

Ultrassom terapêutico na atividade mitocondrial e diferenciação de células musculares C2C12

Therapeutic ultrasound in the mitochondrial activity and differentiation of muscle cells C2C12

Beatriz Guimarães Ribeiro¹; Elis Cabral Victor²; Vinicius Oliveira Cardoso³; Paola Pelegrineli Artilheiro⁴; Sandra Kalil Bussadori⁵; Kristianne Porta Santos Fernandes⁵; Raquel Agnelli Mesquita-Ferrari⁵

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

²Mestre em Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde – Universidade Nove de Julho – Uninove. São Paulo, SP – Brasil.

³Mestrando em Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde – Universidade Nove de Julho – Uninove. São Paulo, SP – Brasil.

⁴Mestre em Ciências da Reabilitação – Universidade Nove de Julho – Uninove. São Paulo, SP – Brasil.

⁵Docentes do Mestrado e Doutorado em Ciências da Reabilitação e em Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde – Universidade Nove de Julho – Uninove. São Paulo, SP – Brasil.

Endereço para correspondência
Raquel Agnelli Mesquita-Ferrari
R. Vergueiro, 235/249, Liberdade
01504-001 – São Paulo – SP [Brasil]
raquel.mesquita@gmail.com

Resumo

Introdução: O ultrassom terapêutico (US) é muito utilizado na prática clínica, mas há poucos estudos sobre seu efeito na regeneração muscular. **Objetivo:** Avaliar os efeitos do US sobre a atividade mitocondrial e diferenciação de células musculares C2C12, quando aplicado concomitantemente à indução do processo de diferenciação. **Métodos:** As células musculares foram submetidas ao processo de diferenciação pela adição de meio de cultura DMEM, suplementado com 2% de soro de cavalo, e receberam simultaneamente tratamento com US (pulsado a 20%, 3 MHz, 0,2 e 0,5 W/cm², 5 minutos). A atividade mitocondrial foi avaliada após 24h, 48h e 96h pelo método MTT, e a diferenciação celular após um e três dias pela atividade de creatina quinase (CK). **Resultados:** Não houve alteração da atividade mitocondrial e de CK nos grupos que receberam tratamento com US nos diferentes períodos avaliados. **Conclusão:** O US, nos parâmetros avaliados, não foi capaz de alterar a atividade mitocondrial e a diferenciação de células musculares C2C12.

Descritores: Células musculares; Creatina quinase; Diferenciação celular; Terapia por ultrassom.

Abstract

Introduction: The therapeutic ultrasound (US) has been widely used in clinical practice, but there are few studies on its effect on muscle regeneration. **Objective:** To evaluate the effects of the US on mitochondrial activity and differentiation of muscle cells C2C12 when applied concomitantly the induction of the differentiation process. **Methods:** Muscle cells were subjected to differentiation process by addition of DMEM culture medium supplemented with 2% horse serum and received concomitant treatment with US (pulsed at 20%, 3 MHz, 0.2 and 0.5 W/cm², 5 minutes). The mitochondrial activity was assessed after 24, 48 and 96 hours by MTT assay and cell differentiation after one and three days for the activity of creatine kinase (CK). **Results:** There was no change in mitochondrial activity and CK in the groups receiving US treatment in different periods. **Conclusion:** In the evaluated parameters, the US was not able to change mitochondrial activity and differentiation of muscle cells C2C12.

Key words: Cell differentiation; Creatine kinase; Muscle cells; Ultrasonic therapy.

Introdução

Após a lesão muscular, há ativação de células satélites (CS) que proliferam e migram para o local lesionado, sendo denominadas mioblastos¹. Em seguida, elas se diferenciam e se fundem para formar miotubos, que se unem para formar fibras musculares funcionais e reparar as fibras musculares danificadas².

Há evidências de que o reparo tecidual pode ser estimulado por recursos terapêuticos, como o ultrassom (US), sendo este recurso amplamente utilizado na prática clínica^{3,4}. O US pode afetar as células e os tecidos por meio de mecanismos térmicos e não térmicos, estando os não térmicos envolvidos na produção dos efeitos terapêuticos primários do ultrassom, isto é, a estimulação da regeneração tecidual⁵.

