

Análise da proliferação e morfologia de mioblastos C2C12 durante o processo de diferenciação

Analysis of proliferation and morphology of C2C12 during cell differentiation

Paola Pelegrineli Artilheiro¹, Jean Lucas Parpinelli Barbosa², Nadhia Helena Costa Souza¹, Mikaele Tavares da Silva³, Sandra Kalil Bussadori⁴, Kristianne Porta Santos Fernandes⁴, Raquel Agnelli Mesquita Ferrari⁴

¹ Mestranda em Ciências da Reabilitação, UNINOVE, São Paulo, Brasil; ² Discente do curso de Biomedicina, UNINOVE, São Paulo, Brasil; ³ Discente do curso de Fisioterapia, UNINOVE, São Paulo, Brasil; ⁴ Prof^a Dr^a dos Programa de Mestrado e Doutorado em Ciências da Reabilitação e de Biofotônica aplicada às Ciências da Saúde, UNINOVE, São Paulo, Brasil.

Resumo

Introdução: a miogênese é um processo essencial para a regeneração do tecido muscular após lesão. **Objetivo:** analisar a morfologia e a proliferação de mioblastos C2C12 durante o processo de diferenciação. **Metodologia:** os mioblastos foram cultivados em meio de manutenção (MM) (DMEM com 10% de SFB) e induzidos à diferenciação pela substituição por meio de diferenciação (MD) (DMEM com 2% soro de cavalo). A morfologia e proliferação celular foram avaliadas após 24, 48 e 96h de indução de diferenciação. A proliferação celular foi avaliada pelo método de MTT e as células foram fotografadas para análise da morfologia. **Resultados:** as células em MM apresentaram aumento significativo na proliferação quando comparadas às células em MD após 48 e 96h sendo observada uma maior confluência nestes mesmos períodos sem alteração da morfologia celular. **Conclusão:** os resultados podem facilitar no estabelecimento do período de análise para analisar a influência de algum tratamento sobre a proliferação e diferenciação de células musculares precursoras.

Palavras-chave: Morfologia. Proliferação. Diferenciação. Mioblastos.

Abstract

Background: The myogenesis is a process essential for the repair of injured muscle fibers. **Objective:** to analyze the morphology and proliferation of C2C12 myoblasts during the differentiation process induced by horse serum.

Methodology: The myoblasts were cultured in a culture of "Eagle" modified by Dulbecco, containing 10% fetal bovine serum (FBS), were induced to differentiate by replacing by DMEM containing 2% horse serum. Cells grown in DMEM containing 10% FBS analyzed in the same period served as controls. The morphology was assayed at 24, 48 and 96h after the addition of 2% horse serum or only during maintenance in DMEM 10% FCS. **Results:** The cells were photographed and the proliferation was assessed by MTT. **Conclusion:** our data can facilitate the establishment the best period to be used in order to analyze the influence of any treatment on the proliferation and differentiation of muscle cells.

Keywords: Morphology. Proliferation. Differentiation. Myoblasts.

INTRODUÇÃO

No músculo esquelético, o crescimento, a regeneração, a manutenção (renovação de mionúcleos) e a adaptação (plasticidade) são dependentes de uma população de células precursoras miogênicas, denominadas células satélites (SHI & GARRY, 2006; HARRIDGE, 2007; SHI & GARRY 2010) e localizadas abaixo da membrana basal da fibra muscular (DOGRA et al, 2007). Desta forma, estas células representam a maior parte do potencial regenerativo frente à lesão e adaptação muscular ao exercício (DOGRA et al, 2007).

Após uma lesão muscular, um conjunto de respostas celulares é iniciado, levando a um processo de reparo altamente organizado de forma a prevenir a perda de massa muscular. Uma vez ativadas estas

células migram até o local da lesão, proliferam e subsequentemente diferenciam-se e se fundem para restabelecer a arquitetura normal do músculo esquelético num processo conhecido com programação miogênica. A ativação e diferenciação das células satélites recapitulam a miogênese embrionária, uma vez que neste processo ao invés das células satélites, células precursoras miogênicas proliferam, diferenciam e se fundem para formarem miotubos multinucleados e posteriormente a célula muscular madura (TEDESCO et al. 2010; KOOK et al. 2008; SHI & GARRY, 2006; CHARGÉ et al, 2004).

