também mostraram redução significativa em relação ao controle. Na comparação entre grupos com a mesma concentração de DEXA, observou-se que os grupos DEXA + FBM apresentaram índice de fusão significativamente maior do que os grupos tratados apenas com DEXA, indicando atenuação parcial da redução induzida pela dexametasona. O grupo tratado apenas com FBM apresentou aumento significativo do índice de fusão em comparação ao controle.

Após 72 h (Figura 8C), todos os grupos tratados com DEXA (5, 10 e 200 μ M) mostraram redução significativa do índice de fusão em relação ao controle. Os grupos DEXA + FBM também apresentaram redução significativa em comparação ao controle, mesmo com a aplicação da fotobiomodulação. Na comparação dentro da mesma concentração, os grupos DEXA + FBM apresentaram índice de fusão significativamente maior do que os grupos tratados apenas com DEXA, demonstrando efeito atenuador da FBM, embora sem restaurar os níveis observados no controle.

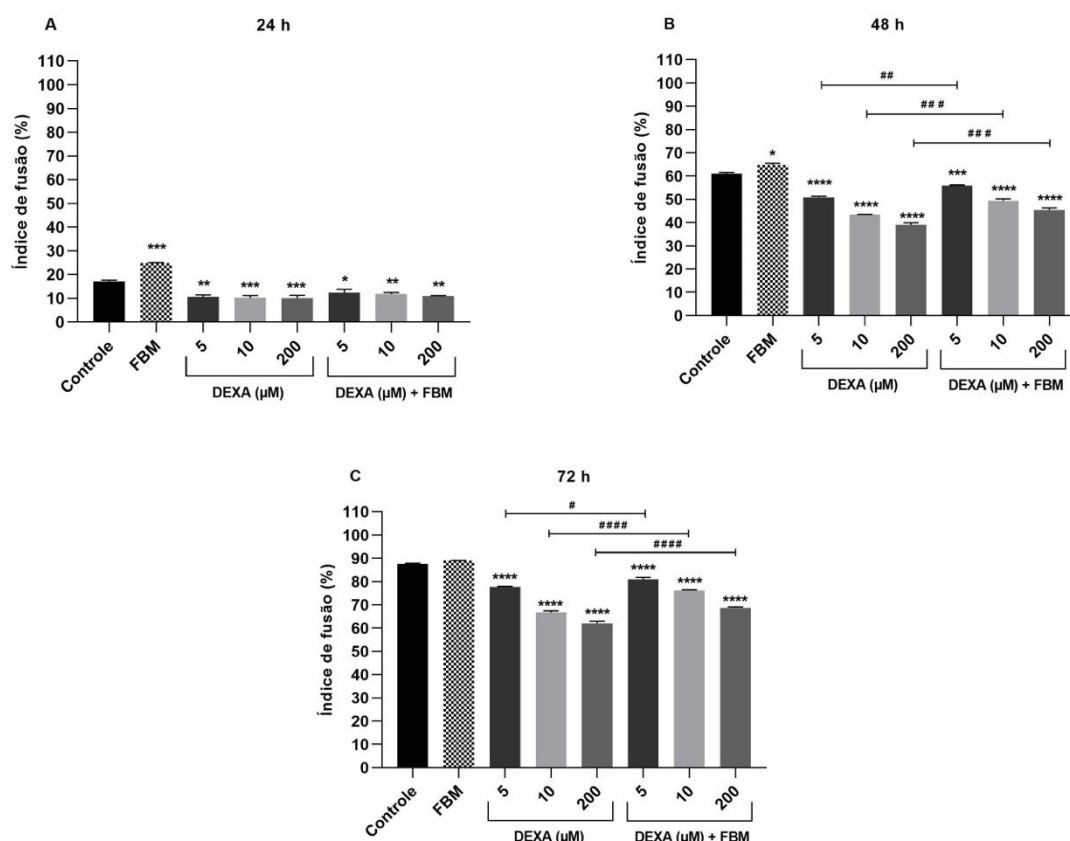


Figura 8. Índice de fusão (%) de mioblastos C2C12 expostos à DEXA e/ou FBM por 24, 48 e 72 horas. Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão. Diferenças significativas em comparação ao grupo controle são indicadas por asteriscos (*), e diferenças entre os grupos tratados com a mesma concentração de DEXA são indicadas por hashtags (#). A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de Tukey: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$; #### $p < 0,0001$.

A morfologia celular foi avaliada através de imagens dos miotubos, como apresentados na Figura 9.

Ao longo dos períodos de 24, 48 e 72 h, as células do grupo controle apresentaram morfologia típica de mioblastos em diferenciação, com formato alongado, alinhamento progressivo e formação visível de estruturas compatíveis com miotubos em 72 h.

Nos grupos tratados com dexametasona, observou-se alteração morfológica em todos os tempos analisados, caracterizada por redução do alongamento celular, menor alinhamento entre os mioblastos e presença aumentada de células com formato mais arredondado. Esses efeitos tornaram-se mais evidentes com o aumento da concentração de DEXA e com o prolongamento do tempo de incubação, sendo a diminuição de estruturas

compatíveis com miotubos mais clara após 72 h.

A fotobiomodulação aplicada isoladamente manteve a morfologia semelhante à observada no controle, com preservação do alongamento, maior organização celular e presença de estruturas compatíveis com miotubos em 72 h. Nos grupos DEXA + FBM, a fotobiomodulação atenuou parcialmente as alterações induzidas pela DEXA, resultando em maior número de células alongadas e melhor organização do que nos grupos tratados apenas com o fármaco. Contudo, em concentrações mais altas de DEXA e em 72 h, ainda foram observadas características morfológicas prejudicadas em comparação ao controle.

