

Artigo original**Efeito do laser na produção de óxido nítrico por células musculares submetidas a estresse nutricional*****Laser effect on nitric oxide production by muscle cells submitted to nutritional stress***

Erick Diomedese*, Manoela Domingues Martins**, Sandra Kalil Bussadori**, Carlos Alberto da Silva**, Daniela Aparecida Biasotto-Gonzalez**, João Carlos Ferrari Correa, D.Sc.**, Raquel Agnelli Mesquita Ferrari**, Kristianne Porta Santos Fernandes**

.....
*Graduação em Odontologia, Universidade Nove de Julho, Bolsista FAPESP 07/59552-1, **Docente do Mestrado em Ciências da Reabilitação da Universidade Nove de Julho – UNINOVE

Resumo

Introdução: O laser de baixa potência (LBP) tem sido muito utilizado em fisioterapia principalmente no reparo muscular esquelético e nos processos inflamatórios. O objetivo deste estudo foi analisar o efeito do LBP AsGaAl Twin-Laser sobre a produção de óxido nítrico por mioblastos C2C12 cultivados sob diferentes condições nutricionais (modelo de lesão muscular). *Métodos:* as células C2C12 foram cultivadas em condição regular (10% de soro fetal bovino, SFB) e deficiência nutricional (5% de SFB) e com LBP AsGaAl (660nm) com dose de 3,8J/cm² e em ambas as condições o óxido nítrico foi mensurado no meio de cultura. *Resultados:* Não houve diferença significativa na produção de óxido nítrico (NO) entre os mioblastos tratados com laser e as culturas controle nos parâmetros testados após 24h de cultivo. *Conclusão:* A laserterapia não aumentou a produção de NO pelos mioblastos C2C12 cultivados em situação padrão ou em deficiência nutricional (modelo de injúria muscular) nos parâmetros acima citados.

Palavras-chave: mioblastos, óxido nítrico, laser de baixa potência, intensidade, reparo muscular.

Abstract

Introduction: Low-level laser therapy (LLLT) has been widely used in physical therapy, mostly on skeletal muscle healing or inflammatory processes. The aim of this in vitro study was to evaluate the effect of LLLT on the nitric oxide (NO) production by cultured C2C12 myoblasts under different nutritional conditions (muscle injury model) using low energy GaAlAs. NO production was determined in both conditions. *Methods:* C2C12 cell line cultured in regular (10% fetal bovine serum, FBS) and nutrient-deficient (5% FBS) media were irradiated with low-energy GaAlAs (660 nm) laser with energy density of 3.8 J/cm². *Results:* There were no significant differences in NO production between laser-treated myoblasts and control cultures for tested parameters after 24 h of cell culture. *Conclusion:* Laser phototherapy did not increase NO production by C2C12 myoblast under regular or nutrient-deficient (muscle injury model) conditions using the above parameters.

Key-words: myoblast cells, nitric oxide, low-intensity laser, muscular repare.

Recebido 30 de janeiro de 2009; aceito em 8 de fevereiro de 2009.

Endereço para correspondência: Kristianne Porta Santos Fernandes, Mestrado em Ciências da Reabilitação, UNINOVE, Centro de Pós Graduação, Av. Francisco Matarazzo, 612, Água Branca, 05001-100 São Paulo SP; Tel: (11)3665-9325, E-mail: kristianneporta@gmail.com

Introdução

A miogênese ou a formação do músculo esquelético é um processo altamente complexo que envolve a expansão de células musculares mononucleadas progenitoras ao longo da via miogênica até se tornarem mioblastos que se fundem para formar miotubos e que, finalmente, desenvolvem-se para se tornarem miofibrilas do músculo esquelético maduro [1,2].

Após uma lesão, o músculo tem a habilidade de iniciar um processo de reparo altamente organizado de forma a prevenir a perda de massa muscular. Este processo é semelhante à miogênese, porém, as células que participam inicialmente são as células satélites, ao invés das progenitoras miogênicas [3,4].