A linhagem celular C2C12 utilizada no presente trabalho é um subclone da linhagem celular de mioblastos C2, células derivadas de células-satélite de camundongos adultos (Lai & Pittelkow, 2007; Hill et al 2005). Estes mioblastos exibem a maioria das características dos mioblastos normais e diferenciam-se em cultura, propiciando um bom modelo para estudar

Recebido em 25/01/2012; revisado em 12/03/2012.

Correspondência / Correspondence: Raquel Agnelli Mesquita Ferrari. PPrograma de Mestrado em Ciências da Reabilitação Universidade Nove de Julho - UNINOVE. Rua Vergueiro, 235, CEP 01504001. São Paulo-SP. Email: raquel.mesquita@gmail.com

a regeneração muscular (LEE et al, 2005; AMARAL, 2004; AMACK & MAHADEVAN, 2001; KUMAR ET AL, 2005).

Os mioblastos proliferam, mas permanecem indiferenciados por fatores mitogênicos presentes no soro fetal bovino e a retirada do soro (substituição por soro de cavalo pouco mitogênico) leva à saída irreversível do ciclo celular e ativação de genes específicos envolvidos na diferenciação causando a fusão de miotubos multinucleados que representa o passo terminal de diferenciação sendo que após isso, divisões mitóticas não ocorrem mais (Li et al. 2007). Desta forma, a utilização de linhagens miogênicas como a C2C12 contribui de maneira significativa para o estudo dos processos de proliferação e diferenciação de células precursoras miogênicas de forma a permitir o estabelecimento de terapias e protocolos que possam acelerar e melhorar o processo de reparo do músculo esquelético.

Com base no exposto, o objetivo do presente estudo foi analisar a morfologia e a proliferação de mioblastos C2C12 durante o processo de diferenciação.

MATERIAL E MÉTODOS

Cultura celular

Células da linhagem C2C12 foram cultivadas no meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Vitrocell Embriolife, Campinas, SP, Brasil) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e 1% antibiótico solução antimicótica (CULTILAB) em estufa 37°C, numa atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. O monitoramento do crescimento celular foi feito a cada 24 horas e quando a monocamada celular se tornava subconfluenta para a perpetuação da linhagem celular, foi realizado o subcultivo com lavagem tampão PBS1X (NaCl 140mM; KCl 2,5mM; Na₂HPO₄ 8mM; KH₂PO 1,4mM; pH 7,4) e solução de tripsina. As células foram centrifugadas a 1200rpm e posteriormente ressuspensas em 1ml de meio DMEM. A viabilidade das células foi avaliada por contagem com corante vital azul de Trypan (0,4%) e foram utilizadas nos experimentos as células com viabilidade maior que 95%.

Ensaio de proliferação celular (MTT)

Para os ensaios de proliferação celular os mioblastos (1X10³/poço) foram incubados em placas de cultura de fundo chato de 96 poços (TPP) em duas condições:

(a) Meio de manutenção (MM), ou seja, DMEM suplementado com 10% de SFB;

(b) Meio de diferenciação (MD), ou seja, DMEM suplementado com 2% de Soro de Cavalo (Invitrogen, Brasil).

A proliferação celular foi avaliada após 24, 48 e 96 horas de incubação em ambas as condições. Ao término do período de incubação, foi realizada lavagem com PBS 1X, adicionado o MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-

2yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue – SIGMA) (0,5 mg/ml) e realizada uma incubação de 4h a 37°C. Em seguida, foi adicionado o isopropanol para solubilizar os cristais de formazana sendo realizada a seguir a verificação de absorbância a 620nm utilizando o leitor de placas (Anthos2020, Anthos Labtec Instruments, Wals, Áustria) (Mosmann, 1983).

Todos os experimentos foram repetidos 3 vezes, de forma independente, e cada amostra foi feita em triplicata.