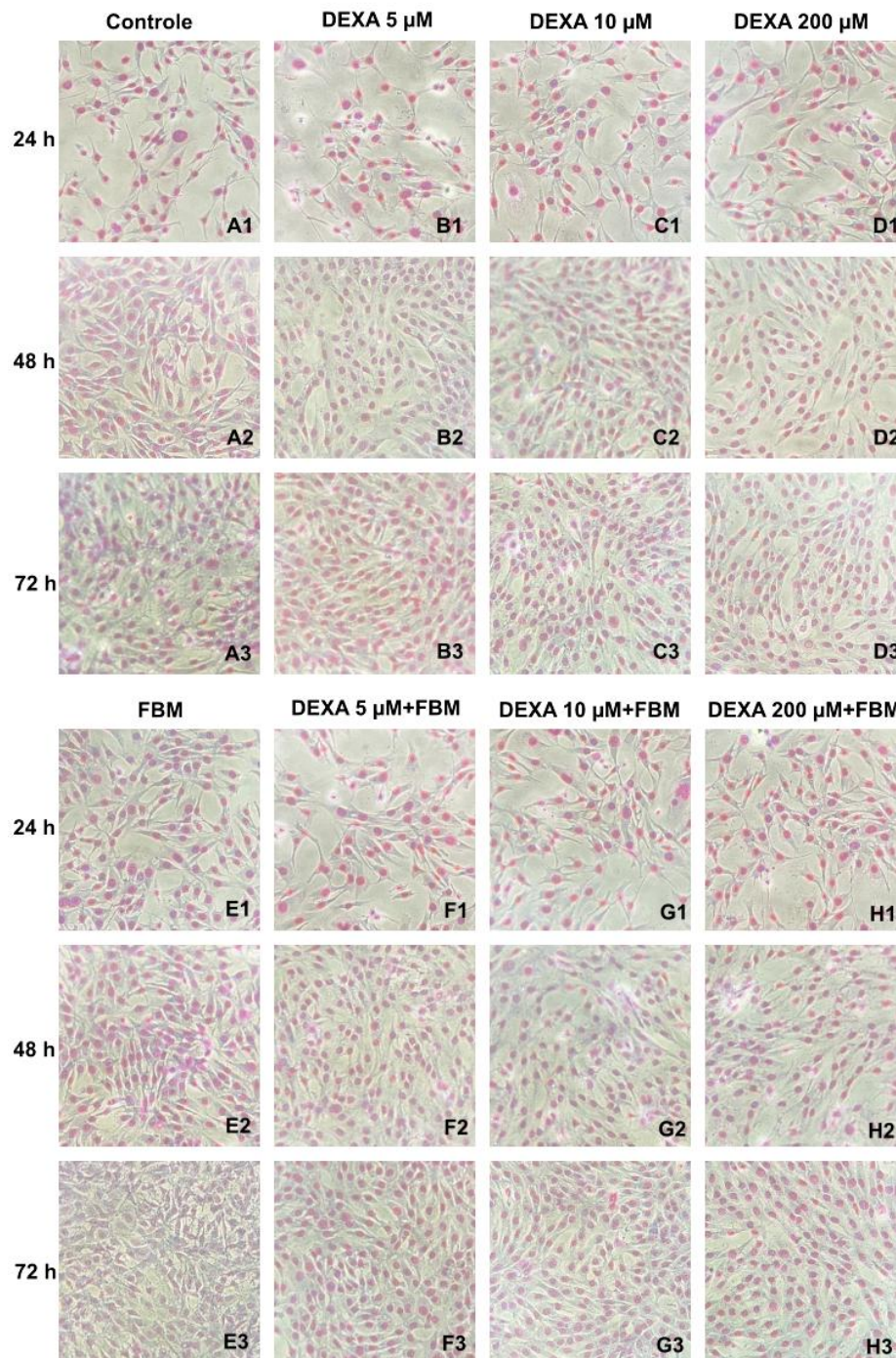


Figura 9. Coloração de May-Grünwald e Giemsa das células musculares C2C12 expostas à DEXA e/ou à FBM por 24, 48 e 72 h. As imagens demonstram a morfologia celular e a fusão nuclear ao longo dos períodos experimentais. (A1–A3) Controle; (B1–B3) DEXA 5 μ M; (C1–C3) DEXA 10 μ M; (D1–D3) DEXA 200 μ M; (E1–E3) FBM; (F1–F3) DEXA 5 μ M + FBM; (G1–G3) DEXA 10 μ M + FBM; (H1–H3) DEXA 200 μ M + FBM. A DEXA, especialmente na concentração de 200 μ M, reduziu a fusão dos mioblastos, enquanto a FBM atenuou parcialmente esses efeitos, promovendo maior número de miotubos multinucleados. *Fonte: a autora; aumento de 40X..*

5.5 Migração celular – Ensaio de Ferida

No ensaio de migração celular, observou-se que o fechamento da área aumentou progressivamente ao longo do tempo em todos os grupos experimentais, com diferenças conforme o tratamento aplicado. Os resultados estão apresentados nas Figuras 10 e 11.

Após 6 h (Figura 10A), as concentrações de 5, 10 e 100 μ M de DEXA não alteraram significativamente o fechamento da ferida em relação ao controle, enquanto 200 μ M promoveu redução significativa. Nos grupos tratados com DEXA associada à FBM, observou-se aumento significativo do fechamento da área da ferida em todas as concentrações testadas quando comparados aos respectivos grupos tratados apenas com DEXA.

Após 12 h (Figura 10B), todas as concentrações de DEXA reduziram significativamente o fechamento da ferida. No entanto, os grupos DEXA + FBM exibiram incremento significativo no fechamento da área ferida, superando os valores observados nos grupos tratados somente com DEXA dentro de cada concentração.

Em 24 h (Figura 10C), tanto os grupos tratados com DEXA quanto os grupos DEXA + FBM apresentaram redução significativa do fechamento da ferida em comparação ao controle. Entretanto, dentro de cada concentração, os grupos DEXA + FBM demonstraram fechamento significativamente maior do que seus respectivos grupos tratados apenas com DEXA, indicando efeito benéfico da FBM sobre a migração celular nas condições avaliadas.

