



UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOFOTÔNICA APLICADA ÀS
CIÊNCIAS DA SAÚDE

STELLA MARIS LINS TERENA

**EFEITOS DO LBP (780nm) SOBRE OS ASPECTOS MORFOLÓGICOS DO
COMPLEXO MÚSCULO TENDÍNEO DO MÚSCULO PLANTAR DE RATOS
DURANTE O PROCESSO DE HIPERTROFIA COMPENSATÓRIA: *IN VIVO E
IN VITRO***

SÃO PAULO, SP

2016



STELLA MARIS LINS TERENA

**EFEITOS DO LBP (780nm) SOBRE OS ASPECTOS MORFOLÓGICOS DO
COMPLEXO MÚSCULO TENDÍNEO DO MÚSCULO PLANTAR DE RATOS
DURANTE O PROCESSO DE HIPERTROFIA COMPENSATÓRIA: *IN VIVO E
IN VITRO***

Tese apresentada à Universidade Nove de
Julho, para obtenção do título de Doutora em
Biofotônica aplicada às Ciências da Saúde.

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

Co-orientadora brasileira: Prof^a Dr^a Kristianne Porta
Santos Fernandes

Co-orientadora estrangeira: Prof^a. Dr^a. Maria Helena
Raposo Fernandes

SÃO PAULO, SP

2016

Terena, Stella Maris Lins.

Efeitos do LBP (780nm) sobre os aspectos morfológicos do complexo músculo tendíneo do músculo plantar de ratos durante o processo de hipertrofia compensatória: in vivo e in vitro. / Stella Maris Lins Terena. 2016. 69 f.

Tese (doutorado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2016.

Orientador (a): Prof. Dra. Raquel Agnelli Mesquita Ferrari.

1. Colágeno. 2. Complexo músculo-tendíneo. 3. Hipertrofia compensatória. 4. Laser de baixa potência. 5. Huvecs.

I. Ferrari, Raquel Agnelli Mesquita.

II. Título

CDU 615.831



TERMO DE APROVAÇÃO

EFEITOS DO LBP (780nm) SOBRE OS ASPECTOS MORFOLÓGICOS DO COMPLEXO MÚSCULO TENDÍNEO DO MÚSCULO PLANTAR DE RATOS DURANTE O PROCESSO DE HIPERTROFIA COMPENSATÓRIA: *IN VIVO E IN VITRO*

STELLA MARIS LINS TERENA

Tese apresentada à Universidade Nove de Julho, para obtenção do título de Doutora em Biofotônica aplicada às Ciências da Saúde.

Aprovado em: ____/____/____

Presidente: Prof^a. Dr^a. Raquel Agnelli Mesquita Ferrari - Orientadora - UNINOVE

Membro: Prof^a. Dr^a. Kristianne Porta Santos Fernandes - Coorientadora – UNINOVE

Membro externo: Prof^a. Dr^a. Maria Helena Raposo Fernandes - Coorientadora –
UNIVERSIDADE DO PORTO

Membro externo: Prof^a. Dr^a. Luciana Correa - USP

Membro interno: Prof. Dr. Rodrigo Labat Marcos - UNINOVE

Membro interno: Prof^a. Dr^a. Cristiane Miranda França - UNINOVE

São Paulo, 01 de março de 2016

*Dedico este trabalho ao meu marido **Fabio** pelo
companheirismo e aos meus filhos **Fernanda** e
Leonardo pelos dias de ausência.
Esta dedicatória se estende à minha orientadora
Dra. Raquel Agnelli Mesquita Ferrari pela
confiança e amizade.*

AGRADECIMENTOS

À **Deus** que sempre orientou meus caminhos, me deu força para continuar e superar as dificuldades.

Aos meus pais **Aibã** e **Maria Stella** e minha sogra **Elda** pelo apoio incondicional.

À minha orientadora **Prof^a. Dr^a. Raquel Agnelli Mesquita Ferrari** pela tranquilidade e paciência para me transmitir os ensinamentos da vida de pesquisador. Esteve presente em todos os momentos que precisei e que é para mim um exemplo de competência e capacidade. Agradeço a confiança depositada e registro aqui minha admiração e gratidão pelo conhecimento adquirido.

À minha co-orientadora **Prof^a. Dr^a. Kristianne Porta Santos Fernandes** pelo exemplo de competência e todo incentivo durante o desenvolvimento deste trabalho. Registro também minha admiração e gratidão pelo conhecimento adquirido.

À minha co-orientadora de Portugal **Prof^a. Dr^a. Maria Helena Raposo Fernandes** pelo acolhimento e carinhosa recepção em seu laboratório. Pela paciência e disponibilidade para tantas perguntas. Registro aqui minha gratidão e eterna admiração.

Às demais professoras e professores do laboratório da UNINOVE que sempre estiveram disponíveis para me auxiliar com a realização deste trabalho.

Aos meus colegas e técnicos do laboratório que sempre estiveram disponíveis para me acolher e me auxiliar na realização deste trabalho.

Aos meus colegas do laboratório de Farmacologia da Universidade do Porto por me auxiliarem na realização deste trabalho.

À **Universidade Nove de Julho - UNINOVE** pelo apoio e por ter me concedido a bolsa de estudo para concretizar um sonho.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** por tornar possível a realização deste trabalho no Brasil e no exterior pela bolsa concedida.

*"A tarefa árdua de um trabalho não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o
que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê."
(Arthur Schopenhauer)*

RESUMO

Terena, SML (2016). **Efeitos do LBP (780nm) sobre os aspectos morfológicos do complexo músculo tendíneo do músculo plantar de ratos durante o processo de hipertrofia compensatória: *in vivo* e *in vitro***. 69 f. Tese (Doutorado) – programa de Pós-Graduação em Biofotônica aplicada às Ciências da Saúde –UNINOVE, São Paulo, 2016.

O músculo esquelético é um tecido de grande capacidade adaptativa e que é capaz de alterar suas características para atender às diversas demandas funcionais. Essa adaptação pode ser causada por uma sobrecarga mecânica que resulta num aumento do tamanho da área da fibra muscular e aumento de massa muscular. Esse processo é conhecido como hipertrofia muscular e durante a hipertrofia inúmeras modificações ocorrem tanto no tecido muscular quanto nos tendões. Os trabalhos recentes com laser de baixa potência (LBP) no músculo esquelético tem demonstrado que seus efeitos são positivos no que diz respeito ao processo de redução da inflamação, redução da mionecrose e influência sobre as fibras de colágeno durante o processo de remodelamento. Nesse contexto o presente estudo teve por objetivo analisar os efeitos do LBP (780nm) durante o processo de hipertrofia compensatória sobre os aspectos musculares e tendíneos do músculo plantar de ratos (*in vivo*) e também avaliar seus efeitos em células endoteliais humanas (Huvecs) *in vitro*. Foram utilizados para o experimento *in vivo* 22 ratos Wistar, divididos em 3 grupos: controle, não irradiado com hipertrofia e irradiado com hipertrofia. Os parâmetros utilizados para a irradiação foram $\lambda = 780\text{nm}$, área do feixe $0,04\text{ cm}^2$, potência de saída 40mW , densidade de energia de 10J/cm^2 . Foram analisados os períodos de 7 e 14 dias. Para causar a hipertrofia foi utilizado o modelo de ablação dos sinergistas sendo retirados para este estudo os músculos gastrocnêmio lateral e medial e o músculo sóleo, restando o músculo plantar que sofreu a sobrecarga. Foram analisados a área de secção transversa, a área do colágeno, o número de mionúcleos e vasos sanguíneos maduros no tecido muscular e organização e disposição das fibras de colágeno no tendão. Para o experimento *in vitro* foram utilizadas células endoteliais (Huvecs) divididas em grupos controle e os demais grupos irradiados também com $\lambda = 780\text{nm}$, área do feixe $0,04\text{ cm}^2$, potência de saída 40mW e densidades de energia de 1J/cm^2 , 5J/cm^2 , 10J/cm^2 e 20J/cm^2 . O tempo de aplicação foi diferente, calculado para que todos os grupos recebessem a mesma dose de energia. Foram avaliados a viabilidade celular, proteína total e a formação de vasos em matrigel. Os resultados *in vivo* obtidos demonstraram que houve aumento da área de secção transversa do grupo irradiado após 14 dias (26,3%) quando comparado ao grupo não irradiado. Houve também aumento do número de mionúcleos no grupo irradiado após 14 dias. A área total do colágeno muscular aumentou (4,2%) no grupo irradiado em 7 dias e diminuiu (6,4%) no grupo irradiado após 14 dias quando comparado ao grupo não irradiado nos dois períodos. A análise por birrefringência nos tendões demonstrou maior organização das fibras em 7 e em 14 dias quando comparadas ao grupo não irradiado. Os resultados *in vitro* demonstraram que as diferentes fluências do laser interferiram de maneira diferente na viabilidade de células Huvecs em todos os períodos avaliados. Com relação a contagem de vasos maduros houve aumento no grupo irradiado após 14 dias. Em conclusão a irradiação laser aumentou a massa muscular, o número de mionúcleos e o número de vasos maduros e diminuiu a área total de colágeno no tecido muscular após 14 dias; melhorou a organização do colágeno tendíneo em 7 e em 14 dias e interferiu na viabilidade e concentração de proteína total de maneira dose dependente das células endoteliais Huvecs.

Palavras-Chaves: colágeno, complexo músculo-tendíneo, hipertrofia compensatória, laser de baixa potência, Huvecs.

ABSTRACT

Terena, SML (2016). **Effects of low-level laser (780nm) on the morphology of the tendon muscle complex in plantar muscle of rats during the process of compensatory hypertrophy: *in vivo* and *in vitro***. 69 . Thesis (PhD) – Pos-Graduate program in Biophotonics applied to Health Sciences, UNINOVE, São Paulo.

Skeletal muscle is a tissue of great adaptive capacity and is able to change its characteristics to meet various functional demands. This adaptation can be caused by mechanical overloading which results in an increase in the size of the area of muscle fiber and increase muscle mass. This process is known as muscle hypertrophy and during numerous modifications hypertrophy occur in both the muscle tissue and tendons. Studies with low-level laser (LLL) in skeletal muscle have demonstrated that its effects are positive with respect to the reduction process of inflammation, myonecrosis and reduced influence on the collagen fibers during the remodeling process. The present study aimed to analyze the effects of LLL (780nm) during the compensatory hypertrophy process on the muscular aspects and tendon of the plantaris muscle of mice (*in vivo*) and also evaluate its effects on human endothelial cells (HUVECs) *in vitro*. They were used for the *in vivo* experiment 22 Wistar rats were divided into control group, non-irradiated group and irradiated group hypertrophy. The parameters used for the irradiation were $\lambda = 780\text{nm}$, beam area 0.04 cm^2 , 40mW output power, energy density of 10 J / cm^2 . periods of 7 and 14 days were analyzed. To cause hypertrophy model was used for ablation of synergists being taken for this study, the gastrocnemius medial and lateral muscles and the soleus muscle, leaving the plantaris muscle suffered overload. the cross-sectional area were analyzed, collagen area, the number of myonuclei and mature blood vessels in muscle tissue and the organization and arrangement of collagen fibers in the tendon. For the experiment *in vitro* endothelial cells were used (HUVECs) were divided into control group and the other groups irradiated also with $\lambda = 780\text{nm}$, 0.04 cm^2 beam area, 40mW output power and energy density of 1 J / cm^2 , 5 J / cm^2 , 10 J / cm^2 to 20 J / cm^2 . The different application time was calculated for all groups received the same dose of energy. They assessed cell viability, total protein and vessel formation in Matrigel. The *in vivo* results showed that there was increased cross-sectional area of the irradiated group after 14 days (26.3%) when compared to non-irradiated group. There was also increased number of myonuclei in the irradiated group after 14 days. The total area of muscle collagen increased (4.2%) in the irradiated group in 7 days and decreased (6.4%) in the irradiated group after 14 days when compared to non-irradiated group in both periods. Analysis by birefringence in the tendons showed better organization of the fibers 7 and 14 days when compared to non-irradiated group. *In vitro* results have shown decrease in cell viability in all irradiated all groups compared to the control and counting mature vessels was increased number of vessels in the irradiated group even after 14 days. In conclusion laser irradiation increased muscle mass, the number of myonuclei and the number of mature vessels and decreased collagen total area of muscle tissue after 14 days; improved tendon collagen organization for 7 and 14 days and interfere with the viability and total protein concentration in a dose-dependent endothelial cells HUVECs.