O laser de baixa potência é um recurso muito utilizado com o intuito de acelerar o processo de reparo do tecido muscular esquelético. Porém, ainda são escassas, e por vezes contraditórias, as evidências científicas e clínicas que determinem os parâmetros dosimétricos e metodológicos necessários à aquisição de seus objetivos [5-8].

Lasers de baixa potência são aqueles que possuem baixa energia e ausência de potencial foto-térmico. Os mais usados estão na porção óptica do espectro vermelho e do infravermelho (400 a 780 nm e 780 a 1mm) [9,10].

O efeito de bioestimulação depende da combinação de parâmetros como comprimento de onda, potência, intensidade e também do tipo celular a ser avaliado [9-14].

Estudos que envolvem a utilização do laser em cultura de células vêm sendo realizados com frequência cada vez maior na tentativa de estabelecimento dos parâmetros dosimétricos para gerar a bioestimulação necessária em processos de reparo [15].

Os mioblastos C2C12 são células musculares precursoras que derivam de músculo esquelético de camundongos, exibem a maioria das características dos mioblastos normais e diferenciam-se em cultura, propiciando um bom modelo para estudar a regeneração muscular. Além disso, o uso de linhagens celulares em modelos para análise de proliferação celular elimina a possibilidade da influência da irradiação laser sobre a produção de fatores de crescimento por células não miogênicas contidas em culturas primárias, como fibroblastos e macrófagos [1,13,16].

Dentre os eventos de sinalização envolvidos na miogênese, a fusão de mioblastos requer a produção de óxido nítrico (NO), porém, o envolvimento desta substância na diferenciação destas células e sua influência na resposta imune específica e não-específica ainda permanecem pouco elucidados [17].

Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi verificar os efeitos da irradiação laser de As-Ga-Al 660nm e dose de 3,8J/cm² sobre a produção de óxido nítrico em células musculares C2C12.

Material e métodos

Cultivo celular

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

Os mioblastos foram mantidos em estufa (HEPA class 3110, *Thermo Electron Corporation, Marietta, OH, EUA*) 100 a 37°C, numa atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. A monitorização do crescimento celular foi feita a cada 24 horas, utilizando-se microscópio invertido de fase (Eclipse TE 2000U, Nikon, Melville, NY, EUA).

O subcultivo foi realizado quando a monocamada celular se tornava subconfluenta para a perpetuação da linhagem celular, sempre em fluxo laminar (Linha 400, Pachane, Piracicaba, SP) e viabilidade das células foi avaliada por contagem com corante vital azul de Trypan (0,4%), sendo utilizadas nos ensaios as culturas com viabilidade maior que 95%.

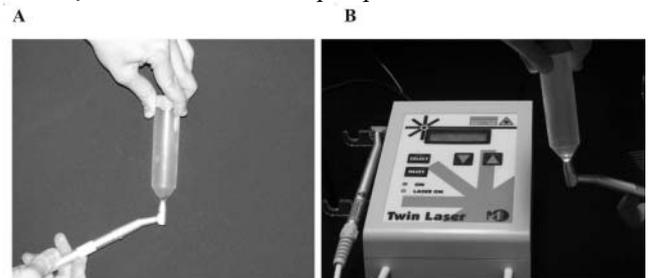
Para simular a situação de lesão muscular, 24 horas antes dos experimentos, as culturas foram cultivadas em meio com somente 5% de SFB.

Irradiação laser

Para a aplicação de laser utilizamos um aparelho Twin-laser de Arseneto de Gálio Alumínio (As-Ga-AL) (MM Optics, São Carlos, SP) fixando o comprimento de onda em 660nm, dose de 3,8J/cm², potência de 15 mW e tempo de 10 segundos.

As irradiações foram feitas em tubos de centrifugação contendo os precipitados celulares, sendo de baixo para cima na extremidade inferior dos tubos, de modo que o feixe de laser atingisse diretamente o precipitado celular sem passar pelo meio de cultura (conforme descrito anteriormente por Fujihara *et al.* [14]). Os experimentos foram realizados em um ambiente com obscuridade parcial para não sofrerem interferência da luz externa. As células do grupo controle sofreram a mesma manipulação, mas não foram irradiadas (Figura 1).