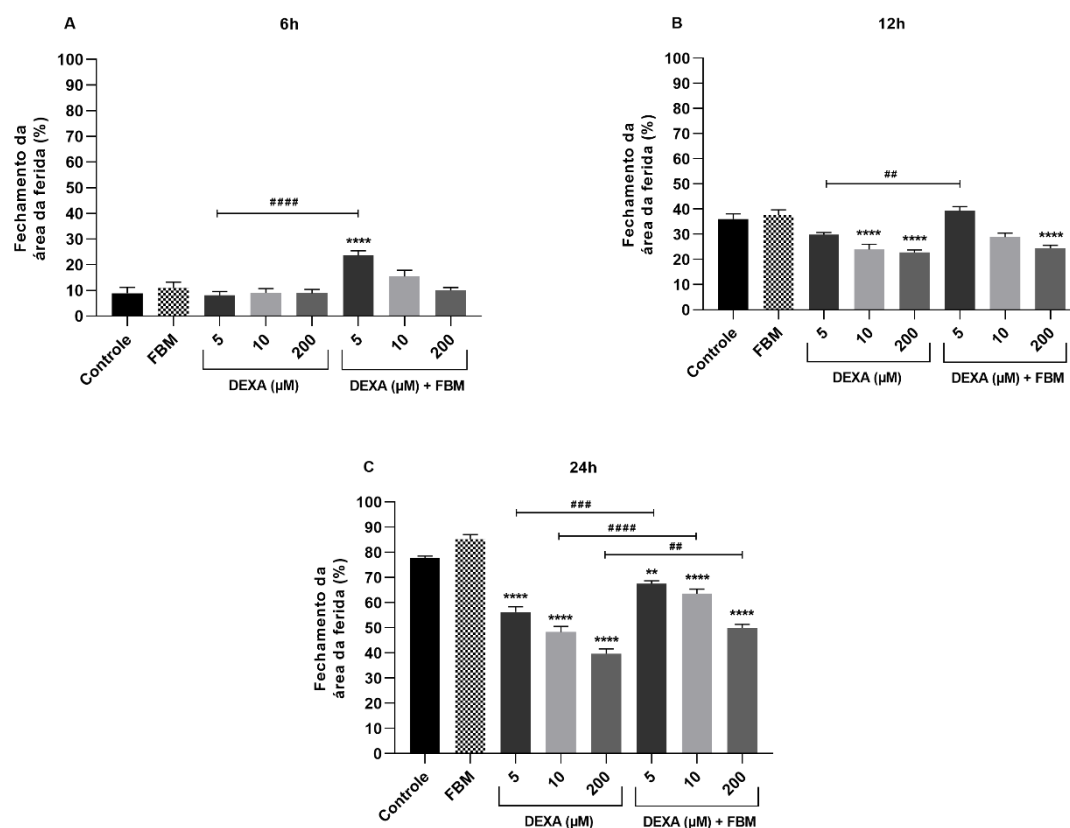


Figura 10. Fechamento da ferida (%) em células C2C12 de acordo com os grupos experimentais, nos períodos de 6h (A), 12h (B) e 24h (C) de exposição à DEXA em diferentes concentrações, isoladamente ou em combinação com a FBM. Os dados estão expressos como média $\pm$ erro padrão. A diferença significativa dos grupos em relação ao controle está representada por asteriscos (*) e a diferença significativa entre grupos tratados com a mesma concentração de dexametasona está indicada por hashtag (#). ANOVA seguida do teste de Tukey: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$; #### $p < 0,0001$.