Key Words: Collagen, muscle-tendon complex, compensatory hypertrophy, low-level laser, Huvecs.

SUMÁRIO

1	CONTEXTUALIZAÇÃO	15
1.1	Hipertrofia compensatória	16
1.2	Modelo de sobrecarga funcional: ablação dos músculos sinergistas	16
1.3	Mecanismos e determinantes celulares e moleculares na hipertrofia compensatória	18
1.4	Angiogênese e hipertrofia muscular	22
1.5	Matriz extracelular (MEC) e fibras de colágeno muscular e tendíneas	23
1.6	Laser de Baixa Potência (LBP)	23
1.6.1	Aspectos gerais	23
2	OBJETIVOS	26
2.1	Objetivo geral	26
2.2	Objetivo específico	26
3	MÉTODOS	27
3.1	<i>In vivo</i>	29
3.1.1	Animais	29
3.1.2	Grupos experimentais	29
3.1.3	Procedimento cirúrgico	30
3.1.4	Irradiação com Laser de Baixa Potência (LBP)	31
3.1.5	Coleta do material	32
3.1.6	Análise histológica muscular e do colágeno	33
3.2	<i>In vitro</i>	36
3.2.1	Grupos experimentais	36
3.2.2	Viabilidade celular (MTT)	37
3.2.3	Proteína total	38
3.2.4	Matrigel	39
3.2.5	Análise estatística	39
4	RESULTADOS	40
4.1	Artigo 1: <i>Systematic review of the synergist ablation model for compensatory hypertrophy</i> (submetido para publicação)	40
4.2	Artigo 2: <i>Effects of Low Level Laser in the morphology of the skeletal muscle fiber during compensatory hypertrophy in Plantar muscle of rats</i> (publicado)	43
4.3	Artigo 3: <i>Infrared laser improves muscle and tendon collagen during the compensatory hypertrophy</i> (em processo de submissão para publicação)	46
4.4	<i>in vitro</i>	55
5	DISCUSSÃO	58
6	CONCLUSÃO	63
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	64
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
ANEXOS		
ANEXO 1 Carta de aprovação da pesquisa (CEUA)		
ANEXO 2 Comprovante da submissão do artigo 1 para a Revista da Associação Médica Brasileira (RAMB)		
ANEXO 3 Artigo 1 completo (submetido)		
ANEXO 4 Artigo 2 completo (publicado)		

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Localização do músculo plantar em ratos. Adaptado e extraído de Zhang <i>et al.</i> , 2008.....	18
Figura 2: Imagem extraída e adaptada de Hawke and Garry (2001), mostrando a proliferação e diferenciação das células satélites durante o mecanismo de hipertrofia.....	19
Figura 3: Processos e cascatas de sinalização e síntese proteica na ativação, diferenciação e proliferação de células satélites. (Extraído de Sakuma & Yamaguchi, 2012).....	21
Figura 4: Fluxograma do processo de seleção da literatura de acordo com PRISMA. Extraído do artigo submetido à Revista da Associação Médica Brasileira (RAMB), Terena <i>et al.</i> (2015).....	28
Figura 5: Modelo de cirurgia de ablação dos sinergistas para a hipertrofia do músculo plantar.....	31
Figura 6: Equipamento utilizado na irradiação e os parâmetros usados.....	32
Figura 7: Procedimento de irradiação LBP sobre a região correspondente ao músculo plantar (8 pontos).....	32
Figura 8: <i>Print Screen</i> do processo de análise dos tipos de colágeno usando o plugin <i>Colour Deconvolution</i> do software ImageJ.....	35
Figura 9: Procedimento de irradiação LBP na região do tubo após centrifugação.....	37
Figura 10: Gráficos demonstrando o ganho de massa muscular com o modelo de hipertrofia compensatória.....	42
Figura 11: Gráfico do peso do músculo plantar entre os grupos experimentais.....	44
Figura 12: Cortes transversais das fibras musculares observados e fotografados no microscópio com objetiva 40x.....	45
Figura 13: Comparação dos grupos em relação à área da fibra muscular medida pelo perímio.....	46
Figura 14: Fotomicrografias de lâminas coradas com HE e com inversão de cores através do software imageJ (Binary/threshold).....	47
Figura 15: Quantificação da área da matriz extracelular em porcentagem.....	48

Figura 16: Fotomicrografia de cortes histológicos corados com <i>picrossírius</i> (objetiva 40x).....	49
Figura 17: Quantificação da área total de colágeno (μm^2).....	50
Figura 18: Quantificação dos tipos de colágeno (fibras maduras e fibrilas).....	51
Figura 19: Análise qualitativa das imagens através da birrefringência.....	52
Figura 20: Quantificação da birrefringência do colágeno no tendão no músculo plantar.....	53
Figura 21: Quantificação do número de mionúcleos.....	54
Figura 22: Quantificação do número dos vasos maduros.....	54
Figura 23: Viabilidade celular das Huvecs após irradiação LBP.....	55
Figura 24: Concentração de proteínas totais nos grupos experimentais após irradiação LBP.....	56
Figura 25: Análise qualitativa do matrigel após 42 horas da irradiação LBP....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estudos selecionados para a revisão incluindo a hipertrofia compensatória no músculo plantar com quantificação da área de secção transversa (AST) e/ou massa muscular.....	39
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AsGAAI: Arseniato de Gálio e Alumínio

bHLH: "*basic helix-loop-helix*"

CS: células satélites

FGF: fator de crescimento de fibroblasto

FRMs: Fatores Regulatórios Miogênicos

HC: hipertrofia compensatória

HGF: Fator do hormônio de crescimento

Huvecs: Human vein endothelial cells

IL: interleucina

IGF-1: Fator de crescimento semelhante à insulina

LBP: laser de baixa potência

LLL: low level laser

MEC: matrix extracelular

MMPs: metaloproteinases

MTT: brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral α

TGF- β : Fator de transformação do crescimento β

VEGF: Fator de Crescimento Endotelial

1 CONTEXTUALIZAÇÃO

O músculo esquelético é um tecido de grande capacidade adaptativa (plasticidade), composto de fibras musculares e células satélites rodeadas de matriz extracelular, que é capaz de alterar suas características para atender às diversas demandas funcionais^{1,2,3}. Essa adaptação é causada, em sua maioria, pela sobrecarga mecânica imposta às fibras (necessidade funcional) que resultam num aumento de síntese proteica, aumentando a área da fibra muscular e consequentemente a massa muscular⁴. O aumento do tamanho da fibra é conhecido como hipertrofia e é necessária para permitir que o músculo atenda a demanda exigida no que diz respeito à geração de força⁴. Contudo, a hipertrofia causa um remodelamento da matriz extracelular, tanto no músculo quanto no tendão, no que diz respeito à organização, deposição e orientação das fibras de colágeno. Paralelamente ao aumento da massa há também o aumento do suprimento sanguíneo para garantir os nutrientes necessários para melhora da contratilidade da fibra muscular e funcionalidade^{5,6}.

Atualmente muitas pessoas estão procurando as academias para a prática de exercícios e musculação com o objetivo estético e melhora da qualidade de vida. Com esse aumento, cresce a predisposição ao risco de lesões por uma prática excessiva de atividade física e levantamento de pesos de maneira inadequada (sobrecarga aguda imposta ao músculo) ocasionando tendinopatias e até rupturas musculares e tendíneas⁴. Os trabalhos com LBP publicados pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram bons efeitos biomoduladores no tecido muscular incluindo a redução do infiltrado inflamatório e redução da mionecrose⁷, aumento das fibras de colágeno após 7 dias no modelo de criolesão⁸ e diminuiu a produção de colágeno após 7 dias quando irradiado previamente à lesão⁹. Baseado nestas idéias, utilizar o LBP durante o processo de hipertrofia muscular pode interferir temporalmente e na qualidade deste, auxiliando na organização das fibras de colágeno tendíneas, contribuindo, desta forma, para prevenir lesões e promover em menor tempo o retorno funcional de indivíduos que estejam em processo de reabilitação após

lesões e que estejam com perda de massa muscular ou de tendinopatias desenvolvidas por atletas com excesso de treinamento.

Além disso o estudo pode melhorar o entendimento da ação do LBP nas fases de remodelamento muscular e tendíneo durante o processo de hipertrofia compensatória.

1.1 Hipertrofia Compensatória

Estudos têm sido recentemente publicados tendo a sobrecarga como princípio fundamental de seus modelos experimentais^{1,2,3,10,12,13-18}. Dentre os modelos mais descritos em literatura para alterar a demanda funcional muscular, três recebem destaque e são: **(1)** o alongamento e imobilização^{19,20} **(2)** a compensação funcional, conhecida como sobrecarga funcional ou hipertrofia compensatória (HC) no qual há remoção de músculos sinergistas^{1,2,3,10,13-18,20-22} e **(3)** sobrecarga por meio de exercícios e treinamento²³.

O modelo de hipertrofia compensatória é bastante utilizado^{2,3,15,16,25,27} e descrito como o modelo que produz um aumento da massa muscular em menor tempo e que resulta em inúmeros mecanismos de adaptação celulares e moleculares, objeto de estudo de inúmeros trabalhos atuais^{1,2,3,10-13,18,26}.

1.2 Modelo de Sobrecarga Funcional: ablação dos músculos sinergistas

Vários são os modelos que causam uma hipertrofia muscular compensatória por sobrecarga e segundo diversos autores o modelo de ablação dos sinergistas induz uma hipertrofia intensa, sendo possível estudar estas respostas adaptativas no músculo envolvido em poucos dias. Este modelo consiste na remoção cirúrgica parcial ou total dos sinergistas de um determinado músculo com o objetivo de causar uma sobrecarga mecânica^{2,3,11,12,15,16,22}.

Em ratos, os músculos mais comumente estudados são: o tibial anterior, extensor digital longo, o sóleo e o plantar^{1,3,10-12,15-19,21,22}. Na década de 80 e 90 o modelo mais utilizado consistia na remoção do m. tibial anterior (*m. Tibialis anterior*) gerando sobrecarga no m. extensor digital longo (*m. Extensor digitorum longus*)¹⁵. Atualmente os músculos mais utilizados em modelos de hipertrofia compensatória são o m. Sóleo e o m. Plantar e os procedimentos

comuns para a indução da hipertrofia compensatória consistem na remoção do m. Gastrocnêmio (*m. Gastrocnemius*) em sua porção medial e lateral para sobrecarregar o m. Sóleo (*m. Soleus*) e o m. plantar (*m. Plantaris*) ou remoção do m. Gastrocnêmio e o m. Sóleo para sobrecarregar o m. Plantar. Apesar de apresentarem proximidade anatômica em ratos, estes músculos são distintos em sua arquitetura e bioquímica^{2,3,15-18,25}.