Figura 1 - Procedimento de irradiação laser em células musculares. (A) Posicionamento da caneta para irradiação (B) Realização da irradiação laser diretamente no precipitado celular.



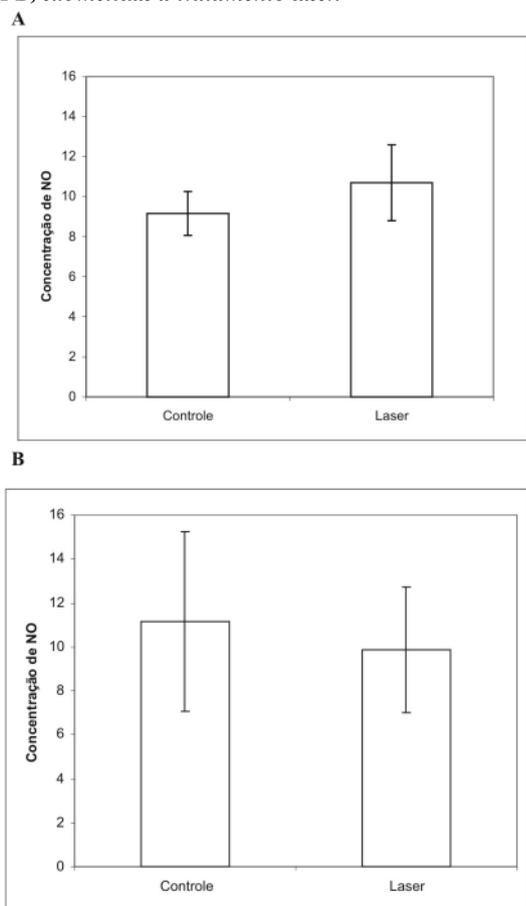
Dosagem de Óxido Nítrico (NO)

A liberação de NO foi medida pelo acúmulo de nitrato e nitrito no meio de cultura. Para tanto, o sobrenadante foi coletado e centrifugado durante 10 min, 400 x g a 4°C. Após a redução de nitrato e nitrito com uma solução saturada de cloreto de vanádio (VCl_3) em HCl 1M, a 90°C, a concentração de óxido nítrico no sobrenadante foi determinada por quimioluminescência em fase gasosa, por meio da reação de NO com ozônio, usando o analisador de NO (NOATM280; Sievers Inc.). A concentração de nitrato foi determinada pela curva padrão de $NaNO_3$ utilizando o *Bag program software* 2.2 (Sievers Instruments Inc.).

Resultados

A análise dos resultados da produção de NO pelas células musculares permitiu verificar que não houve diferença entre as células submetidas a tratamento laser em comparação as não tratadas, tanto em situação de suprimento nutricional padrão (10% SFB) quanto na situação de estresse nutricional (5% SFB) (Figura 2).

Figura 2 - Produção de NO (μM) pelas células musculares C2C12 cultivadas (A) com 10% SFB (B) em situação de estresse nutricional, 5% SFB, submetidas a tratamento laser.



Discussão

Nas situações de injúria muscular, o processo de formação do novo tecido requer que células mononucleadas quiescentes precursoras se tornem ativas, proliferem, se diferenciem em mioblastos e se fundam para formar os miotubos. Subseqüentemente, os miotubos irão sofrer diferenciação e maturação para formar fibras musculares funcionais e reparar as miofibrilas danificadas [1,2].

Como levantado anteriormente, para as etapas da miogênese, o aumento da produção de NO está relacionada a fusão de mioblastos. Adicionalmente, evidências recentes demonstraram que o NO participa da fisiologia muscular modulando os processos de vasodilatação, metabolismo e contração. Entretanto, a produção excessiva de NO no músculo esquelético pode induzir lesão oxidativa e morte celular por apoptose, resultando em distrofia muscular, caquexia e envelhecimento [16,17]. O músculo esquelético contém três formas de NOS sendo duas delas (NOS1 e NOS3) expressas de forma constitutiva enquanto que a NOS2 é expressa no músculo esquelético em resposta a lesão e reparo [20].