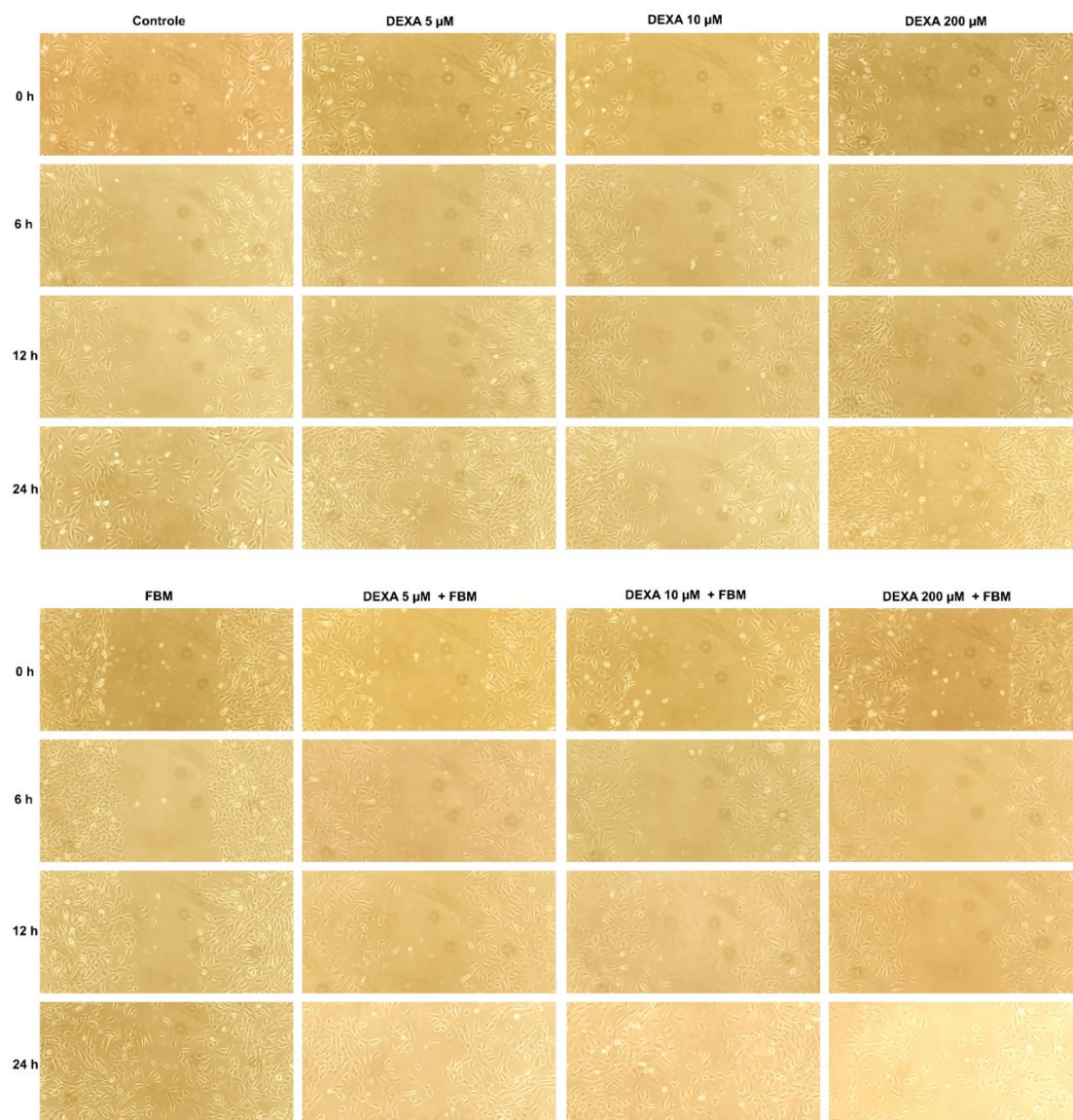


Figura 11. Ensaio de migração celular (ferida) das células musculares C2C12 expostas à DEXA e/ou à FBM por 0, 6, 12 e 24 h. As imagens demonstram a capacidade migratória das células após a indução da ferida nos diferentes grupos experimentais. (A1–A4) Controle; (B1–B4) DEXA 5 µM; (C1–C4) DEXA 10 µM; (D1–D4) DEXA 200 µM; (E1–E4) PBM; (F1–F4) DEXA 5 µM + PBM; (G1–G4) DEXA 10 µM + PBM; (H1–H4) DEXA 200 µM + PBM. A DEXA reduziu a migração celular de forma dependente da concentração, enquanto a PBM atenuou parcialmente esses efeitos, promovendo maior fechamento da ferida e indicando estímulo à migração dos mioblastos.

5.6 Expressão Proteica de IL-6

Os resultados dos níveis de produção de IL-6 estão demonstrados na Figura 12 e evidenciam que houve uma redução dependente do tempo e da concentração de dexametasona. Em 24 h (Figura 12A), todos os grupos tratados com DEXA mostraram níveis inferiores ao controle, sendo a redução significativa apenas na concentração de 200 μ M, tanto isoladamente quanto em combinação com FBM. Os grupos tratados com FBM isolada ou com DEXA 5 e 10 μ M, com ou sem FBM, não apresentaram alteração significativa.

Em 48h (Figura 12B), manteve-se o mesmo padrão observado no período anterior, com redução significativa apenas no grupo tratado com 200 μ M de DEXA, isoladamente ou associado à FBM, enquanto as demais concentrações não diferiram significativamente do controle.

Em 72h (Figura 12C), observou-se ampliação das diferenças, com redução significativa nos grupos tratados com DEXA nas concentrações de 10 e 200 μ M, bem como nos grupos correspondentes tratados com DEXA + FBM. Na análise entre grupos com a mesma concentração, os valores de IL-6 foram significativamente menores nos grupos tratados apenas com DEXA em comparação aos grupos DEXA + FBM.

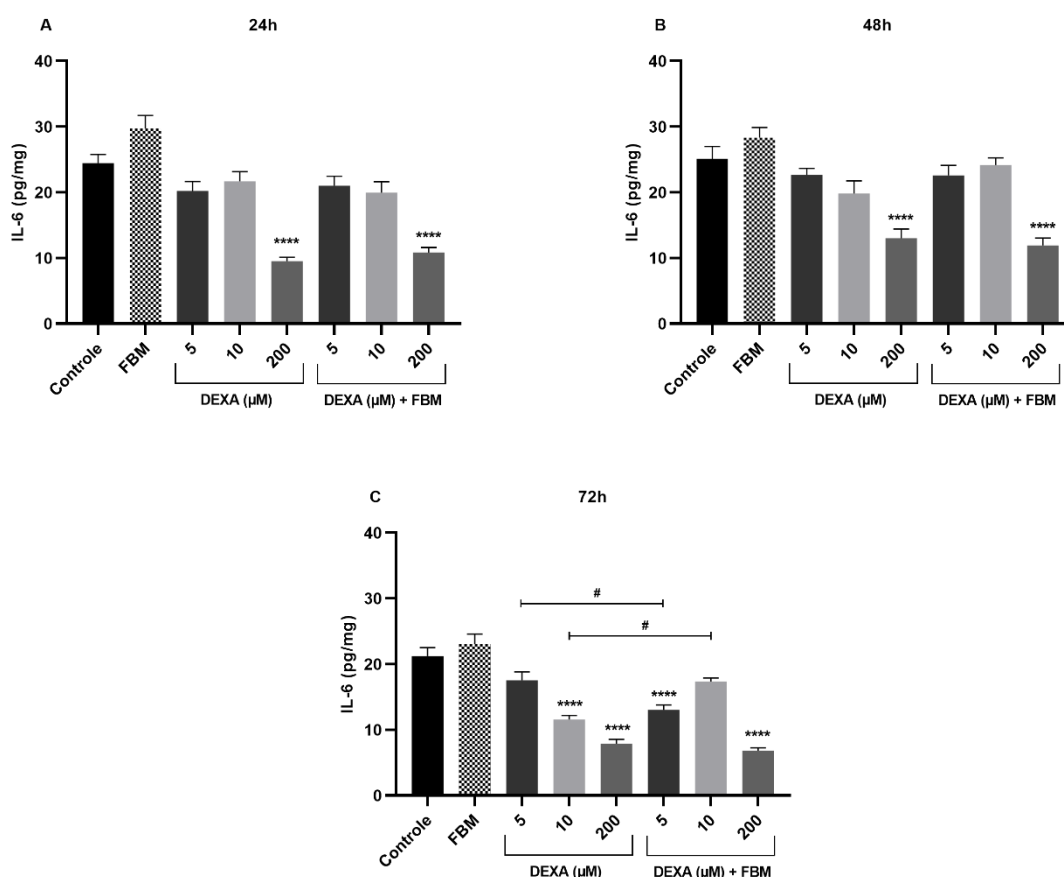


Figura 12. Níveis de IL-6 em células C2C12 nos diferentes grupos experimentais após 24 h (A), 48 h (B) e 72 h (C) de tratamento. Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle são indicadas por asteriscos (*), enquanto diferenças entre grupos tratados com a mesma concentração de dexametasona são indicadas por hashtag (#). A análise estatística foi realizada por ANOVA seguida do teste de Tukey: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$; #### $p < 0,0001$.