Estudos *in vivo* demonstraram que o US apresentou resultados positivos sobre o processo de reparo muscular. Montalti et al.⁶ avaliaram o efeito do US (frequência 1,5 MHz; intensidade 30 mW/cm²; por 20 minutos), após criolesão em músculo TA de ratos, e observaram que o grupo tratado obteve melhor organização do tecido muscular e das fibras de colágeno, após 13 dias de tratamento, além de aumento na imunomarcação de ciclo-oxigenase 2 (COX-2). Renn  et al.⁷ compararam o efeito da terapia *laser* de baixa intensidade (TLBP) e terapia por US, posterior   crioles o, e demonstraram que ambas as terapias reduziram o dano muscular e a imunomarcação de COX-2. Contudo, os trabalhos *in vitro* que permitem a avaliação do US diretamente sobre as células musculares ainda são escassos.

Nesse contexto, a utilização da linhagem de células satélites C2C12 torna-se importante, uma vez que contribui de maneira significativa para o entendimento do reparo muscular. Os mioblastos proliferam, mas permanecem indiferenciados por fatores mitog nicos presentes no soro fetal bovino (SFB). Dessa forma,   necessária a retirada do SFB (substituição por soro de cavalo – pouco mitogênico) para encerrar o ciclo de proliferação e ativar genes específicos

envolvidos na diferenciação, causando a fusão de miotubos multinucleados⁸. Assim, as células C2C12 são mioblastos que podem se diferenciar em fibras multinucleadas quando crescem em meio de indução (2% soro de cavalo)^{9,10}.

A diferenciação dos mioblastos é identificada por meio da atividade da enzima creatina quinase (CK). A CK, além de ser utilizada como marcador indireto de dano muscular¹¹, é um importante marcador da diferenciação celular^{12,13}, o que justifica sua análise.

Diante do exposto, o melhor entendimento sobre os efeitos do US sobre as células musculares poderá contribuir de forma positiva para o estabelecimento de protocolos adequados a serem utilizados durante o processo de reparo muscular e recuperação clínica dos pacientes. Assim, o objetivo neste estudo foi avaliar os efeitos do ultrassom (US) sobre a atividade mitocondrial e a diferenciação de células musculares C2C12 cultivadas em meio de diferenciação.

Materiais e métodos

Este estudo foi desenvolvido no laboratório de cultivo celular do Programa de Mestrado e Doutorado em Ciências da Reabilita o da Universidade Nove de Julho (UNINOVE).

As células utilizadas foram mioblastos da linhagem C2C12 (células satélites de camundongo – ATCC), cultivadas no meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Vitrocell, Campinas, SP, Brasil), contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) (Vitrocell, Campinas, SP, Brasil).

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

O subcultivo foi realizado quando a monocamada celular se tornou subconfluente para

a perpetuação da linhagem celular, sempre em fluxo laminar (Linha 400, Pachane, Piracicaba, SP, Brasil). Para tanto, sobrenadante foi removido e as células foram lavadas com tampão PBS1X (NaCl 140mM; KCl 2,5mM; Na₂HPO₄ 8mM; KH₂PO₄ 1,4mM; pH 7.4) e tratadas com solução de tripsina 0,25%, durante três minutos, a 37 °C. Após incubação foi realizada nova lavagem com meio, centrifugação a 1200 rpm a 20 °C, por cinco minutos (Centrífuga Excelsa 4-280R, Fanem, São Paulo, SP, Brasil) e, posteriormente, ressuspensão em 1ml de meio DMEM. A viabilidade das células foi avaliada por contagem com corante vital azul de Trypan (0,4%), e só foram utilizadas nos ensaios as culturas com viabilidade maior que 95%.

As células musculares C2C12 foram submetidas a tratamento com US concomitantemente à indução de diferenciação celular, que foi induzida por meio da substituição do meio de cultivo pelo meio de diferenciação que consiste em DMEM (Vitrocell, Campinas, SP, Brasil) suplementado com 2% de soro de cavalo (SC) (Life Technologies, São Paulo, SP) durante 96 horas¹⁴.