Além disso, o NO desempenha um importante papel em vários outros fenômenos biológicos como agregação plaquetária, tônus vascular, transmissão sináptica, citotoxicidade [21], reparo tecidual, remodelação tecidual e angiogênese [22], além de atuar na resposta imunológica, na plasticidade neuronal, na sinalização intracelular e na indução de apoptose [23,24].

Nossos resultados demonstraram que na presença de injúria muscular, mimetizada pela condição de deficiência nutricional [25], não houve alteração na produção de óxido nítrico sugerindo que este tipo de modelo de lesão utilizado não foi capaz de causar um aumento da produção de NO com relação as células cultivadas em situação regular. Além disso, a irradiação laser, utilizada em ambas as condições nutricionais de cultivo, também não foi capaz de alterar a produção de NO de maneira significativa.

Vale ressaltar o fato de que parâmetros similares podem causar efeitos diferentes, dependendo da função celular a ser avaliada. Assim, parâmetros que aumentam o crescimento celular podem, por exemplo, diminuir a síntese protéica. Por esta razão é crucial conhecer a correta combinação de parâmetros (comprimento de onda, potência e intensidade) a fim de alcançar efetivamente os efeitos desejados no uso clínico [10-12,26,27]. Dessa forma, nossos resultados representam apenas a resposta destas células musculares aos parâmetros dosimétricos escolhidos no presente trabalho, porém não nos permitem concluir que o laser não influencia a produção de NO e que esta ferramenta terapêutica não traga benefícios ao processo de reparo.

Estudos subseqüentes, utilizando a gama de parâmetros disponíveis, são necessários para o estabelecimento de novos conhecimentos e protocolos úteis para a intervenção e reabilitação de lesões musculares.

Conclusão

A laserterapia não aumentou a produção de NO pelos mioblastos C2C12 cultivados em situação padrão ou em deficiência nutricional (modelo de injúria muscular) nos parâmetros utilizados no presente estudo.