5.7 Expressão Proteica de TNF- α

Os resultados referentes aos níveis de TNF- α estão demonstrados na Figura 13. Em 24 h (Figura 13A), os grupos tratados com DEXA nas concentrações de 10 e 200 μ M exibiram redução significativa dos níveis de TNF- α , tanto isoladamente quanto em combinação com FBM. As concentrações de 5 μ M, com ou sem FBM, não apresentaram alteração significativa em relação ao controle.

Na comparação dentro da mesma concentração, o grupo DEXA 5 μ M apresentou nível de TNF- α significativamente menor em relação ao grupo DEXA 5 μ M + FBM. Em 48 h (Figura 13B), todos os grupos tratados com DEXA mostraram redução significativa dos níveis de TNF- α , independentemente da

concentração, o mesmo ocorrendo nos grupos DEXA + FBM. No comparativo entre tratamentos equivalentes, todos os grupos tratados somente com DEXA apresentaram níveis significativamente menores de TNF- α quando comparados aos respectivos grupos DEXA + FBM.

Em 72 h (Figura 13C), manteve-se a redução significativa nos grupos tratados com 10 e 200 μ M de DEXA, tanto isoladamente quanto associados à FBM. A concentração de 5 μ M não apresentou diferença significativa em relação ao controle. O tratamento com FBM isolada mostrou redução discreta, porém significativa. Na comparação entre a mesma concentração, o grupo DEXA 10 μ M apresentou níveis significativamente menores que o grupo DEXA 10 μ M + FBM.

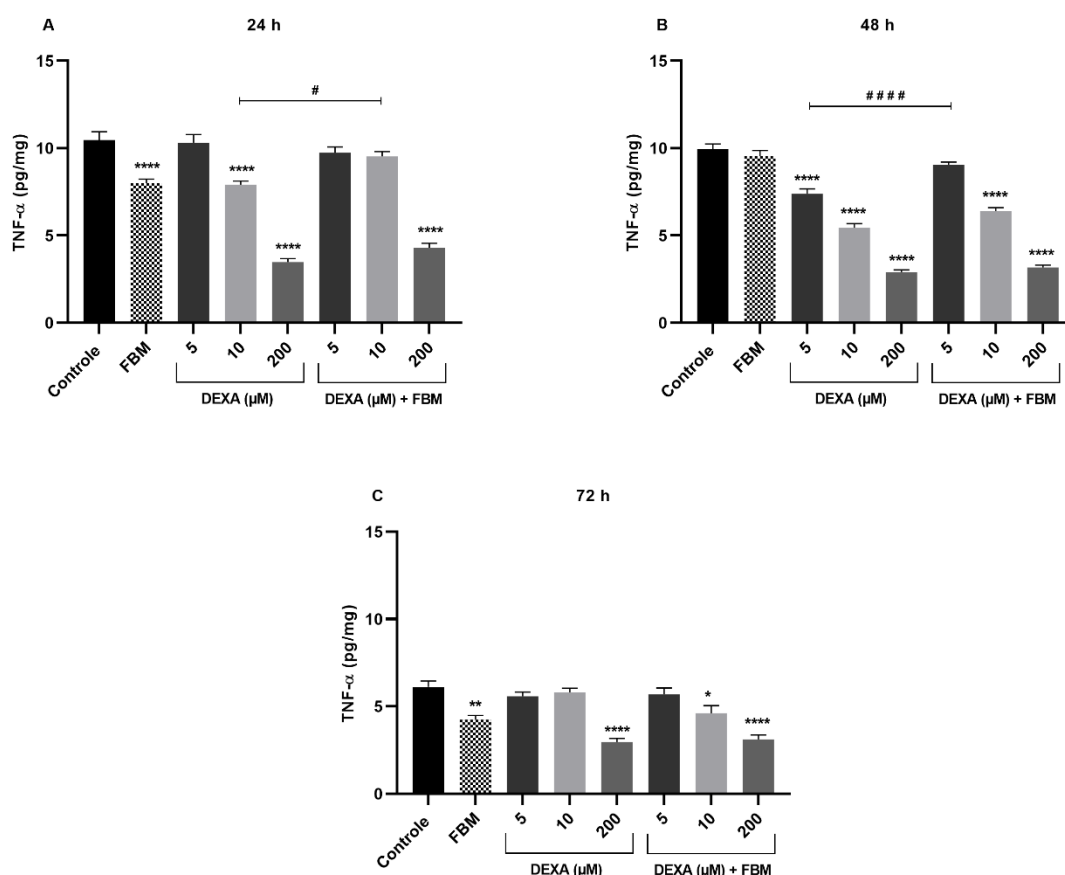


Figura 13. Níveis de TNF- α em células C2C12 nos diferentes grupos experimentais após 24 h (A), 48 h (B) e 72 h (C) de tratamento. A diferença significativa dos grupos em relação ao controle está representada por asteriscos (*) e a diferença significativa entre grupos tratados com a mesma concentração de dexametasona está indicada por hashtag (#). ANOVA seguida do teste de Tukey: *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001; #p < 0,05; ##p < 0,01; ###p < 0,001; ####p < 0,0001.