Tratamento com ultrassom

Para o tratamento das células musculares, foi utilizado o equipamento de US Sonomaster Microcontrolled Communicator (KW Eletrônica, Amparo, São Paulo), nas intensidades de 0,2 e 0,5 W/cm², frequência de 3 MHz, modo pulso 20%, durante cinco minutos. A aplicação foi feita num tubo de centrifugação (tubo falcon estéril, marca TPP) contendo o precipitado celular, mergulhado em banho-maria mantido a 37 °C, de acordo com o modelo proposto por Mukai et al.¹⁵. A cabeça do transdutor (3 cm de diâmetro) foi posicionada perpendicularmente ao tubo falcon e fixada na armação de madeira, permanecendo a 3 cm da cultura celular. O tanque de água foi revestido com borracha para eliminar múltiplas reflexões. O grupo controle sofreu a mesma manipulação, mas não recebeu o tratamento com US.

Avaliação da atividade mitocondrial (viabilidade celular) – (MTT)

A metodologia se baseia na habilidade da enzima mitocondrial desidrogenase, encontrada somente em células viáveis, em clivar os anéis de tetrazólio do MTT, formando cristais azul-escuros de formazana, os quais são impermeáveis às membranas celulares, ficando então retidos no interior das células viáveis¹⁶. A posterior lise celular faz com que estes sais de formazana sejam liberados. O número de células viáveis é diretamente proporcional ao nível de cristais azul formados.

Para esta análise, as células musculares (0,5X10³/poço) foram submetidas ao tratamento com US e, posteriormente, incubadas em placas de cultura de fundo chato de 96 poços (TPP), mantidas em DMEM 10% de SFB (controle) e em DMEM com 2% de SC para indução da diferenciação celular. A atividade mitocondrial foi avaliada após 24 h, 48 h e 96 h de incubação das células submetidas ao tratamento com US e induzidas à diferenciação.

Ao término do período de incubação, foi realizada lavagem com 200 µl de PBS 1X, adicionados 50 µl de MTT (0,5 µg/ml em tampão) (3-[4,5-Dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue – Sigma) e realizada uma incubação de 4 h, a 37 °C.

Terminado o tempo de incubação, foram adicionados 100 µl de isopropanol para ressuspender e solubilizar o precipitado. Por fim, foi realizada a leitura da placa com auxílio de um leitor de placas a uma absorbância de 620 nm^{17,18}.

Diferenciação celular avaliada por atividade de CK

A metodologia foi baseada em Amack e Mahadevan¹⁹ e consiste na dosagem de CK intracelular. Para tanto, as células-controle submetidas a tratamento com US foram lisadas utilizando o tampão de lise (PBS1X + 0,1% Triton X-100) em temperatura ambiente por dez minutos. Em seguida, foram centrifugadas a 10000 rpm, por dez minutos, a 4 °C; e o sobrenadante foi arma-

zenado a -80 °C. Posteriormente, a atividade de CK em alíquotas de sobrenadante foi determinada utilizando o *kit* comercial “CK–NAC liquorm” (Labtest, Minas Gérias, Brasil), seguindo as orientações do fabricante. A avaliação da atividade de CK foi realizada para os períodos de um e três dias^{19,20,21}.

Análise dos resultados

Para comparação dos resultados, foi utilizada a análise de variância (ANOVA). O teste de Tukey foi usado para determinar diferenças significativas entre os grupos experimentais e o controle. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Os dados foram analisados por meio do programa GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Os experimentos foram realizados em quadruplicata e repetidos por três vezes.

Resultados

Atividade mitocondrial (viabilidade celular)

Os resultados permitiram verificar um aumento progressivo da atividade mitocondrial em todos os grupos experimentais (controle, US 0,2 w/cm² e US 0,5 w/cm²), quando comparados os períodos de 24 h, 48 h e 96 h. Porém, não houve alteração nesta atividade, quando comparadas as células musculares submetidas a tratamento com US com as do grupo controle, em todos os períodos avaliados (Figura 1).