Referências

- Kumar A, Mohan S, Newton J, Rehage M, Tran K, Baylink DJ. Pregnancy-associated plasma protein-A regulates myoblast proliferation and differentiation through an insulin-like growth factor-dependent mechanism. *J Biol Chem* 2005;280(45):37782-9.
- Dogra C, Hall SL, Wedhas N, Linkhart TA, Kumar A. Fibroblast growth factor inducible-14 (Fn14) is required for the expression of myogenic regulatory factors and differentiation of myoblasts into myotubes: Evidence for TWEAK-independent functions of Fn14 during myogenesis. *J Biol Chem* 2007;282(20):15000-10.
- Shi X, Garry DJ. Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. *Genes Deve* 2006;20:1692-708.
- Chargè SBP, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev* 2004;84:209-238.
- Ferrari RJ, Picchi LD, Botelho AP, Minamoto V. Processo de regeneração na lesão muscular: uma revisão. *Fisioter Mov* 2005;18(2):63-71.
- Bibikova A, Oron U. Regeneration in denervated toad (*bufo viridis*) gastrocnemius muscle and the promotion of the process by low energy laser irradiation. *Anat Rec* 1995;241(1):123-28
- Oliveira NML, Parizzoto NA, Salvini TF. GaAs (904-Nm) laser radiation does not affect muscle regeneration in mouse skeletal muscle. *Lasers Surg Med* 1999;25:13-21.
- Lopes-Martins RAB, Marcos RL, Leonardo PS, Prianti Jr AC, Muscará MN, Aimbire F, Frigo L, Iversen VV, Bjordal JM. Effect of low-level laser (Ga-Al-As 655 nm) on skeletal muscle fatigue induced by electrical stimulation in rats. *J Appl Physiol* 2006;101:283-88.
- Fujihara NA. Estudo da adesão, proliferação e síntese de proteínas por osteoblastos cultivados e submetidos à ação do laser de baixa potência [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da Universidade São Paulo; 2002.
- Moore P, Ridgway TD, Higbee RG, Howard EW, Lucroy MD. Effect of wavelength on low-intensity laser irradiation-stimulated cell proliferation in vitro. *Lasers Surg Med* 2005;36:8-12.
- Marques MM, Pereira NA, Fujihara NA, Nogueira FN, Eduardo CP. Effect of low-power laser irradiation on protein synthesis and ultrastructure of human gingival fibroblasts. *Lasers Surg Med* 2004;34:260-5.
- Azevedo LH, Eduardo FP, Moreira MS, Eduardo CP, Marques MM. Influence of different power densities of LILT on cultured human fibroblast growth. *Lasers Med Sci* 2006;21:86-89.
- Amaral AC. Influência da terapia laser de baixa intensidade em células precursoras miogênicas (in vitro) e durante a regeneração muscular (in vivo) [tese]. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos; 2004.
- Fujihara NA, Hiraki KRN, Marques MM. Irradiation at 780 nm increases proliferation rate of osteoblasts independently of dexamethasone presence. *Lasers Surg Med* 2006;38(4):332-6.
- Freshney RI. Culture of animal cells: a manual of basic technique. 5th ed. New York: J Wiley; 2005.
- Lee MH, Jang MH, Kim EK, Han SW, Cho SY, Kim CJ. Nitric oxide induces apoptosis in mouse C2C12 myoblast cells. *J Pharmacol Sci* 2005;97:369-76.
- Tripathi P, Tripathi P, Kashyap L, Singh V. The role of nitric oxide in inflammatory reactions. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007;51(3):443-52.
- Seale P, Rudnicki MA. A new look at the origin, function, and "stem-cell" status of muscle satellite cells. *Dev Biol* 2000;218:115 -24.
- Conejo R, Lorenzo M. Insulin signaling leading to proliferation, survival, and membrane ruffling in C2C12 myoblasts. *J Cell Physiol* 2001;187(1):96-108.
- Frost RA, Nystrom GJ, Lang CH. Lipopolysaccharide stimulates nitric oxide synthase-2 expression in murine skeletal muscle and C2C12 myoblast via Toll-like receptor-4 and c-Jun NH2-terminal kinase pathways. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;287:C1605-15.
- Yoshioka Y, Yamamuro A, Maeda S. Nitric oxide at a low concentration protects murine macrophage RAW264 cells against nitric oxide-induced death via cGMP signaling pathway. *Br J Pharmacol* 2003;139(1):28-34.
- Guerra AN, Gavala ML, Chung HS, Bertics PJ. Nucleotide receptor signalling and the generation of reactive oxygen species. *Purinergic Signal* 2007;3(1-2):39-51.
- Fernandes KPS, Mayer MPA, Ando ES, Ulbrich AG, Amarente-Mendes JGP, Russo M. Inhibition of interferon- α -induced nitric oxide production in endotoxin-activated macrophages by cytolethal distending toxin. *Oral Microbiol Immunol* 2008;23:360-66.
- Leite HP, SARNI RS. Radicais livres, anti-oxidantes e nutrição. *Rev Bras Nutr Clín* 2003;18(2):87-94.
- Shefer G, Barash I, Oron U, Halevy O. Low-energy laser irradiation enhances de novo protein synthesis via its effects on translation-regulatory proteins in skeletal muscle myoblasts. *Biochim Biophys Acta* 2003;1593:131-39.
- Pereira AN, Eduardo CP, Matson E, Marques MM. Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. *Lasers Surg Med* 2002;31:263-67.
- Kreisler M, Christoffers AB, Willerstaen B, d'Hoedt B. Effect of low-level GaAIAS laser irradiation on the proliferation rate of human periodontal ligament fibroblasts: an in vitro study. *J Clin Periodontol* 2003;30:353-58.