6 DISCUSSÃO

A atrofia muscular induzida por glicocorticoides continua sendo um grande desafio clínico devido ao seu impacto na integridade e função muscular. Os resultados presentes evidenciaram que a FBM atenua parcialmente a citotoxicidade induzida pela DEXA em mioblastos C2C12, melhorando a viabilidade, proliferação, diferenciação e migração celular, além de modular a síntese de citocinas inflamatórias. Esses achados corroboram a hipótese de que a FBM exerce efeitos protetores e regenerativos mesmo sob condições de estresse induzido por glicocorticoides.

Os resultados de viabilidade celular (avaliada pelo ensaio de MTT) mostram que a dexametasona afeta a viabilidade das células C2C12 de forma dependente do tempo e da concentração. Nas primeiras 24 horas, quase não houve queda expressiva, mas o cenário mudou a partir de 48 e 72 horas, quando as reduções passaram a ser mais evidentes, sobretudo nas doses mais altas. Esse comportamento é muito semelhante ao descrito por Wang *et al.* (2021) que utilizaram as concentrações de 25, 50, 100 e 200 μ M de DEXA, e Jiang *et al.* (2019) que utilizaram a concentração de 200 μ M de DEXA, e que também observaram diminuição progressiva da viabilidade conforme o aumento da concentração e o prolongamento da exposição ao fármaco. Nestes estudos os autores avaliaram os efeitos de compostos como o S-Rg3 e as proteínas totais de Panax ginseng e verificaram efeito protetor como o observado com FBM no presente estudo. A irradiação quando combinada à DEXA induziu um aumento importante na viabilidade celular, contudo não foi capaz de restaurar totalmente os níveis do controle, especialmente em 200 μ M, onde o dano celular é mais intenso. Esse efeito parcial sugere que a FBM atua amenizando o estresse inicial provocado pelo glicocorticoide.

Um padrão semelhante já havia sido descrito por Dos Santos *et al.* (2020), que mostraram aumento de viabilidade após FBM em mioblastos C2C12 utilizando diferentes parâmetros, sugerindo um estímulo direto sobre a função mitocondrial. A convergência desses achados reforça a ideia de que, embora não consiga reverter totalmente os efeitos da dexametasona, a fotobiomodulação ajuda a sustentar o metabolismo celular e reduz a intensidade

da queda de viabilidade, sobretudo nas concentrações intermediárias do fármaco.

A análise de proliferação das C2C12 por método indireto (cristal violeta) demonstrou que, em 24 horas, a DEXA isolada não alterou significativamente a proliferação em nenhuma das concentrações testadas; porém, a associação com a FBM aumentou a proliferação de forma significativa em relação aos grupos tratados apenas com DEXA. Em 48 horas, o padrão se manteve para a DEXA isolada, que novamente não diferiu do controle, enquanto os grupos DEXA + FBM apresentaram maior proliferação. Dentro da comparação por concentração, observou-se que o grupo DEXA 5 μ M + FBM exibiu valores significativamente superiores ao grupo tratado apenas com DEXA 5 μ M. Após 72 horas, não houve mudança significativa nos grupos com DEXA isolada, mas todos os grupos combinados com FBM mostraram aumento expressivo de proliferação em relação ao controle. Além disso, nas comparações entre condições equivalentes, os grupos DEXA 5 μ M + FBM e DEXA 10 μ M + FBM apresentaram proliferação significativamente maior do que seus respectivos grupos sem irradiação. Em conjunto, os dados reforçam que a FBM exerce um efeito estimulador sobre a proliferação celular, especialmente quando associada à DEXA.

Um padrão semelhante foi observado por Santos *et al.* (2020), que também relataram aumento da proliferação de C2C12 após a aplicação de FBM, especialmente em 48 h, mesmo na presença de um microambiente adverso induzido por mediadores pró-inflamatórios de macrófagos M1. Esses achados sugerem que, tanto sob estresse farmacológico desencadeado pela DEXA quanto em condições inflamatórias moduladas por M1, a FBM mantém sua capacidade de promover a proliferação de mioblastos, destacando seu efeito pró-regenerativo independente do tipo de estresse celular.

Na avaliação do índice de fusão celular, foi observado que a DEXA reduziu a fusão em todos os tempos avaliados, enquanto a FBM isolada favoreceu de forma clara a formação de miotubos. Quando combinada à DEXA, a irradiação não foi capaz de recuperar totalmente os níveis do controle, mas atenuou parte do prejuízo, resultando em células mais alongadas e mais bem organizadas ao longo da diferenciação. Essa tendência se aproxima dos achados de Santos *et al.* (2020), nos quais a FBM também sustentou etapas

iniciais da diferenciação mesmo em um ambiente pró-inflamatório. De forma semelhante, Lovisetto *et al.* (2022) mostrou, pelas colorações May–Grunwald e Giemsa, que a FBM aumentou o número de mionúcleos nas primeiras 24 horas, indicando estímulo às fases que antecedem a fusão. Já Jeong *et al.* (2024) observaram que intervenções capazes de modular vias de estresse, como o tratamento com acetil-genistina, atenuam o prejuízo miogênico causado pela dexametasona e preservam o índice de fusão. Em conjunto, esses estudos indicam que, embora a DEXA dificulte a diferenciação, estratégias moduladoras como a FBM podem atenuar seus efeitos e manter a progressão da miogênese.

Os resultados referentes a migração celular demonstraram que a DEXA compromete de forma progressiva o fechamento da ferida, mais evidentes após 12 e 24 horas, enquanto a associação com a FBM amenizou esse efeito com aumento do percentual de fechamento em comparação aos respectivos grupos DEXA sem irradiação. Contudo a irradiação não conseguiu reverter totalmente o efeito inibitório do glicocorticoide sobre a motilidade das C2C12 uma vez que os valores ainda foram inferiores a condição controle.

O efeito positivo da FBM sobre a migração das células musculares C2C12 também foi evidenciado por Lovisetto *et al.* (2022) onde a aplicação por LED ou laser isoladamente, acelerou a migração já nas primeiras horas e manteve taxas mais altas de fechamento da ferida ao longo do ensaio. De forma semelhante, Silva *et al.* (2024) também observaram que a FBM favoreceu o fechamento da ferida em mioblastos expostos ao veneno de *Bothrops jararacussu*, reforçando sua capacidade de estimular a migração em condições de dano. A comparação entre os estudos sugere que, embora a FBM possa favorecer a motilidade celular em cenários de agressão ou inflamação, seu efeito pode ser substancialmente limitado em um microambiente farmacológico adverso, como o induzido pela dexametasona, que parece restringir a capacidade de deslocamento das C2C12.