Sabendo-se que o músculo pode apresentar diferentes tipos de fibras (rápidas – tipo IIa, IIb, IIx/IId e lentas – tipo I)³⁰ autores justificam a escolha do músculo plantar para estudos adaptativos devido à sua constituição quanto aos tipos de fibras e suas várias possibilidades de adaptação (tipo I: $8 \pm 2\%$; tipo IIa: $19 \pm 3\%$ e tipo IIb/D: $74 \pm 4\%$)²⁵. Sendo o músculo plantar predominantemente composto por fibras IId, tem menor quantidade de mitocôndrias porque utiliza a via glicolítica para uma resposta mais rápida. Schuenke *et al.* (2011), compararam o percentual de fibras do músculo plantar depois da hipertrofia compensatória e sua mudança fenotípica e demonstraram um aumento nos tipos de fibras I e IIa e redução na IIx/D.

Os autores atribuem essa característica de adaptação do músculo plantar à constante ativação desse músculo na postura estática e sustentação do peso nos quadrúpedes que, por uma questão funcional e de sobrevivência, acabam utilizando este músculo para retomar a deambulação²⁵. A remoção cirúrgica dos músculos sinérgicos do movimento para o músculo plantar gera uma sobrecarga crônica funcional que provoca respostas de hipertrofia com adaptação rápida envolvendo massa, síntese de proteínas, sinalização e ativação de enzimas^{2,3,11,12,15-18,22}.

No entanto o cuidado especial desta técnica cirúrgica consiste em garantir a integridade neurovascular do músculo a ser sobrecarregado¹, pois, devido a sua localização, há necessidade de cuidados durante o procedimento de remoção dos músculos sinergistas de forma a preservar sua inervação e vascularização. A localização destes músculos aparece demonstrada na Figura 1.



Figura 1: Localização do músculo plantar (**PL**) em ratos. Adaptado e extraído de Zhang *et al.*, 2008 (**TA**: m. tibial anterior; **S**: m. Sóleo; **PL**: m. Plantar; **LG**: m. Gastrocnêmio lateral; **MG**: m. Gastrocnêmio medial).

O modelo de hipertrofia compensatória não reflete as mesmas adaptações crônicas induzidas por um treinamento de força. Uma das diferenças verificadas se refere ao conteúdo de colágeno que sofre um aumento mais evidente na situação da hipertrofia compensatória. Porém, este modelo proporciona uma rápida e evidente hipertrofia trazendo importantes contribuições para o entendimento de como a fibra muscular aumenta seu tamanho e como são ativados os mecanismos celulares e moleculares para este processo^{10,27}.

1.3 Mecanismos e Determinantes celulares e moleculares da Hipertrofia Compensatória: células satélites e fatores regulatórios miogênicos

A sobrecarga aguda imposta ao músculo promove um aumento maior da área de secção transversa da fibra muscular que resulta em significativo aumento da massa muscular (chegando a um aumento de 10% a 30% no corte transversal das fibras musculares^{11,25} e proporcional aumento do número de mionúcleos (núcleo da fibra muscular)²⁸⁻³⁰.

O domínio mionuclear poder ser definido teoricamente como uma determinada área de citoplasma controlada por um único mionúcleo¹⁰. Segundo Adams *et al.* (2002), a relação entre a quantidade de mionúcleos pode estar relacionada com a síntese proteica e com a incorporação de novos mionúcleos advindos das células satélites^{11,25,26}. As células satélites (CS) são conhecidas como células residentes miogênicas mononucleadas quiescentes, situadas

entre o sarcolema e a membrana basal das fibras musculares, que são ativadas durante processos de regeneração e sobrecarga funcional. Uma vez ativadas, a CS saem do seu estado quiescente e seguem uma sequência de eventos que incluem: a) proliferação; b) diferenciação e migração e a c) fusão com a fibra adulta ou formação de nova fibra ^{17,18,25,26}(Figura 2).

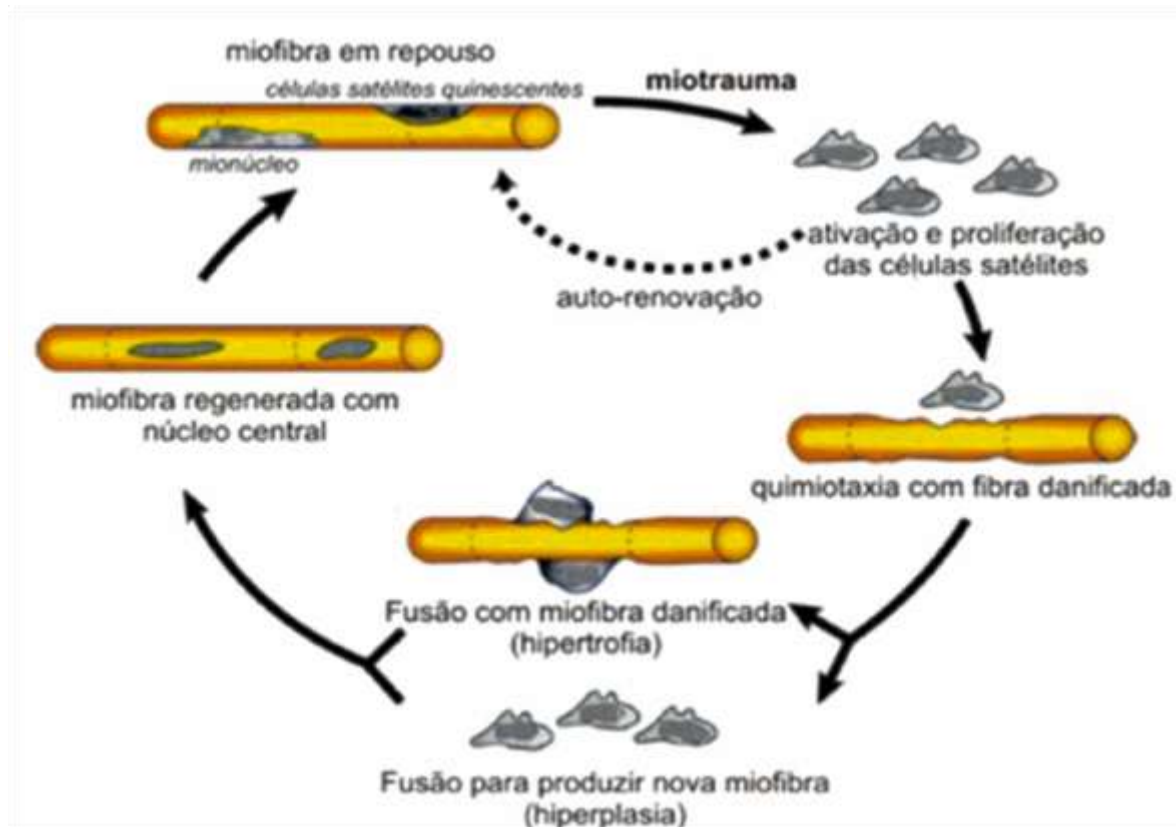


Figura 2: Imagem extraída e adaptada de *Hawke and Garry (2001)*, mostrando a proliferação e diferenciação das células satélites durante o mecanismo de hipertrofia.

A cascata reguladora de proliferação e diferenciação das CS tem sido cada vez mais estudada, pois estes processos relacionam-se diretamente e influenciam no aumento da área de secção transversa da fibra muscular como resultado do aumento da síntese proteica e ativação das CS para adaptar o tecido muscular à uma sobrecarga aguda²⁹.

Há controvérsias sobre a real participação das CS durante a hipertrofia compensatória uma vez que estudos demonstram que na ausência destas células houve aumento do tamanho da fibra^{3,30}. No entanto, o modelo de ablação dos sinergistas causa imediata proliferação e fusão de CS com consequente aumento do número de mionúcleos como demonstrado por Schiaffino *et al.* (2013) (Figura 3).

O estudo de Schiaffino *et al.* (2013) demonstrou que o músculo esquelético tem a capacidade de ativar dois mecanismos de hipertrofia: com e sem envolvimento das CS. As CS são ativadas quando um estímulo agudo está envolvido, ou seja, remoção de músculos sinergistas ou depois de exercícios excêntricos de alta intensidade, condições estas onde alguma forma de lesão muscular ocorre. Em contraste, em situações de exercícios mais graduais ou a recuperação após a atrofia muscular, não há ativação destas células bem como sua fusão.

O estudo com esse modelo provoca então uma sobrecarga aguda mimetizando a situação de hipertrofia numa condição: a dos atletas que realizam exercícios excêntricos e de alta intensidade. O músculo tem que responder rapidamente ao estímulo e ao seu aumento de massa para obter o melhor desempenho funcional, ativando então as CS.

Nas diferentes etapas que antecedem a hipertrofia, as CS expressam fatores regulatórios miogênicos que controlam as fases de ativação, proliferação e diferenciação celular. Os fatores regulatórios miogênicos (FRMs) são proteínas que pertencem à família dos fatores transcricionais músculos específicos “basic helix-loop-helix”(bHLH). Desta família fazem parte o MyoD, Miogenina, Myf5 e MRF4^{11,18,25,30}. Algumas citocinas (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-15) e fatores de crescimento (HGF, VEGF, FGF, IGF-1, TGF- β) são capazes de modular a expressão dos fatores regulatórios miogênicos.

Durante a hipertrofia muscular, as CS ativadas passam a expressar marcadores miogênicos como o MyoD e a Miogenina. Descrito primeiramente em 1987, o MyoD está relacionado com a proliferação das CS sendo considerado um excelente marcador para células ativadas e encontrado em elevados níveis em músculos durante processos de remodelamento.

Já a miogenina induz a diferenciação dos mioblastos em miócitos, que posteriormente se fundem para formar os miotubos²⁷. É conhecido que a ação do MyoD e da Miogenina são regulados pelos fatores de crescimento.

Os fatores de crescimento são aqueles que auxiliam o crescimento e a diferenciação das células musculares durante o processo de hipertrofia. Durante esse processo há um aumento de IGF-1 e esse aumento influencia diretamente a regulação da proliferação de CS por meio de aumento da síntese

proteica, inibição da produção de miogenina e modulação da expressão de MyoD^{11,25} (Figura 3).