Avaliação da morfologia

Os mioblastos cultivados nas duas condições descritas anteriormente, ou seja, na presença de MM e MD, foram também avaliados por registro fotográfico com auxílio de microscópio invertido de fase (Eclipse TE 2000U, Nikon, Melville, NY, EUA) obtidos nos mesmos períodos da análise de proliferação, ou seja, 24, 48 e 96h após o plaqueamento (1X10³/poço) em placas de cultura de fundo chato de 96 poços (TPP). Esta análise permitiu também a avaliação qualitativa da densidade celular (confluência).

Análise estatística

Os dados foram expressos em média e desvio padrão e a análise de variância (ANOVA – Teste de Tukey) foi utilizada para verificar diferenças entre os grupos experimentais. Valores de p < 0,05 foram considerados estatisticamente significantes. Os dados foram analisados por meio do programa GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). A significância estatística foi verificada pelo teste Dunnett e considerada aceitável quando p < 0,05.

RESULTADOS

Avaliação da proliferação celular

Os resultados permitiram verificar que não houve alteração significativa da proliferação celular após 24h entre as células cultivadas em MM e MD. Contudo, após 48 e 96h houve redução significativa na proliferação celular das células cultivadas em MD

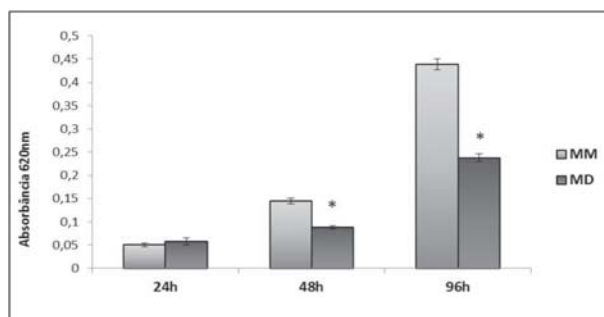


Figura 1 – Avaliação da proliferação celular de mioblastos cultivados em MM e MD nos períodos de 24, 48 e 96h.

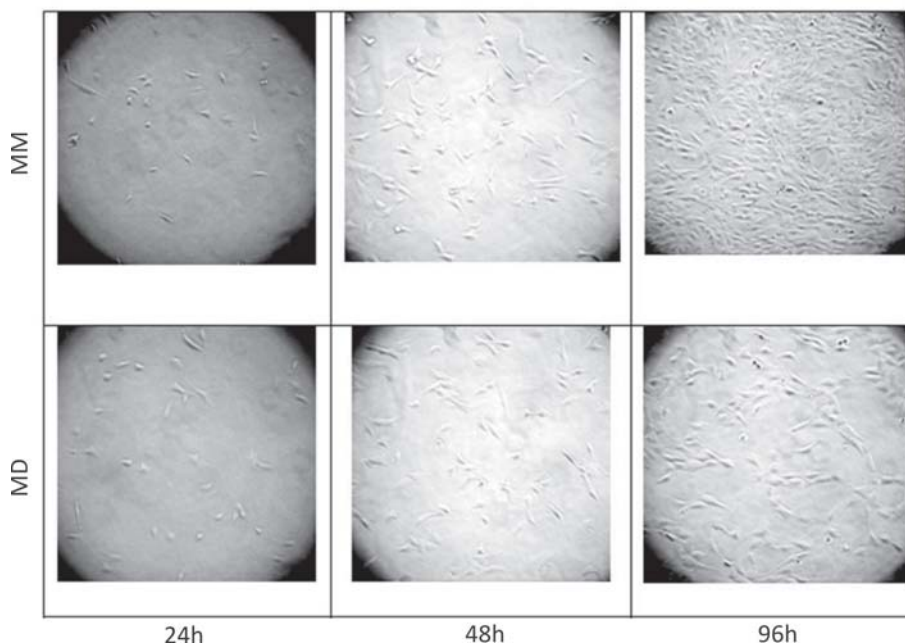


Figura 2 – Avaliação da morfologia e densidade celular de mioblastos cultivados em MM e MD nos períodos de 24, 48 e 96h.

em comparação as células cultivadas em MM, confirmando o processo de diferenciação celular (figura 1).