Na quantificação das citocinas IL-6 e TNF- α , que atuam principalmente nas fases iniciais da resposta à lesão promovendo ativação e proliferação de células satélites e remoção de fibras danificadas (Yang; Hu, 2018), foi possível observar que expressão de ambas diminuiu de forma dependente do tempo e da dose, especialmente nas concentrações mais altas, refletindo o efeito supressor do glicocorticoide sobre vias inflamatórias essenciais ao início da diferenciação

miogênica. A FBM, embora não restabeleça completamente os níveis controle, atenuou parte dessas reduções, principalmente em 10 e 200 μ M, preservando uma produção mínima de citocinas que parece ser favorável para evitar um bloqueio excessivo das etapas iniciais da regeneração. Essa modulação também encontra paralelo nos achados de Silva *et al.* (2024), que demonstraram que a FBM reduziu a produção exacerbada de IL-6 e TNF- α em mioblastos C2C12 expostos ao veneno de *Bothrops jararacussu*, contribuindo para restabelecer um ambiente mais compatível com o reparo celular. Embora os modelos de dano sejam distintos, ambos os estudos indicam que a FBM atua ajustando a resposta inflamatória, atenuando excessos ou suavizando supressões, sugerindo um papel regulador importante para a manutenção da capacidade miogênica sob diferentes condições de estresse.

7 CONCLUSÃO

Os achados deste estudo demonstram que a fotobiomodulação exerce um papel modulador relevante frente aos efeitos catabólicos da dexametasona em mioblastos C2C12. Embora não seja capaz de reverter completamente o prejuízo induzido pelo glicocorticoide, a FBM atenua de forma consistente a queda de viabilidade, sustenta a proliferação, preserva etapas iniciais da diferenciação e modula a síntese de citocinas essenciais ao processo miogênico. Além disso, mesmo não restaurando plenamente a migração em um microambiente fortemente suprimido pela DEXA, a FBM manteve efeitos benéficos já reconhecidos em outros modelos de dano, reforçando seu potencial como estratégia auxiliar em situações de comprometimento muscular. Assim, os resultados indicam que a fotobiomodulação contribui para mitigar aspectos centrais da atrofia induzida por glicocorticoides, oferecendo uma perspectiva promissora para abordagens terapêuticas voltadas à preservação da função e da capacidade regenerativa do músculo esquelético.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREO, Lucas *et al.* Effects of myogenic precursor cells (C2C12) transplantation and low-level laser therapy on muscle repair. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 50, n. 7, p. 781–791, set. 2018.
- BELANTO, Joseph J. *et al.* Dexamethasone induces dysferlin in myoblasts and enhances their myogenic differentiation. **Neuromuscular Disorders**, v. 20, n. 2, p. 111–121, fev. 2010.
- BENTZINGER, C. F.; WANG, Y. X.; RUDNICKI, M. A. Building Muscle: Molecular Regulation of Myogenesis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, n. 2, p. a008342–a008342, 1 fev. 2012.
- BONALDO, Paolo; SANDRI, Marco. Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. **Disease Models & Mechanisms**, v. 6, n. 1, p. 25–39, 1 jan. 2013.
- CARREÑO, Edith Alejandra *et al.* Considerations and Technical Pitfalls in the Employment of the MTT Assay to Evaluate Photosensitizers for Photodynamic Therapy. **Applied Sciences**, v. 11, n. 6, p. 2603, 15 mar. 2021.
- CHANG, Jae Seung; KONG, In Deok. Irisin prevents dexamethasone-induced atrophy in C2C12 myotubes. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 472, n. 4, p. 495–502, abr. 2020.
- DE BOSSCHER, Karolien; BECK, Ilse M.; HAEGEMAN, Guy. Classic glucocorticoids versus non-steroidal glucocorticoid receptor modulators: Survival of the fittest regulator of the immune system? **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 24, n. 7, p. 1035–1042, out. 2010.
- DE BOSSCHER, Karolien; HAEGEMAN, Guy; ELEWAUT, Dirk. Targeting inflammation using selective glucocorticoid receptor modulators. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 10, n. 4, p. 497–504, ago. 2010.
- DE FREITAS, Lucas Freitas; HAMBLIN, Michael R. Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy. **IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics**, v. 22, n. 3, p. 348–364, maio 2016.
- DOS SANTOS, Tainá Caroline *et al.* Effect of Photobiomodulation on C2C12 Myoblasts Cultivated in M1 Macrophage-conditioned Media. **Photochemistry and Photobiology**, v. 96, n. 4, p. 906–916, jul. 2020.
- FERRARESI, Cleber *et al.* Low-level Laser (Light) Therapy Increases Mitochondrial Membrane Potential and ATP Synthesis in C2C12 Myotubes with a Peak Response at 3–6 h. **Photochemistry and Photobiology**, v. 91, n. 2, p. 411–416, mar. 2015.
- GRADA, Ayman *et al.* Research Techniques Made Simple: Analysis of Collective Cell Migration Using the Wound Healing Assay. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 137, n. 2, p. e11–e16, fev. 2017.
- HAH, Young-Sool *et al.* β -Sitosterol Attenuates Dexamethasone-Induced Muscle Atrophy via Regulating FoxO1-Dependent Signaling in C2C12 Cell and Mice Model. **Nutrients**, v. 14, n. 14, p. 2894, 14 jul. 2022.