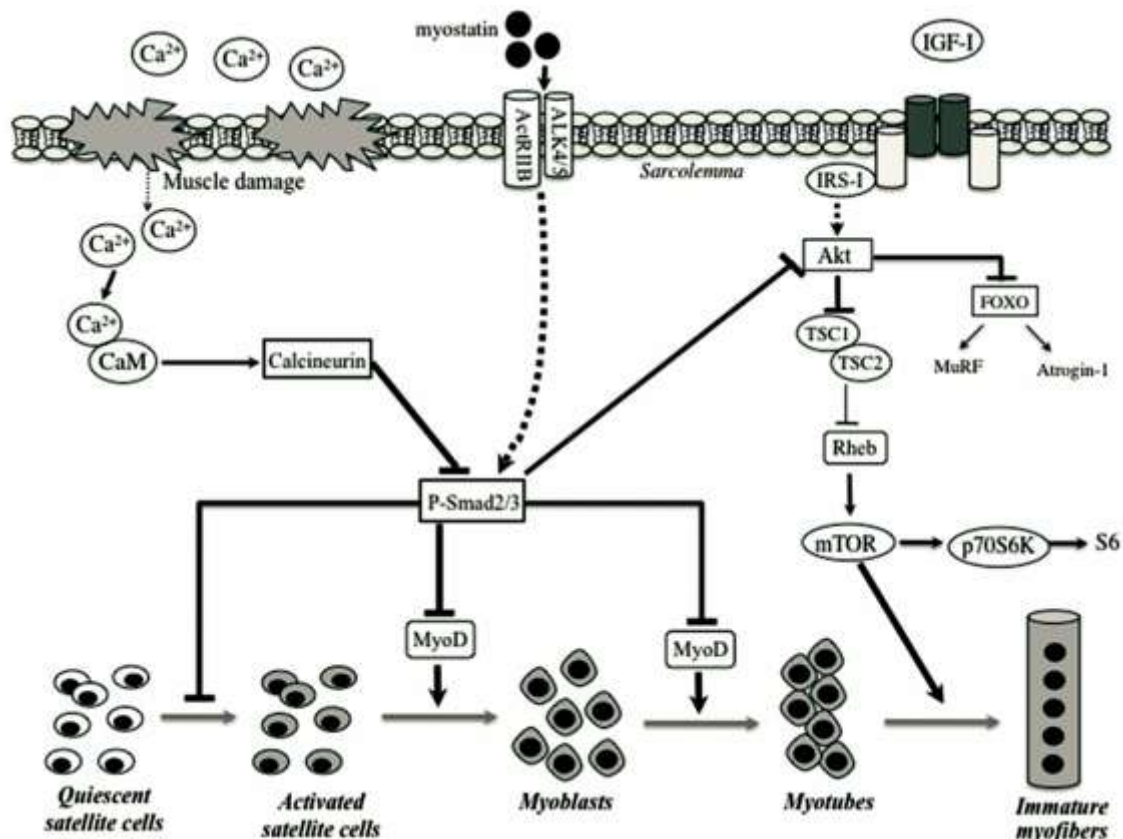


Figura 3: Processos e cascatas de sinalização e síntese proteica na ativação e proliferação de células satélites. (Extraído de Sakuma & Yamaguchi, 2012).

Como resultado, há um controle para que as CS proliferem mas não se diferenciem. Por outro lado em situações prolongadas de exposição ao IGF-1, há um aumento da miogenina facilitando a diferenciação, que pode ser o caso da hipertrofia compensatória como demonstram alguns autores (Adams *et al.*, 1999; Schuenke *et al.*, 2011; Sakuma & Yamaguchi, 2012), pelo fato de a sobrecarga ser aguda e da necessidade imediata de uma resposta celular.

Em contrapartida ao IGF-1 que estimula a proliferação das CS, a Miostatina (membro da família dos fatores TGF- β) inibe o ciclo de progressão e reduz os níveis de FMRs controlando a proliferação. Para determinar a função biológica da miostatina, camundongos *Knockouts* para este gene foram usados e como resultado os animais sem miostatina ficaram com a massa muscular

significativamente maior que a dos animais controles, definindo o papel da miostatina como um importante regulador negativo da hipertrofia muscular²⁹⁻³².

1.4 Angiogênese e hipertrofia muscular

Outro fator de crescimento que merece destaque no contexto da hipertrofia compensatória é o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) que regula a angiogênese durante este processo. O VEGF é um fator de crescimento derivado de fatores placentários liberado quando o tecido no adulto é lesionado, pois nessa situação há perda da homeostase do suprimento de oxigênio e alteração do metabolismo celular. Este fator de crescimento é um dos maiores reguladores da função das células endoteliais induzindo a migração e proliferação destas^{33,34}.

A angiogênese tem sido estudada por diversos autores³³⁻³⁵ por estar envolvida no remodelamento de redes capilares em situações no adulto como o reparo tecidual após processos inflamatórios, remodelamento muscular e processos tumorais. A angiogênese é regulada a partir de uma cascata de eventos da qual o componente essencial é a migração de células endoteliais dos capilares para a matriz extracelular³⁴. Recentes estudos³³⁻³⁵ sugerem que o endotélio vascular é suportado por gradientes de mobilização que são determinantes para definir a direção do crescimento vascular e fatores de adesão celular para a formação de novos vasos. Para este processo, participam componentes como o TGF- β e o VGEF, que aumentam a atividade de metaloproteinases (MMPs), facilitando a degradação da MEC para a invasão celular (pericitos). Então a MEC fornece o suporte para o brotamento e formação do lúmen vascular e os principais componentes envolvidos seriam: colágeno, fibrina, fibronectina e vitronectina³⁶. Segundo Senger & Davis (2011) os mecanismos e vias do suporte que a MEC oferece às células endoteliais ainda não estão totalmente claros.

Na hipertrofia compensatória a demanda metabólica aumenta e a necessidade de aumento da vascularização local muscular também para suprir as necessidades de um músculo que apresenta agora fibras musculares maiores devido à sobrecarga funcional.

1.5 Matriz extracelular (MEC) e fibras de colágeno muscular e tendíneas

Durante o processo de hipertrofia compensatória também ocorre intenso remodelamento da matriz extracelular (MEC) para atender as modificações decorrentes deste processo. Segundo Senger & Davis (2011) os mecanismos e vias do suporte que a MEC oferece durante a hipertrofia ainda não estão totalmente claros.

O colágeno é a principal proteína constituinte desta matriz e vital para a integridade e determinação da função muscular, podendo ser no tecido muscular do tipo I, III e IV. O colágeno do tipo I é encontrado no tecido conjuntivo denso (epimísio) promovendo resistência e estabilidade mecânica ao tecido sendo encontrado em abundância nos tendões⁹. O colágeno do tipo III é abundante no tecido conjuntivo frouxo (perimísio) e tem importante função elástica⁸. Já o colágeno do tipo IV está presente em abundância na membrana basal auxiliando no remodelamento e arranjo tecidual e parece estar envolvido com a transmissão da força do músculo para o tendão durante a hipertrofia muscular³⁶. Segundo Kannus (2000), a organização dessas fibras de colágeno IV são diferentes em todo seu trajeto (que se inicia ainda no tecido muscular e se prolonga até a inserção óssea) e podem estar dispostas paralelamente ou com arranjos cruzados. As mudanças na orientação, organização e deposição das fibras colágenas parecem estar relacionadas com a sobrecarga imposta pelo músculo e com o remodelamento após lesões, sendo também importantes fatores mecânicos na prevenção de lesões como rupturas tendíneas e tendinopatias^{5,6}. Por isso a correta distribuição das fibras colágenas são necessárias para melhor funcionalidade do tecido muscular e prevenção de lesões.

1.6 Laser de Baixa Potência (LBP)

1.6.1 Aspectos gerais

O LBP é considerado um recurso terapêutico muito usado e que tem um efeito fotobiomodulador em diversos tecidos e em diversas condições clínicas e experimentais é capaz de induzir o aumento da proliferação celular³⁷ e de induzir a neoangiogênese *in vitro*³⁸ e *in vivo*³⁹ minimizando danos causados

pela isquemia do tecido. Existem diversos tipos de lasers e entre os mais usados encontram-se na porção óptica do espectro vermelho e infravermelho (400 a 780 nm e 780 a 1mm) sendo seus fótons de energia inferiores a 2,0 elétron-volt (eV) e, portanto, inferiores à energia da ligação das moléculas biológicas e do DNA, não havendo a quebra de ligações químicas e desta forma, não sendo capazes de induzir mutação e carcinogênese³⁸.

O LBP é um recurso utilizado na prática clínica por seus efeitos biológicos, contudo estes dependem da combinação de diversos parâmetros. São eles: o comprimento de onda (λ) medido em nanômetros (nm), a irradiância ou intensidade (W/cm^2), a energia (J) que é a relação da potência com o tempo, a densidade de energia (J/cm^2) que é a relação da energia com a área irradiada, o tempo de tratamento e o intervalo de tratamento⁹. Além desses parâmetros o tipo de tecido pode influenciar na absorção da luz pelos cromóforos existentes nas células. A ação da irradiação laser nos tecidos consiste na absorção da luz (fótons) pelos fotorreceptores localizados nas células, que são capazes de modular as reações bioquímicas e fotoquímicas específicas dentro da célula e estimular uma série de reações intracelulares, resultando em uma aceleração da transferência de elétrons em partes da cadeia respiratória ocorrendo assim à síntese de ATP⁴⁰. Os principais cromóforos estão no interior das mitocôndrias, local onde as reações de transferência de elétrons ocorrem num processo denominado cadeia mitocondrial respiratória. Essa alteração no metabolismo mitocondrial e ativação da cadeia respiratória aumentam a produção de superóxido O_2 , diretamente relacionado com o estado metabólico da mitocôndria ^{42,43}. Essa via tem sido amplamente estudada para melhorar o entendimento dos efeitos e da absorção da luz na modulação da atividade celular⁷ e na hipertrofia muscular a mitocôndria aparece como a organela chave que envolve a adaptação metabólica da fibra muscular durante a sobrecarga.

Outro efeito observado descrito na literatura acerca do LBP seria o bifásico ou Lei de Arndt-Schultz que demonstra que o comportamento celular pode ser diferente dependendo da dose aplicada e do tempo avaliado, ou seja, a mesma dose utilizada inicialmente pode provocar uma resposta celular diferente da observada em longo prazo com a mesma dose sendo isso observado principalmente em experimentos *in vitro*⁴².

Os efeitos positivos do LBP em várias condições patológicas musculoesqueléticas e vários efeitos positivos foram identificados, tais como modulação da resposta inflamatória e mionecrose^{7,8,9}, fatores de crescimento⁴¹, síntese e distribuição de colágeno^{7,8,9}, remodelamento da matriz extracelular (MEC)⁷ e angiogênese^{8,38}.

A modulação da resposta inflamatória foi demonstrada por Alves *et al.* (2014) que utilizaram os mesmos parâmetros dosimétricos do presente estudo para irradiar o tibial anterior após lesão muscular aguda induzida por criolesão. Seus resultados revelaram uma redução do infiltrado inflamatório e mionecrose após 1 dia da lesão, um aumento do número de vasos sanguíneos e fibras imaturas após 3 dias e um aumento da atividade de MMP-2 após 7 dias. Outro estudo conduzido por Souza *et al.* (2011) avaliaram os efeitos do LBP vermelho 660nm (potência de saída de 20mW, densidade de energia de 5 J/cm², 10s de exposição e dose de energia de 0,2 J) no remodelamento do colágeno durante a o processo inflamatório após lesão após este mesmo modelo de lesão aguda. Seus resultados demonstraram um aumento do número de vasos novos (angiogênese) e redução da mionecrose em 7 dias no grupo laser. Quanto ao colágeno, em 7 dias houve aumento da deposição sugerindo que o laser induziu a síntese desta proteína.

Uma revisão de literatura realizada por Alves et al. (2014) demonstraram que diversos autores utilizaram comprimentos de onda entre 660-808nm, potências de saída de 20-40 mW e densidades de energia de 5-10J/cm² e obtiveram resultados semelhantes no que diz respeito aos efeitos do LBP no processo inflamatório e reparo no músculo esquelético após 7 dias.

Uma vez que o LBP tem demonstrado interferir diretamente na atividade mitocondrial^{42,43} é possível que este recurso favoreça de alguma forma o processo de hipertrofia compensatória uma vez que durante esse processo há um aumento na quantidade de DNA mitocondrial e de fatores de transcrição que controlam genes mitocondriais ⁴². Como hipótese, no presente trabalho, o LBP poderia interferir na hipertrofia compensatória uma vez que esta depende da atividade mitocondrial.

Na literatura não há relatos sobre o efeito direto do LBP sobre o processo de hipertrofia compensatória utilizando este modelo experimental.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar os efeitos do LBP infravermelho (780nm) sobre os aspectos morfológicos do complexo músculo-tendíneo do músculo plantar de ratos durante o processo da hipertrofia compensatória (*In vivo*) e estudar seus efeitos sobre células endoteliais humanas (*in vitro*).