Diferenciação celular avaliada por atividade de CK

Os resultados permitiram verificar que não houve alteração na atividade de CK nas células musculares submetidas a tratamento com US, nas intensidades de 0,2 W/cm² e 0,5 W/cm², em comparação as do grupo controle, em ambos os períodos avaliados (Figura 2). Outro achado foi o aumento da atividade de CK em todos os grupos

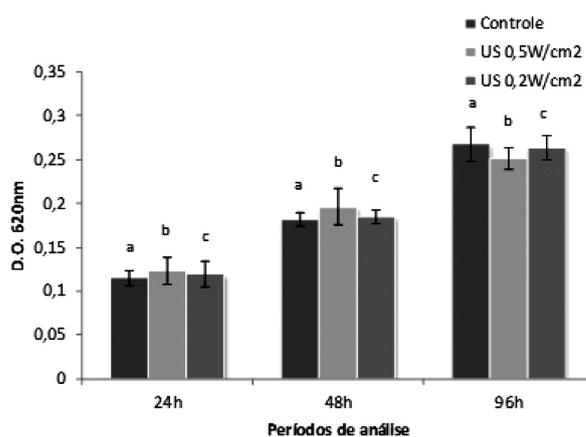


Figura 1: Avaliação da atividade mitocondrial (viabilidade celular) após tratamento utilizando US concomitante à indução da diferenciação das células satélites (2% de SC) após 24 h, 48 h e 96 h. Letras iguais denotam diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$; Anova/Tukey)

experimentais após três dias, quando comparado ao período de um dia, caracterizando, desse modo, o processo de diferenciação (Figura 2).

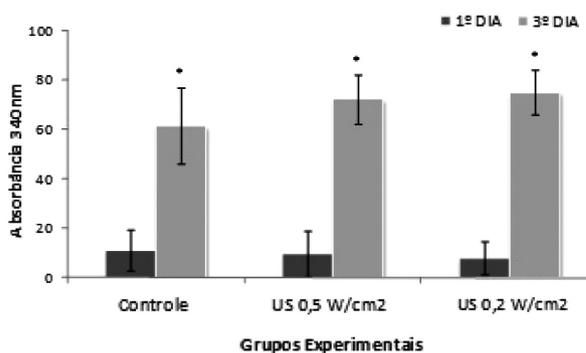


Figura 2: Avaliação da atividade de CK após tratamento utilizando US concomitante à indução da diferenciação das células satélites (2% de SC), após um e três dias. * $p \leq 0,05$ (Anova/Tukey) dos grupos avaliados no terceiro dia comparado com o primeiro dia

Discussão

As lesões musculares são frequentes²² em praticantes de atividade física, causando afastamento das atividades diárias e comprometendo

do o desempenho muscular²³. Dessa forma, há a necessidade de busca por recursos terapêuticos que proporcionem um reparo muscular mais eficiente.

Neste estudo, avaliaram-se os efeitos do US em células musculares durante o processo de diferenciação celular, com o intuito de acumular maior conhecimento acerca da utilização deste recurso para o reparo muscular após lesões. Contudo, os resultados evidenciam que o US terapêutico não alterou a atividade mitocondrial e a de CK das células musculares que permaneceram em meio de diferenciação.

Ribeiro et al.²⁴ avaliaram o efeito do US (modo pulsado a 20%, com 1 e 3 MHz e intensidade de 0,2 e 0,5 W/cm², tempo de aplicação de dois e cinco minutos) na atividade mitocondrial (viabilidade celular) das células satélites C2C12 pelo método de MTT e não evidenciaram alteração após o período de 72 horas. Entretanto, no trabalho²⁴ citado não foi utilizado o modelo de indução de diferenciação com o soro de cavalo, sendo apenas avaliado o efeito do US sobre mioblastos.

Man et al.²⁵ e Li et al.²⁶ avaliaram a proliferação e diferenciação de células ósseas tratadas com US e observaram maior diferenciação dessas células, sendo considerado como uma ferramenta terapêutica importante para reparação desse tecido. Mizrahi et al.²⁷ verificaram o efeito do US de 1 MHz sobre células endoteliais e observaram estimulação da angiogênese no grupo tratado. Hill et al.²⁸ demonstraram que o US não alterou diretamente a proliferação e migração de células epiteliais, sugerindo que seu efeito cicatrizante ocorra por modulação de componentes da matriz extracelular.