Além disso, foi observado um aumento significativo no número de células com o aumento do tempo de incubação em ambas as situações de cultivo (figura 1).

Avaliação da morfologia e densidade celular (confluência)

Os resultados dos registros fotográficos obtidos após 24 e 48 de incubação em MM e MD permitiram verificar que não houve alteração na morfologia entre as células cultivadas nestes diferentes meios. Após 96h pode ser notado formação de células maiores e mais alongadas no grupo cultivado em MD em comparação as células cultivadas em MM, condizente com a formação de miotubos ¹⁶.

Com relação à confluência celular, não foi observada alteração após 24h porém após 48h uma redução desta nas células cultivadas em MD já pode ser notada, tornando-se mais evidente após 96h (figura 2).

DISCUSSÃO

A capacidade do músculo esquelético adulto de se regenerar e restabelecer sua arquitetura celular se deve a existência neste tecido de células precursoras denominadas células satélites (SHI & GARRY, 2010). Uma vez ativadas estas células irão proliferar e se diferenciar para se fundir a uma fibra pré-existente ou para constituir uma nova fibra e, desta forma, a importância do conhecimento acerca

destes eventos e de tratamentos que possam modular favoravelmente este processo fica evidente.

Devido ao grande interesse sobre o entendimento dos mecanismos envolvidos no processo de reparo do músculo esquelético frente a vários tipos de lesão e de como terapias e recursos podem ser utilizados para modulá-lo de forma a acelerá-lo e melhorar sua qualidade, justifica-se a realização de estudos utilizando a linhagem de mioblastos C2C12 uma vez que estas células expressam fatores regulatórios miogênicos de forma muito semelhante a aquela observada durante a miogênese in vivo, propiciando um bom modelo para estudar a regeneração muscular (YAFFE & SAXEL, 1977; SCHIERHOLT et al., 2008; DAL PAI-SILVA & CARVALHO, 2007). Uma vantagem importante a ser considerada quando se utiliza linhagens é avaliação mais precisa do efeito de determinado tratamento sobre aquele tipo celular, uma vez que não há a influência de fatores de crescimento ou citocinas produzidos por outros tipos celulares (LI et al., 2007; CHANDRAN et al, 2007; FERREIRA et al, 2009).

Os resultados do presente estudo permitiram verificar que após 24h não houve diferenciação a ponto de reduzir a taxa de mitose das células cultivadas em MD em relação às células cultivadas em MM. Já após 48h e, especialmente após 96h, esta diferença passou a ser significativa evidenciando que as células cultivadas em MD reduziram sua taxa de mitose, o que é condizente com o processo de diferenciação terminal (LI et al, 2007). Além disso, com base nos presentes achados, foi verificado que no período de 96h as células musculares desta

linhagem não sofreram diferenciação terminal uma vez que continuaram a se dividir o que foi evidenciado pelo aumento de proliferação entre os períodos avaliados.

Além disso, foi possível verificar pela análise da morfologia celular que as células cultivadas em MM apresentaram em todos os períodos avaliados um aspecto fusiforme ou estrelado característico das células satélites indiferenciadas enquanto as células cultivadas em MD apresentaram estas mesmas características nos períodos de 24 e 48h, porém após 96h começaram a ser identificadas células maiores e mais alongadas caracterizando a fusão de mioblastos para a formação de miotubos (BARATTINI et al., 2004).

Em conclusão, foi possível verificar que houve alteração na morfologia celular e redução na proliferação de mioblastos C2C12 após 96h de cultivo em MD sendo estas características compatíveis com o processo de diferenciação. Além disso, os dados deste estudo podem facilitar na determinação do período de análise a ser utilizado para esta linhagem de forma a estabelecer com maior precisão a influência de recursos terapêuticos sobre a proliferação e diferenciação de células musculares precursoras uma vez que estas são fundamentais para o processo de regeneração muscular.