- HAN, Der-Sheng; YANG, Wei-Shiung; KAO, Tung-Wei. Dexamethasone Treatment at the Myoblast Stage Enhanced C2C12 Myocyte Differentiation. **International Journal of Medical Sciences**, v. 14, n. 5, p. 434–443, 8 abr. 2017.
- HERNÁNDEZ-BULE, Maria Luisa *et al.* Unlocking the Power of Light on the Skin: A Comprehensive Review on Photobiomodulation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 8, p. 4483, 19 abr. 2024.
- JEONG, Won Min *et al.* Acetyl genistin modulates myotube differentiation and attenuates dexamethasone-induced muscle atrophy through the FoxO1/3 signaling pathway in C2C12 myotubes. **Applied Biological Chemistry**, v. 67, n. 1, p. 31, 19 mar. 2024.
- JIANG, Rui *et al.* *Panax ginseng* Total Protein Facilitates Recovery from Dexamethasone-Induced Muscle Atrophy through the Activation of Glucose Consumption in C2C12 Myotubes. **BioMed Research International**, v. 2019, p. 1–11, 6 ago. 2019.
- LEE, Hyunjung *et al.* Chrysanthemum zawadskii Herbich attenuates dexamethasone-induced muscle atrophy through the regulation of proteostasis and mitochondrial function. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 136, p. 111226, abr. 2021.
- LI, Liwei *et al.* Advances in research on cell models for skeletal muscle atrophy. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 167, p. 115517, nov. 2023.
- LIANG, Chun-Chi; PARK, Ann Y.; GUAN, Jun-Lin. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, p. 329–333, fev. 2007.
- LOVISETTO, Renan *et al.* Photobiomodulation Using Different Infrared Light Sources Promotes Muscle Precursor Cells Migration and Proliferation. **Photonics**, v. 9, n. 7, p. 469, 5 jul. 2022.
- MERZ, Karla E.; THURMOND, Debbie C. Role of Skeletal Muscle in Insulin Resistance and Glucose Uptake. *In*: TERJUNG, Ronald (Org.). **Comprehensive Physiology**. 1. ed. [S.l.]: Wiley, 2020. p. 785–809.
- NGUYEN, Linda M. D. *et al.* Effect of near-infrared light exposure on mitochondrial signaling in C2C12 muscle cells. **Mitochondrion**, v. 14, p. 42–48, jan. 2014.
- OAKLEY, Robert H.; CIDLOWSKI, John A. The biology of the glucocorticoid receptor: New signaling mechanisms in health and disease. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 132, n. 5, p. 1033–1044, nov. 2013.
- PALLAFACCHINA, G.; BLAAUW, B.; SCHIAFFINO, S. Role of satellite cells in muscle growth and maintenance of muscle mass. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 23, p. S12–S18, dez. 2013.
- PANSTERS, N. A. M. *et al.* Segregation of myoblast fusion and muscle-specific gene expression by distinct ligand-dependent inactivation of GSK-3 β . **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 68, n. 3, p. 523–535, fev. 2011.

- QUIRK, Brendan J.; WHELAN, Harry T. What Lies at the Heart of Photobiomodulation: Light, Cytochrome C Oxidase, and Nitric Oxide—Review of the Evidence. **Photobiomodulation, Photomedicine, and Laser Surgery**, v. 38, n. 9, p. 527–530, 1 set. 2020.
- R HAMBLIN, Michael *et al.* Mechanisms and applications of the anti-inflammatory effects of photobiomodulation. **AIMS Biophysics**, v. 4, n. 3, p. 337–361, 2017.
- RHEN, Turk; CIDLOWSKI, John A. Antiinflammatory Action of Glucocorticoids — New Mechanisms for Old Drugs. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 16, p. 1711–1723, 20 out. 2005.
- SANI, Asron *et al.* Inhibitory effects of curcuminoids on dexamethasone-induced muscle atrophy in differentiation of C2C12 cells. **Phytomedicine Plus**, v. 1, n. 1, p. 100012, fev. 2021.
- SCHAKMAN, O. *et al.* Mechanisms of Muscle Atrophy Induced by Glucocorticoids. **Hormone Research in Paediatrics**, v. 72, n. Suppl. 1, p. 36–41, 2009.
- SCHAKMAN, O. *et al.* Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 45, n. 10, p. 2163–2172, out. 2013.
- TEDESCO, Francesco Saverio *et al.* Repairing skeletal muscle: regenerative potential of skeletal muscle stem cells. **Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 1, p. 11–19, 4 jan. 2010.
- TIDBALL, James G. Inflammatory processes in muscle injury and repair. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 288, n. 2, p. R345–R353, fev. 2005.
- TIDBALL, James G. Mechanisms of Muscle Injury, Repair, and Regeneration. *In*: PRAKASH, Y. S. (Org.). **Comprehensive Physiology**. 1. ed. [S.l.]: Wiley, 2011. p. 2029–2062.
- TIDBALL, James G. Regulation of muscle growth and regeneration by the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 3, p. 165–178, mar. 2017.
- ULLA, Anayt *et al.* Morin attenuates dexamethasone-mediated oxidative stress and atrophy in mouse C2C12 skeletal myotubes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 704, p. 108873, jun. 2021.
- VELIÇA, Pedro; BUNCE, Chris M. A quick, simple and unbiased method to quantify C2C12 myogenic differentiation. **Muscle & Nerve**, v. 44, n. 3, p. 366–370, set. 2011.
- WANG, Manying *et al.* 20(s)-ginsenoside-Rg3 modulation of AMPK/FoxO3 signaling to attenuate mitochondrial dysfunction in a dexamethasone-injured C2C12 myotube-based model of skeletal atrophy *in vitro*. **Molecular Medicine Reports**, v. 23, n. 5, p. 306, 26 fev. 2021.
- YANG, Wenjun; HU, Ping. Skeletal muscle regeneration is modulated by inflammation. **Journal of Orthopaedic Translation**, v. 13, p. 25–32, abr. 2018.
- YOO, Ahyoung *et al.* Gromwell ameliorates glucocorticoid-induced muscle atrophy through the regulation of Akt/mTOR pathway. **Chinese Medicine**, v. 19, n. 1, p. 20, 29 jan. 2024.

YOSHIOKA, Yasukiyo *et al.* Diosgenin prevents dexamethasone-induced myotube atrophy in C2C12 cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 747, p. 109759, out. 2023.