Artilheiro et al.⁹ avaliaram o efeito da TLBP e do US na atividade mitocondrial (viabilidade celular) por MTT, realizado após 96 h de indução de diferenciação de células C2C12, e observaram que ambas as terapias não alteraram a atividade mitocondrial dessas células. Oliveira et al.²⁹ compararam a TLBP e a terapia com US pulsado em cultura de fibroblastos no período de 24 h, 48 h e 72 h e demonstraram que somente a TLBP

aumentou a atividade mitocondrial (viabilidade celular), analisada por MTT, em todos os períodos avaliados.

Outro achado, na atual pesquisa, foi o aumento dos níveis de CK no terceiro dia, quando comparado ao primeiro dia, evidenciando a diferenciação das células satélites musculares. Amack e Mahadevan¹⁸ avaliaram os níveis de CK intracelular nos períodos de um, três e cinco dias de diferenciação celular frente à regeneração muscular na distrofia miotônica, encontrando aumento nos níveis de CK de acordo com a diferenciação. Esses achados permitiram verificar que o tratamento com US não foi capaz de induzir aumento na atividade de CK, após 24 h e 72 h, não demonstrando, assim, um efeito sobre a modulação do processo de diferenciação. No entanto, a realização de novos experimentos – incluindo análises, como a avaliação da expressão de fatores regulatórios miogênicos e a utilização de outros parâmetros do US – são necessários para melhor avaliação do efeito deste recurso sobre a modulação do processo de diferenciação de células satélites musculares.

Conclusão

O tratamento com o US, nos parâmetros avaliados, não foi capaz de modular a atividade mitocondrial e de CK em células musculares da linhagem C2C12.

Agradecimento

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (2010/09191-5) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/ Programa de Suporte à Pós-Graduação de Instituições de Ensino Particulares – CAPES/ PROSUP, pelo apoio financeiro para execução deste estudo.

Referências

- Muñoz-Cánoves P, Sheele C, Pedersen BK, Serrano AL. Interleukin-6 myokine signaling in skeletal muscle: a double-edged sword? *FESB Journal*. 2013;280:4131-48.
- Pallafacchina G, François S, Regnault B, Czarny B, Dive V, Cumano A, et al. An adult tissue-specific stem cell in its niche: A gene profiling analysis of *in vivo* quiescent and activated muscle satellite cells. *Stem Cell Research*. 2010;4:77-91.
- Franco AD, Pereira LE, Groschitz M, Aimbire F, Martins RABL, Carvalho RA. Análise do efeito do ultra-som no edema inflamatório agudo: estudo experimental. *Fisioter Mov*. 2005;18(2):19-24.
- Mendonça AC, Ferreira AS, Barbieri CH, Thomazine JA, Mazzer N. Efeitos do ultra-som pulsado de baixa intensidade sobre a cicatrização por segunda intenção de lesões cutâneas totais em ratos. *Acta Ortop Bras*. 2006;14(3):152-7.
- Mitragotri S. Healing sound: the use of ultrasound in drug delivery and other therapeutic applications. *Nat Rev Drug Discov*. 2005;4:255-60.
- Montalti CS, Souza NV, Rodrigues NC, Fernandes KR, Toma RL, Rennó AC. Effects of low-intensity pulsed ultrasound on injured skeletal muscle. *Braz J Phys Ther*. 2013;17(4):343-50.
- Rennó AC, Toma RL, Feitosa SM, Fernandes K, Bossini PSDE, Oliveira P, Parizotto N, Ribeiro DA. Comparative effects of low-intensity pulsed ultrasound and low-level laser therapy on injured skeletal muscle. *Photomed Laser Surg*. 2011;29(1):5-10.
- Sachidanandan C, Sambasivan R, Dhawan J. Tristetraprolin and LPS-inducible CXC chemokine are rapidly induced in presumptive satellite cells in response to skeletal muscle injury. *J. Cell Sci*. 2002;115:2701-12.
- Artilheiro PP, Barbosa JLP, Fernandes KPS, Oliveira TS, Bussadori SK, Mesquita-Ferrari RA. Análise comparativa dos efeitos do ultrassom terapêutico e laser de baixa potência sobre a proliferação de células musculares durante a diferenciação celular. *Fisioter Mov*. 2012;25(1):21-9.
- Li ZY, Yang J, Gao X, Lu JY, Zhang Y, Wang K, et al. Sequential recruitment of PCAF and BRG1 contributes to myogenin activation in 12-O tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced early differentiation of rhabdomyosarcoma-derived cells. *J Biol Chem*. 2007;282:18872-8.
- Ohira Y, Matsuoka Y, Kawano F, Ogura A, Higo Y, Ohira T, et al. Effects of creatine and its analog, β -guanidinopropionic acid, on the differentiation of and nucleoli in myoblasts. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2011;75(6):1085-9.
- Stern-Straeter J, Bonaterra GA, Hörmann K, Kinscherf R, Goessler UR. Identification of valid reference genes during the differentiation of human myoblasts. *BMC Molecular Biology*. 2009;10(66):1-9.
- Diel P, Baadners D, Schlupmann K, Velders M, Schwarz JP. C2C12 myoblastoma cell differentiation and proliferation is stimulated by androgens and associated with a modulation of myostatin and Pax7 expression. *J Mol Endocrinol*. 2008;40:231-41.
- 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.
- Mukai S, Ito H, Nakagawa Y, Akiyama H, Miyamoto M, Nakamura T. Transforming growth factor B1 mediates the effects of low-intensity pulsed ultrasound in chondrocytes. *Ultrasound Med Biol*. 2005;31(12):1713-21.
- Löster K, Horstkorte R. Enzymatic quantification of cell-matrix and cell-cell adhesion. *Mícron*. 2000;31:41-53.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(2):55-63.
- Woerdenbag HJ, Merfort I, Passreiter CM, Schmidt TJ, Willuhn G, Van Uden W, et al. Cytotoxicity of flavonoids and sesquiterpene lactones from *Arnica* species against the GLC4 and the COLO 320 cell lines. *Planta Méd*. 1994;60(5):434-7.
- Amack JD, Mahadevan MS. The myotonic dystrophy expanded CUG repeat tract is necessary but not sufficient to disrupt C2C12 myoblast differentiation. *Hum Mol Genet*. 2001;10(8):1879-87.
- Ardite E, Barbera JA, Roca J, Fernández-Checa JC. Glutathione depletion impairs myogenic differentiation of murine skeletal muscle C2C12 cells through sustained NF-kappaB activation. *Am J Pathol*. 2004;165(3):719-28.
- Galvin CD, Hardiman O, Nolan CM. IGF-1 receptor mediates differentiation of primary cultures of mouse skeletal myoblasts. *Mol Cell Endocrinol*. 2003;200(1-2):19-29.