2.2 Objetivos Específicos

O presente trabalho teve como objetivos específicos:

- Realizar uma revisão sistemática da literatura sobre hipertrofia compensatória para delimitar a metodologia do estudo (artigo 1 submetido para a Revista da Associação Médica Brasileira - RAMB).

- *In vivo*

Estudar a influência do LBP sobre:

- Os aspectos morfológicos: massa muscular, área de secção transversa da fibra (AST), mionúcleos e quantidade de vasos sanguíneos (artigo 2 publicado no *Proceedings SPIE*) após a irradiação com LBP,
- A distribuição e organização do colágeno no tecido muscular e no tendão (artigo 3 em processo de submissão para a Revista *Lasers in Surgery and Medicine*)

- *In vitro*

Estudar o efeito da irradiação com LBP sobre:

- Viabilidade de células endoteliais humanas (*Human umbilical vein endothelial* - Huvecs),
- A formação de vasos.

3 MÉTODOS

O estudo foi realizado no laboratório de pesquisa do Programa de Mestrado e Doutorado em Biofotônica aplicada em Saúde utilizando metodologia de acordo com as normas internacionais de ética na experimentação animal (National Research Council, 1996) e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisas Animais da Universidade Nove de Julho – UNINOVE (AN007/2013) (vide carta de aprovação anexo 1).

O estudo foi dividido em experimentos realizados *In vivo* e *In vitro*.

Para a delineamento do estudo *in vivo* foi realizada uma revisão sistemática da literatura sobre o modelo de hipertrofia compensatória, incluída no artigo 1 submetido para a Revista da Associação Médica Brasileira - RAMB, como demonstrado na Figura 4.

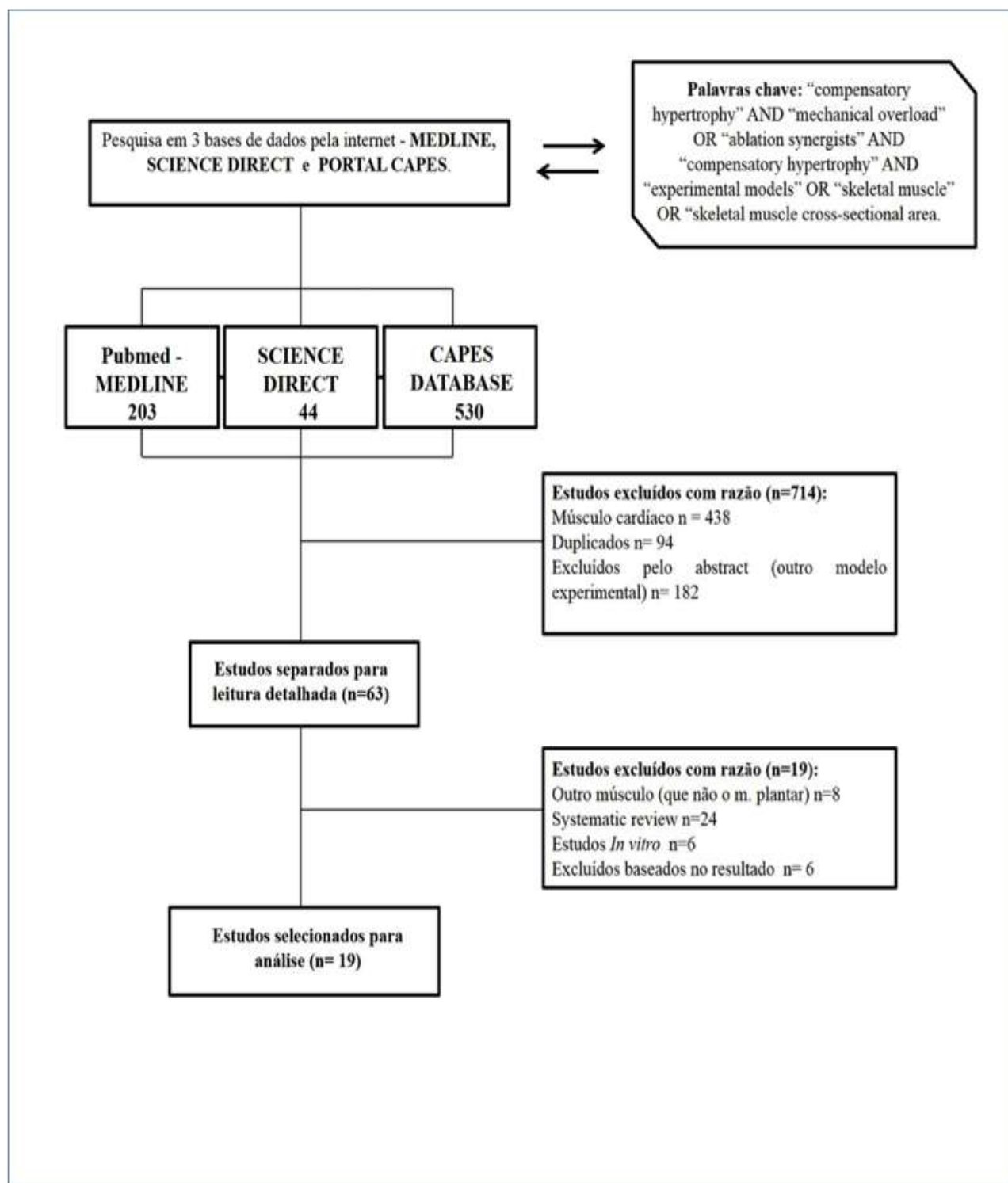


Figura 4: Fluxograma do processo de seleção da literatura. Extraída do artigo submetido à Revista da Associação Médica Brasileira (RAMB) (Terena *et al.*, 2015).

Com base na seleção da literatura e com os resultados obtidos o protocolo e os grupos experimentais foram estabelecidos. A metodologia descrita a seguir gerou os resultados dos artigos 2 e 3.

3.1 *In vivo*

3.1.1 Animais

Para o presente estudo foram utilizados ratos Wistar, mantidos em biotério da UNINOVE em caixas apropriadas, temperatura ambiente (22° C), umidade relativa (40°C) e luminosidade controlada com ciclo de 12 horas e ração e água *ad libitum*.

3.1.2 Grupos experimentais

Os animais foram divididos aleatoriamente em grupos, sendo que cada grupo corresponde à uma das pata traseiras do animal pois a cirurgia foi bilateral. A pata direita (sem irradiação) e a pata esquerda (com irradiação).

I. **Grupo Controle (C):** os animais não foram submetidos a nenhum procedimento cirúrgico nem irradiação com LBP (n=4/ 2 animais). Foram eutanasiados após 1 dia após a cirurgia dos outros grupos.

II. **Grupo Hipertrofia (H):** os animais foram submetidos à ablação dos músculos sinergistas do músculo Plantar. Não houve irradiação com LBP e foram eutanasiados após 7 e 14 dias (n=20/ 10 animais).

III. **Grupo Hipertrofia + irradiação laser (H+LBP):** os animais foram submetidos à ablação dos sinergistas e neste grupo foi realizada a irradiação (n=20/ 10 animais). Os animais foram eutanasiados após 7 e 14 dias.

O número total de animais utilizados neste estudo foi de 22 ratos, pois as duas patas traseiras de cada animal foram utilizadas. O músculo da pata traseira direita faz parte do grupo II e o músculo da pata traseira esquerda foi a que sofreu a irradiação e faz parte do grupo III. A decisão de realizar a cirurgia bilateralmente, assim como a análise após 7 e 14 dias, foi baseada no resultado obtido na revisão sistemática do artigo 1 que será descrito no capítulo dos resultados.

A irradiação com LBP foi imediata à cirurgia, e seguiu-se até o 7º e 14º dias subsequentes, quando então foi realizada a eutanásia dos animais de cada grupo respectivamente. Os animais foram filmados para seu acompanhamento e verificação da integridade neural de forma a permitir a movimentação adequada para o aumento da sobrecarga objetivada.

3.1.3 Procedimento cirúrgico

O modelo da hipertrofia utilizada no presente estudo consiste na remoção cirúrgica dos músculos sinergistas do m. Plantar, bilateralmente, impondo uma sobrecarga de trabalho funcional para esse músculo. Esta técnica cirúrgica foi usada inicialmente por Gutmann & Schiaffino & Hnazlikova (1971), descrita por Tsika (1995) e utilizada por McCarthy *et al.*, 2010, Gordon *et al.*, 2012; Terada *et al.*, 2012.

Os animais foram pesados e anestesiados com injeção a base de Ketamina 10% (0,2/100g do animal) e Xilazina 2% (0,1/100g do animal). Para aplicação da anestesia foram utilizadas seringas da marca BD 100 Unidades com Agulha BD Ultra-Fine®, modelo insulina com a agulha Ultra-Fine® (regular), comprimento: 12,7 mm, calibre: 0,33 mm e bisel trifacetado. Em seguida foi realizada a tricotomia seguida da incisão longitudinal na região dorsal da pata traseira de ± 2 cm e exposição do m. Gastrocnêmio. Seus tendões foram isolados e seccionados para permitir a remoção parcial do músculo. O mesmo procedimento foi realizado para o m. Sóleo, com cuidado para não causar lesões em nervos e vasos sanguíneos (Figura 5). O músculo Plantar situado abaixo dos músculos removidos sofreu a sobrecarga funcional e foi analisado posteriormente.

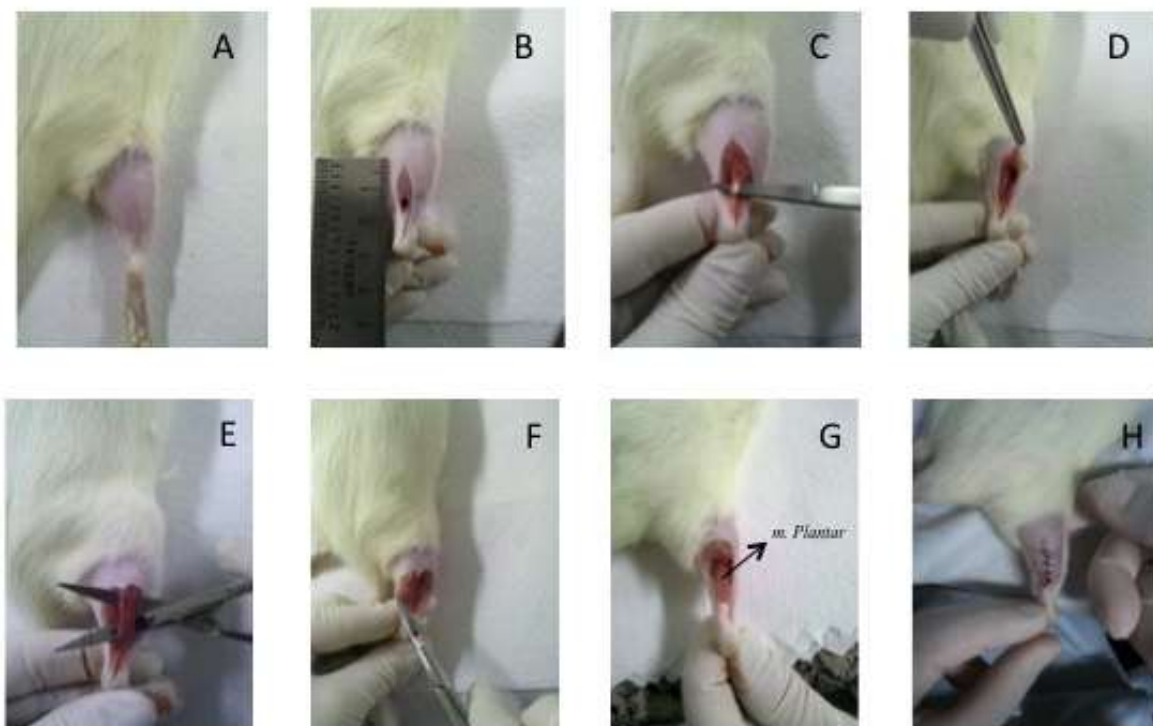


Figura 5: Procedimento cirúrgico de ablação dos sinergistas para a hipertrofia do músculo plantar. (A) tricotomia da região posterior da pata traseira; (B) incisão de 2 cm; (C) exposição e secção do tendão do m. gastrocnêmio lateral (D) retirada parcial do ventre muscular do m. gastrocnêmio lateral; (E) m. Sóleo – retirada total; (F) retirada parcial do ventre muscular do m. gastrocnêmio medial; (G) isola-se o m. Plantar; (H) realização de sutura.