Agradecimento

Agradecemos à FAPESP (2010/09191-5), ao CNPq (473710/2011-0) e a UNINOVE pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- AMACK, J.D.; MAHADEVAN, M.S. The myotonic dystrophy expanded CUG repeat tract is necessary but not sufficient to disrupt C2C12 myoblast differentiation. *Hum. Mol. Genet.*, Oxford, v. 10, n.8, p. 1879-87, 2011.
- AMARAL, A.C. **Influência da terapia laser de baixa intensidade em células precursoras miogênicas (in vitro) e durante a regeneração muscular (in vivo)** 2004. Dissertação - (Mestrado) - Univ. Federal de São Carlos, São Paulo, 2004.
- BURATTINI, S.N. et al. C2C12 murine myoblasts as a model of skeletal muscle development: morpho-functional characterization. *Eur. J. Histochem.* Pavia, v. 48, n. 3, p. 223-234, 2004.
- CHANDRAN, R. et al. Biomechanical signals upregulate myogenic gene induction in the presence or absence of inflammation. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, Bethesda, Md., v. 293, n.1, p.267-276, 2007.
- CHARGÈ, S.B.P.; RUDNICK, M.A. Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration. *Physiol. Rev.*, Washington, v. 84, n.1, p. 209-238, 2004.
- DAL PAI-SILVA, M.; CARVALHO, R.F. Mecanismos celulares e moleculares que controlam o desenvolvimento e o crescimento muscular. *Rev. Bras. Zootec.* Viçosa, v. 36, suppl., p.21-31, 2007.
- DOGRA, C. et al. 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.*, Baltimore, v. 282, n.20, p.5000-5010, 2007.
- FERREIRA, M.P.P. Effect of low-energy GaAlAs and InGaAlP laser irradiation on the viability of C2C12 myoblasts in a muscle injury model. *Photomed. Laser Surg.*, Larchmont, v.27, n.6, p. 901-906, 2009.
- HARRIDGE, S.D.R. Plasticity of human skeletal muscle: gene expression to in vivo function. *Exp. Physiol.*, Cambridge, v.92, n.5, p.783-797, 2007.
- HILL, G.E. et al. The effect of low-intensity pulsed ultrasound on repair of epithelial cell monolayers in vitro. *Ultrasound Med. Biol.*, Oxford, v.31, n.12, p.1701-1706, 2005.
- KOOK, S.H. et al. Cyclic mechanical stretch stimulates the proliferation of C2C12 myoblasts and inhibits their differentiation via prolonged activation of p38 MAPK. *Mol. Cells.*, Seoul, v.25, n.4, p. 479-486, 2008.
- KUMAR, A. et al. Pregnancy-associated plasma protein-A regulates myoblast proliferation and differentiation through an insulin-like growth factor-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 280, n. 45, p. 37782-37789, 2005.
- LAI, J.Y.; PITTELKOW, M.R. Physiological effect of ultrasound mist on fibroblasts. *Int. J. Dermatol.*, Philadelphia, v.46, n. 6, p.587-593, 2007.
- LEE, M.H. et al. Nitric oxide induces apoptosis in mouse C2C12 myoblast cells. *J. Pharmacol. Sci.*, Kyoto, v.97, n.3, p. 369 -376, 2005.
- LI, W.; WU, G.; WAN, Y. The dual effects of Cdh1/APC in myogenesis. *FASEB J.*, Bethesda, v.21, n.13, p.3606-3617, 2007.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, Amsterdam, v.65, n.2, p.55-63, 1983.
- SCHIERHOLT, A.S. et al. Análise filogenética do gene da miogenina. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, Belo Horizonte, v.60, n.1, p.156-162, 2008.
- SHI, X.; GARRY, D.J. Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. *Genes Dev.*, Cold Spring Harbor, N.Y, v.20, n.13, p. 1692-1708, 2006.
- SHI, X.; GARRY, D.J. Myogenic regulatory factors transactivate the Tceal7 gene and modulate muscle differentiation. *Biochem. J.*, London, v.428, n.2, p. 213-221, 2010.
- TEDESCO, F.S. Repairing skeletal muscle: regenerative potential of skeletal muscle stem cells. *J. Clin. Invest.*, New York, v.120, n.1, p.11-19, 2010.
- YAFFE, D.; SAXEL, D. Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature*, New York, v.270, p.725-727, 1977.