22. Souza J, Gottfried C. Muscle injury: Review of experimental models. *J Electromyogr Kinesiol.* 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jelekin.2013.07.009>
23. Kääriäinen M, Järvinen T, Järvinen M, Rantanen J, Kalimo H. Relation between myofibers and connective tissue during muscle injury repair. *Scand J Med Sci Sports.* 2000;10:332-7.
24. Ribeiro R, Fernandes KPS, Martins MD, Bussadori SK, Sampaio SV, Mesquita-Ferrari RA. Effect of therapeutic pulsed ultrasound on the proliferation and gelatinolytic activity of myoblasts. *Clin Exp Med Lett.* 2012;53(3):107-12.
25. Man J, Shelton RM, Cooper PR, Scheven BA. Low-intensity low-frequency ultrasound promotes proliferation and differentiation of odontoblast-like cells. *J Endod.* 2012;38(5):608-13.
26. Li L, Yang Z, Zhang H, Chen W, Chen M, Zhu Z. Low-intensity pulsed ultrasound regulates proliferation and differentiation of osteoblasts through osteocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;418(2):296-300.
27. Mizrahi N, Seliktar D, Kimmel E. Ultrasound-induced angiogenic response in endothelial cells. *Ultrasound Med Biol.* 2007;33(11):1818-29.
28. Hill GE, Fenwick S, Matthews BJ, Chivers RA, Southgate J. The effect of low-intensity pulsed ultrasound on repair of epithelial cell monolayers *in vitro*. *Ultrasound Med Biol.* 2005;31(12):1701-6.
29. Oliveira RF, Oliveira RP, Monteiro W, Zangaro RA, Magini M, Sares CP. Comparison between the effect of low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasonic irradiation *in vitro*. *Photomed Laser Surg.* 2008;26(1):6-9.