3.1.4 Irradiação com Laser de Baixa Potência (LBP)

Imediatamente após a cirurgia e todos os dias que se seguiram, os animais foram irradiados com LBP com os seguintes parâmetros^{7,8,9,41,46} ($\lambda = 780$ nm, com potência de saída de 40 mW e área do feixe de $0,04 \text{ cm}^2$ (TwinLaser, MMOptics, São Carlos, Brasil), dose de 10 J/cm^2 por ponto, por 10 segundos cada ponto⁷. A irradiação foi unilateral (pata esquerda). O equipamento e os parâmetros da irradiação utilizados estão na Figura 6.



Meio ativo	AsGaAl
Comprimento de onda	780 nm
Frequência do laser	contínuo
Potência de saída	40 mW
Densidade de potência	1 W/cm ²
Área do feixe	0,04 cm ²
Densidade de energia	10 J/cm ²
Energia por ponto	0,4 J
Energia por tratamento	3,2 J
Tempo de irradiação	80 s
Pontos irradiados	8

Figura 6: Equipamento utilizado na irradiação e os parâmetros utilizados.

Para a irradiação, os animais foram contidos manualmente e aplicada a técnica pontual diretamente sobre a pele que recobre o procedimento cirúrgico, na região da incisão e ao redor da área com 8 pontos (Baptista et al., 2011; Alves et al., 2013). Para evitar refração do feixe do laser foi utilizado para a aplicação o ângulo de 90° entre o emissor e a pele do animal (Figura 7). A potência de emissão da luz do laser foi aferida utilizando o “LaserCheck power meter” (MM Optics – São Carlos – SP – Brasil).



Figura 7: Procedimento de irradiação LBP sobre a região correspondente ao músculo plantar. (8 pontos)

3.1.5 Coleta do material

Após o período experimental de cada grupo (7 e 14 dias) os animais foram eutanasiados por overdose de anestésicos (2x a dose aplicada) e os músculos plantares foram retirados, pesados em balança de precisão com três casas decimais e utilizados para as análises descritas logo abaixo. As amostras foram armazenadas em formol tamponado 10% em PBS 1X (pH 7,4).

Foram também removidos os tendões dos músculos plantares e estes congelados.

3.1.6 Análise histológica muscular e do colágeno

Para o processamento histológico, os músculos foram fixados durante 24 horas em formol tamponado conforme descrito acima. Os tecidos foram desidratados em soluções com concentração crescente de álcool etílico (70%, 80%, 90%) num período de 90 minutos cada, passados três vezes em álcool absoluto e três vezes em Xilol (Reagen). A impregnação e inclusão em parafina foram efetuadas em duas incubações durante 1 hora a 60°C. Os músculos seccionados foram incluídos e emblocados. Posteriormente os cortes colocados em lâminas de microscopia previamente limpas, foram mantidos em estufa a 37°C durante 12 horas e submetidos às colorações histológicas de hematoxilina e eosina (HE).

Os cortes histológicos corados com HE foram avaliados por microscopia de luz convencional (microscópio Axioplan 2 Zeiss, Alemanha). A análise qualitativa e quantitativa incluiu uma descrição inicial dos achados da hipertrofia compensatória, envolvendo a análise da área de secção transversa dos feixes de fibras musculares (perímísio), ausência de fatores inflamatórios (edema) e células inflamatórias, contagem de vasos sanguíneos maduros e contagem de mionúcleos (todos os núcleos do campo histológico). Foram analisados três campos de cada corte com um aumento da objetiva de 40x. As imagens foram analisadas pelo software ImageJ (National Institute of Health - NIH, EUA) e por avaliadores cegos. A imagem foi aberta com o software e então com a ferramenta de contorno, com base no perímísio, foi calculada.

Para a análise das fibras colágenas musculares, cortes adicionais foram corados com *Picrosirius Red* (Sigma, St. Louis, MO, EUA), seguindo o método descrito por Junqueira et al. (1982) e foram examinados com o microscópio de luz polarizada Pol-Interferencial Photomicroscope (Modelo 61282, Carl Zeiss, Alemanha). As imagens também foram analisadas pelo programa ImageJ (National Institute of Health - NIH, EUA).

A primeira análise foi em relação ao percentual da área de colágeno em relação ao campo. Foi utilizada a inversão de cores pelo processo *Binary/Make*

binary. Em seguida o percentual da área de colágeno em relação ao campo analisado foi obtido por meio da opção “Analyse”. A segunda análise foi o percentual da área entre os feixes das fibras musculares por meio da opção “*Binary/Threshold /black and White*”. Para isso foi realizada a inversão de cores pelo processo *Binary/Make Binary* utilizando o *Threshold black and white* para a análise da área marcada em preto que corresponderia a esta distância⁵⁰.

A terceira análise foi a quantificação da área dos tipos de colágeno utilizando o plugin WCIF ImageJ em *Colour function/Colour Deconvolution*. Foram selecionadas as cores vermelha e verde representando respectivamente as fibras e fibrilas^{44,45,49,50}. Para esta análise cada imagem foi aberta e a opção foi pelo “Plugins/Colour functions/Colour deconvolution” seguida da opção “from ROI” para a escolha das cores vermelho, verde e preto. Cada cor foi delimitada na imagem para ser iniciado o processo de quantificação e então foi escolhida a opção Image/Adjust/Threshold. O threshold foi selecionado automaticamente intensificando os tons de vermelho conforme descrito por Ruifrock et al. (2001) e Hadi et al. (2011). O algoritmo utilizado pelo threshold neste plugins é baseado no algoritmo que foi descrito por G. Landini (<http://www.dentistry.bham.ac.uk/landini/software/software.html>). Uma vez aplicada a transformação da cor da imagem pelo RGB (Red Green Blue), os espectros de cor luz são interpretados pelo computador como porcentagem de pixels. Uma vez escolhida as cores vermelho, verde e preto, o preto representa a ausência destas cores. Quando o plugin evidencia a cor vermelha demarcada, o threshold aplicado automaticamente já entende que os pixels que deve quantificar são diferentes da área preta, calculando somente a área dos pixels que apresentem a cor vermelha na imagem. E da mesma forma ocorre para a cor verde. Por isso o fundo preto faz parte desta análise e deve estar totalmente escuro para não comprometer a análise do threshold. (Figura 8).

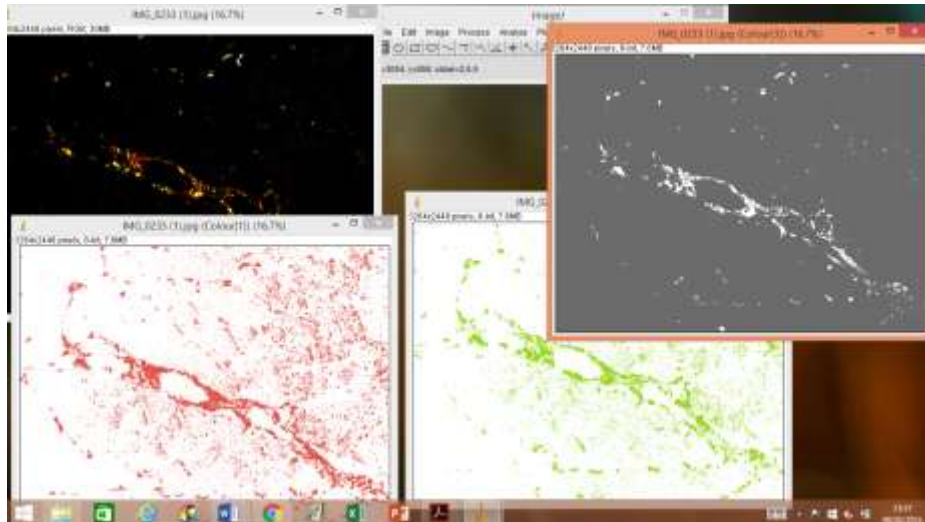


Figura 8: *Print Screen* do processo de análise dos tipos de colágeno usando o plugin *Colour Deconvolution* do software ImageJ.

Para análise da organização das fibras colágenas tendíneas, os tendões foram retirados, congelados e posteriormente os cortes histológicos feitos no criostato. Para realizar a birrefringência as lâminas foram silanizadas e não foi utilizado parafina, pois como esta é um material birrefringente pode gerar um retardo óptico alterando o resultado.

Foi utilizado o microscópio modelo 61282 (Zeiss, Alemanha), equipado com o compensador de resolução $\lambda/4$. A utilização deste compensador é mais simples porque a leitura do retardo óptico, em graus, é direta. A lâmina foi posicionada em 45° na plataforma do microscópio e um componente óptico (lente) usado para deixar passar somente o comprimento de onda de 546nm. Foram anotados os ângulos em que apareciam a fibra num tom de verde vibrante.

Em seguida os ângulos obtidos foram transformados em comprimentos de onda segunda a fórmula abaixo:

$$L \cdot \Delta n = \frac{\alpha}{180} \cdot \frac{\lambda}{4}$$

Onde $L \cdot \Delta n$ é o retardo óptico, α é o ângulo lido no microscópio, λ é o comprimento de onda 546 nm. Tal equação é fornecida pelo fabricante do compensador, no caso, a Zeiss.

Substituindo λ por 546nm, o retardo óptico torna-se:

$$L \cdot \Delta n = \alpha \cdot 0,758 \text{ nm}$$

Isto é, para converter o ângulo lido em nanômetro, bastou multiplicá-lo por 0,758. Os valores transformados dos ângulos passam a ser lidos em nanômetros. Quanto maior o comprimento de onda mais organizada e paralela está a fibra de colágeno.

3.2 *In vitro*

A metodologia descrita a seguir gerou os resultados que estão sendo utilizados para a elaboração do artigo 4.

Os experimentos *in vitro* foram realizados em Portugal, em colaboração com a Universidade do Porto, no departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina dentária, sob orientação da Profa. Dra. Maria Helena Raposo Fernandes.

As células utilizadas foram as células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVECS). As células foram mantidas 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. O sobrenadante foi removido, as células 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 4 minutos a 37°C. Após incubação foi realizada nova lavagem com meio, centrifugação a 1200 rpm a 20°C por 5 minutos e posteriormente ressuspensão em 1ml de meio de cultura. A viabilidade celular foi avaliada por contagem com corante vital azul de Trypan (0,4%) e foram utilizadas nos ensaios as culturas com viabilidade maior que 95%.

Os estudos foram efetuados em culturas celulares estabelecidas com uma densidade celular de 1x10⁴ células/poço. Para o tratamento com LBP foi utilizado o mesmo equipamento descrito anteriormente. Os parâmetros da irradiação foram: comprimento de onda de **780nm**, potência de saída de **40mW**, densidade de energia de **1, 5, 10 e 20 J/cm²**. As irradiações foram realizadas em tubos de centrifugação contendo os precipitados celulares,

sendo de baixo para cima na extremidade inferior dos tubos (Mesquita-Ferrari et al., 2011) (Figura 9). Os experimentos foram realizados num ambiente com obscuridade parcial para não sofrer interferência da luz externa. As células do grupo controle sofreram a mesma manipulação, mas não foram irradiadas.



Figura 9: Procedimento de irradiação LBP na região do tubo após centrifugação.

3.2.1 Grupos experimentais

Os grupos foram:

- I. Células não irradiadas: as células foram manipuladas e centrifugadas da mesma maneira que as dos outros grupos porém não sofreram irradiação;
- II. Células irradiadas com 1 J/cm^2
- III. Células irradiadas com 5 J/cm^2
- IV: Células irradiadas com 10 J/cm^2
- V: Células irradiadas com 20 J/cm^2

O tempo foi calculado para cada um dos grupos de forma que todas as células, mesmo irradiadas com fluências diferentes tivessem recebido a mesma dose de energia.

3.2.2. Viabilidade celular (atividade mitocondrial) (MTT)

Para determinar a viabilidade e a atividade mitocondrial foi utilizada uma técnica indireta (ensaio de redução do MTT). A técnica MTT avalia a viabilidade celular através da clivagem de anéis de tetrazólio do MTT, formando cristais azuis escuros de formazana, os quais são impermeáveis às membranas

celulares, ficando, então, retidos no interior das células viáveis (Mosmann 1983, Löster & Horstkorte, 2000). A posterior lise celular faz com que estes sais de formazan sejam liberados. O número de células viáveis é diretamente proporcional ao nível de cristais de azul de formazan formados.

Para os ensaios, após a irradiação com LBP, as células endoteliais (1×10^4 /poço) foram incubadas em placas de cultura de fundo chato de 96 poços (TPP) mantidos em meio de cultura. A viabilidade celular foi avaliada após 1, 3, 6 e 10 dias.

Após o período de cultivo foi realizada lavagem com 200µL de PBS 1X. Em seguida, foram adicionados 50µL de MTT (0,5µg/mL em tampão) (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue – SIGMA) e realizada uma incubação de 3h a 37°C em estufa de CO₂.

Terminado o tempo de incubação, esta solução foi removida cuidadosamente e adicionados 100µl de Isopropanol para ressuspender e solubilizar o precipitado. Por fim, foi realizada a leitura da absorbância a 620nm com auxílio de um leitor de placas (2020, Anthos, Eugendorf, Áustria) (Mosmann 1983).

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

3.2.3 Proteína Total

A proteína total foi quantificada para a análise funcional da viabilidade celular comparada ao MTT. Para esta análise foi utilizado o Método Lowry. O meio de cultura foi removido da placa e cada poço lavado duas vezes com PBS 1X. Foi adicionado 100µl de Triton X-100 0,1% e incubado por alguns minutos à temperatura ambiente. Após raspar o fundo de cada poço foi recolhido 2ml deste volume e colocado num *eppendorf*. Adicionou-se 150µl de reagente fenol e após misturar no vórtex os *eppendorfs* ficaram incubados por 1 hora, no escuro e temperatura ambiente. A leitura foi feita num espectrofotômetro ((2020, Anthos, Eugendorf, Áustria) a 750nm.

3.2.4 Matrigel

A formação vasos foi avaliada cultivando as células endoteliais na superfície de uma matriz extracelular: o Matrigel (BD Matrigel™ Basement Membrane Matrix, 5ml vial, Biosciences). O Matrigel é uma matriz gelatinosa proteica que se assemelha ao complexo meio extracelular de muitos tecidos. Quando em contato com esta matriz, as células endoteliais organizam-se em estruturas típicas de tipo tubular formando vasos.

Os poços de cultura de placas de 24 poços foram cobertos com Matrigel (diluição 1:1 com meio de cultura) sob o gelo. Após solidificação da matriz de Matrigel, as células endoteliais (1×10^4 /poço) de todos os grupos foram semeadas (24 horas após a irradiação) na superfície e colocados 200 μ l de meio. Após 18 horas, as culturas foram fotografadas para avaliação da capacidade de formação de vasos⁵¹.

3.2.5 Análise Estatística

Os dados obtidos foram analisados pelo software Bioestat 5.0 (PA, Brasil). O teste para verificação da normalidade foi de Shapiro-Wilk. Os dados com distribuição paramétrica foram submetidos ao teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey para a comparação entre os grupos.

Os níveis de confiança foram para 95% ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 Artigo 1

Systematic review of the synergist muscle ablation model for compensatory hypertrophy

Terena SML, Fernandes KP, Bussadori SK, Deana AM, Mesquita Ferrari RA
Em avaliação - Revista da Associação Médica Brasileira - RAMB
(ANEXO 2)

Após a realização do processo de seleção da literatura (como descrito nos métodos) uma tabela foi criada baseada nos critérios de inclusão e exclusão (Tabela 1).

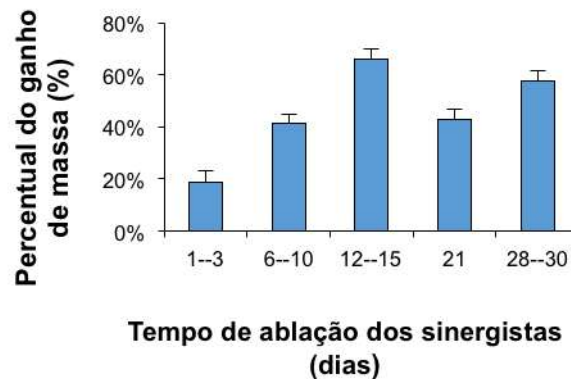
Article	Ablation of synergists	Study design	Data collection	Outcomes (compared to control)
Adams <i>et al.</i> (1999)	Unilateral	Plantar mass Rat body mass	6,12,24 and 48 h 3,7 and 12 days	12 d body mass (g) (226 ± 5 to 257 ± 6) muscle mass (mg/g) (1.07 ± 0.02 to 1.73 ± 0.18)
Dunn <i>et al.</i> (1999)	Bilateral	cross-sectional area of muscle	7,14 and 28 days	28 d cross-sectional area increased 75% compared to control
Bodine <i>et al.</i> (2001)	Bilateral	muscle mass	7,14 and 30 days	7 d muscle mass increased by 25% 14 d muscle mass increased by 38%
Adams <i>et al.</i> (2002)	Bilateral	cross-sectional area	6 and 24 h 3,7,15 and 90 days	90 d 46% increase in cross-sectional area of muscle fibers
Lee <i>et al.</i> (2003)	Bilateral	muscle mass	1,3,7 and 21 days	1 d increased by 10% 3 d increased by 31% 21 d increased by 21%
Yamaguchi <i>et al.</i> (2003)	Unilateral	cross-sectional area	3 and 14 days	14 d Increased by 43.3 ± 3.8%
Sakuma <i>et al.</i> (2000)	Unilateral	muscle mass	1,2,3,4,6,8 10, 14 and 28 days	1 d increased by 56% 3 d increased by 40,9% 6 d increased by 31.3 % 10 d increased by 44.8 % 14 d increased by 46.8% 28 d increased by 76.2%
Pehme <i>et al.</i> (2004)	Bilateral	muscle mass	14 days	14 d increased by 40%
DiPasquale <i>et al.</i> (2007)				3d

	Bilateral	cross-sectional area	1,3,5 and 14 days	increase in peak edema in 3 days no statistical difference in cross-sectional area of muscle in 3 days
Marino et al. (2008)	Bilateral	cross-sectional area Peak edema	3,7 and 14 days	3 d statistical difference in cross-sectional area of muscle * retention of 90% water 7 d 5% increase in cross-sectional area of muscle retention of 70% water 14 d 21% increase in cross-sectional area of muscle retention of 45% water
Novack et al. (2008)	Bilateral	Plantar mass peak edema	1,3,5 and 14 days	14 d 80% increase in muscle mass peak edema in 5 days
Huey et al. (2010)	Bilateral	relative and absolute plantaris muscle	12 h,1,2,3 and 7 days	7 d relative mass increased by 15% absolute mass increased by 21%
Pavaresh et al. (2010)	Bilateral	absolute and relative mass	3 and 7 days	3 d absolute mass increased by 10% relative mass increased by 18% 7 d absolute mass increased by 21% relative mass increased by 20%
Goodman et al. (2011)	Bilateral	cross-sectional area	7 and 14 days	14 d increased by 30%
Schuenke et al. (2011)	Bilateral	cross-sectional area	28 days	28 d increased by 35% in young rats increased by 21% in older rats
Goodman et al. (2012)	Bilateral	cross-sectional area	10 days	10 d 1000 ± 60 vs. 2000 ± 200 (µm ²)
Gordon et al. (2012)	Bilateral	muscle mass	1 and 3 days	1d increased by 48 ± 9% (m± SD) 3 d increased by 73 ± 17% (m± SD)
Bentzinger et al. (2013)	Unilateral	muscle mass	7 and 28 days	7 d increased by 90% 28 d increased by 120%

Table 1: Estudos selecionados para a revisão incluindo a hipertrofia compensatória no músculo plantar com a quantificação da área de secção transversa (AST) e/ou massa muscular.

Em seguida à análise dos dados da literatura, a utilização deste modelo de hipertrofia compensatória demonstrou uma progressão linear do percentual de ganho, sendo que nos primeiros 15 dias há um aumento significativo da massa muscular (37,8% por semana) como demonstrado na Figura 10.

A



B

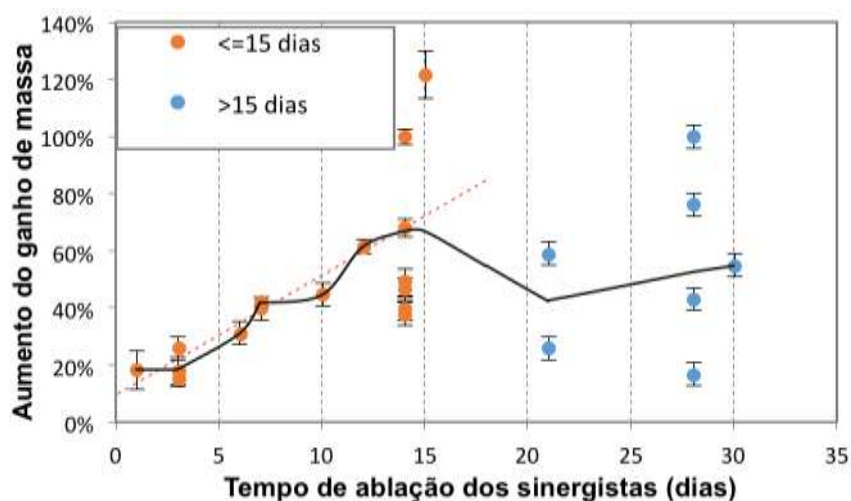


Figura 10: Gráficos demonstrando o ganho de massa muscular com o modelo de hipertrofia compensatória. Em (A) o agrupamento de resultados obtidos pelos autores baseados em (B) que demonstra os resultados individuais por estudo analisado.

Os dados foram agrupados baseados no tempo decorrido da ablação e percentual do aumento da massa do músculo plantar com a propagação do erro (Figura 10 B). A linha de tendência (—) revela uma progressão linear (---) até 15 dias com estabilização desta progressão acima deste período. O período mais usado pelos autores foi 14 e 28 dias, ambos apresentando um

effect size alto (1.15 e 1.39 para 14 e 28 dias respectivamente) mostrando que existe diferença entre eles.

Os dados então foram agrupados baseados no período de ablação e aumento do ganho de massa (Figura 10 A) demonstrando que o maior período de percentual de aumento do ganho de massa está entre 12 e 15 dias e este foi o período utilizado pela maioria dos autores.

De acordo com a distribuição dos dados e valores para p mais altos que o nível de significância ($p=0.2996$ para 14 dias e $p=0.2584$ para 28 dias) não houve diferença entre a ablação bilateral e unilateral nos dois períodos. O teste foi limitado aos dados da literatura.

4.2 Artigo 2

Effects of low level laser in the morphology of the skeletal muscle fiber during compensatory hypertrophy in plantar muscle of rats.

Terena SML, Fernandes KP, Bussadori SK, Alves AN, Mesquita Ferrari RA

Publicado em Proceedings of SPIE - International Society for Optical Engineering, v.9531, 2015 (ANEXO 3)

Os animais utilizados no estudo apresentaram peso corporal inicial de $242 \pm 13,5$ g não havendo diferença significativa quando comparado ao peso corporal final em todos os grupos experimentais.

Com relação ao peso do músculo plantar após a coleta, o peso médio foi de 223 ± 378 mg. Foi verificado um aumento significativo no grupo hipertrofia irradiado (H+LBI) após 14 dias quando comparado ao grupo somente hipertrofia no mesmo período ($*p < 0,05$). Os resultados permitiram também verificar um aumento significativo no peso do músculo plantar no grupo com hipertrofia não irradiado (H) após 14 dias em relação ao grupo controle ($**p < 0,01$) (Figura 11).

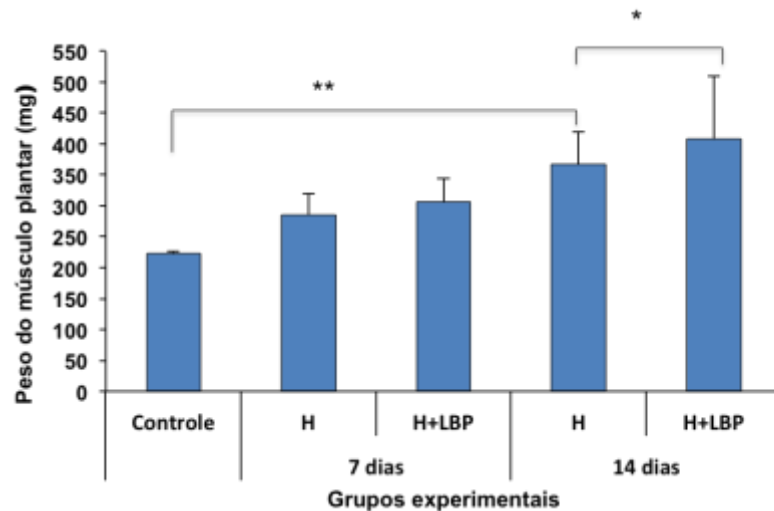


Figura 11: Gráfico do peso do músculo plantar entre os grupos experimentais. Os valores foram expressos em média e desvio padrão (ANOVA/Tukey). * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo não irradiado e ** $p < 0,01$ quando comparado ao grupo controle.

A análise morfológica por hematoxilina-eosina (HE) (Figura12) permitiu verificar que houve um significativo aumento da área de secção transversa das fibras musculares do grupo irradiado (H+LBP) quando comparado ao grupo não irradiado (H) após 14 dias (* $p < 0,05$). Houve diferença entre todos os grupos quando comparados ao controle.

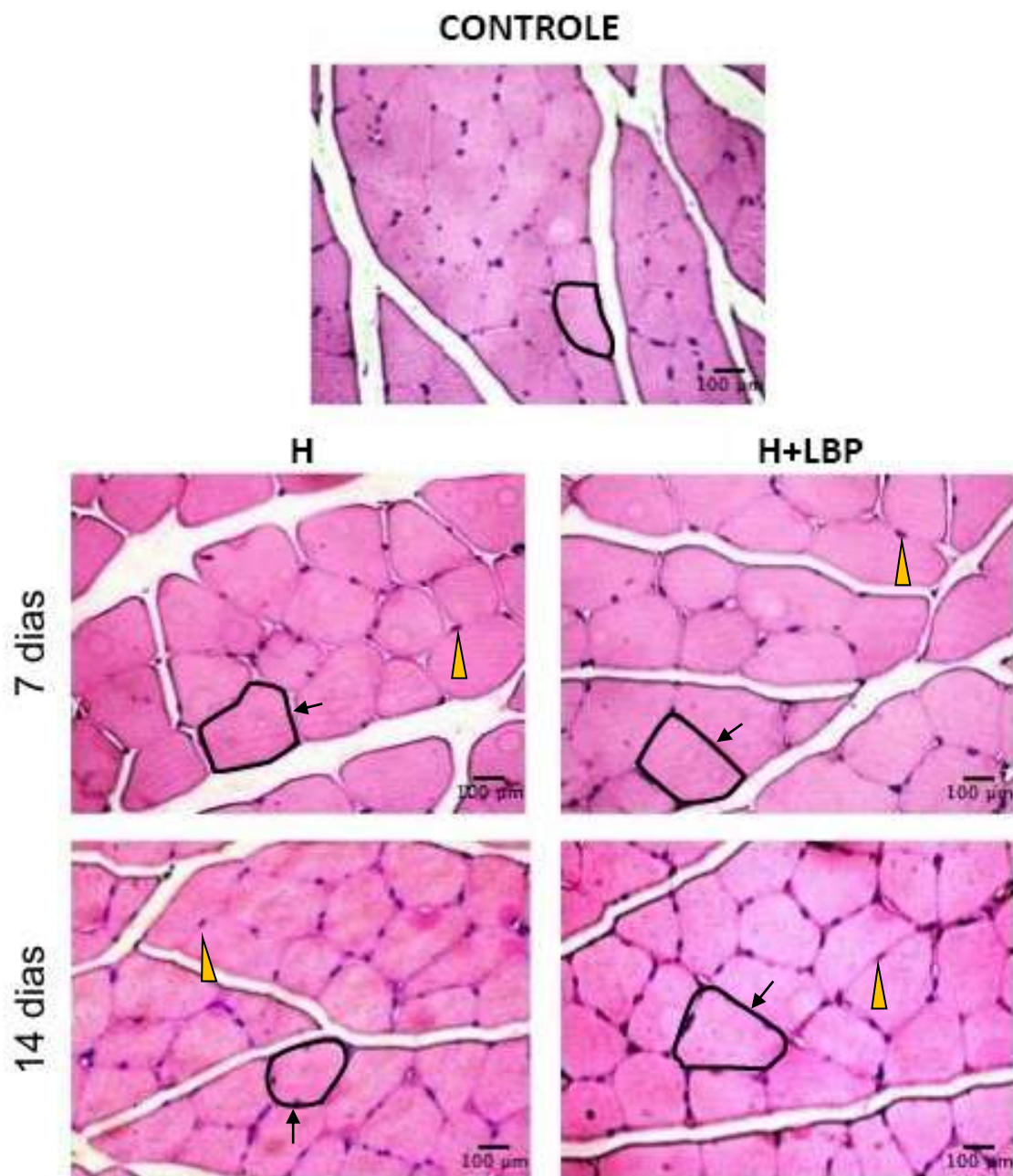


Figura 12: Cortes transversais das fibras musculares observados e fotografados no microscópio com objetiva 40x. A AST foi analisada pelo (perímio) representado em negrito marcado pela seta (↓). Mionúcleos representados por ▲

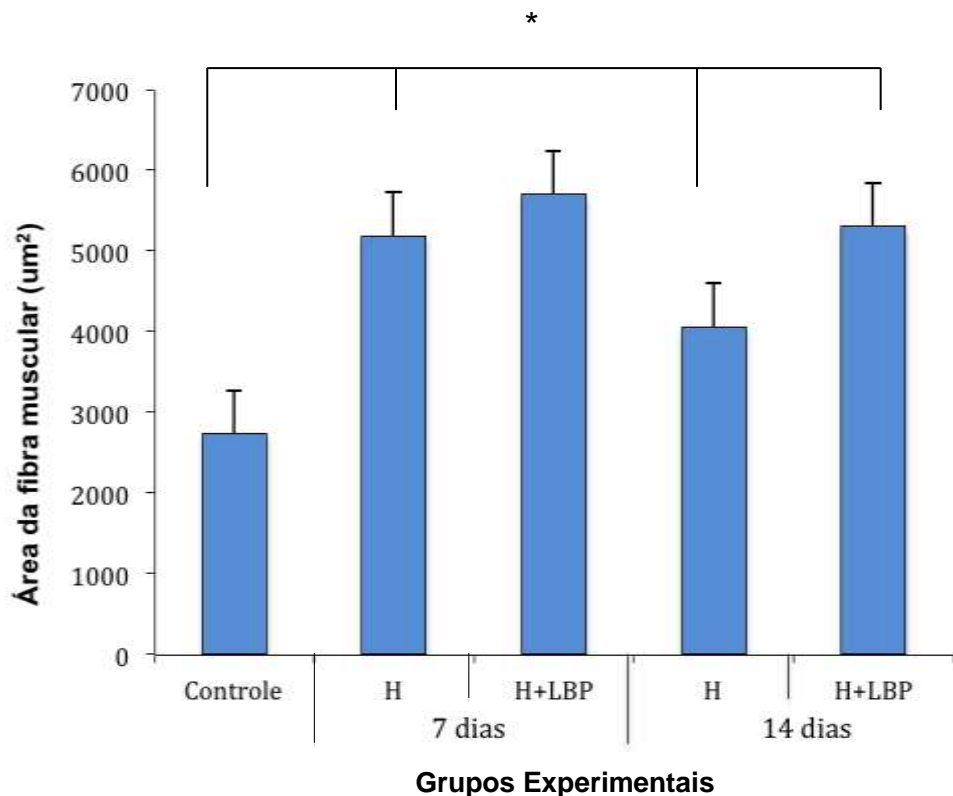


Figura 13: Comparação dos grupos em relação à área da fibra muscular medida pelo perímio. Os valores estão em média e desvio padrão (* $p \leq 0,05$). O aumento do grupo somente hipertrofia em 7 dias não representa edema uma vez que este é verificado somente até o quinto dia.

A análise da área da fibra muscular já foi descrita por McCarthy (2008) que relacionou o aumento da área entre os dias 5 e 7 (conforme vista no gráfico) ao edema da região. Por isso o declínio nos dias subsequentes.

4.3 Artigo 3

Infrared laser improves muscle and tendon collagen during compensatory hypertrophy
Terena SML, Fernandes KP, Bussadori SK, Teixeira DF, Magalhães EMR, Mesquita Ferrari RA
 em preparo para submissão.

A análise quantitativa da área do espaço entre os feixes musculares (Figura 14) dos cortes corados com HE, permitiu verificar no tecido muscular um aumento no grupo irradiado (H+LBP) quando comparado ao grupo não irradiado (H) e ao controle em 7 dias (* $p < 0,05$). Também permitiu verificar que houve uma diminuição do percentual da área do espaço entre os feixes no

grupo irradiado H+LBP quando comparado ao grupo não irradiado (H) após 14 dias (** $p<0,01$) (Figura 15). Esta análise conforme descrita anteriormente foi realizada utilizando o software imageJ com inversão de cores pelo *Threshold*.

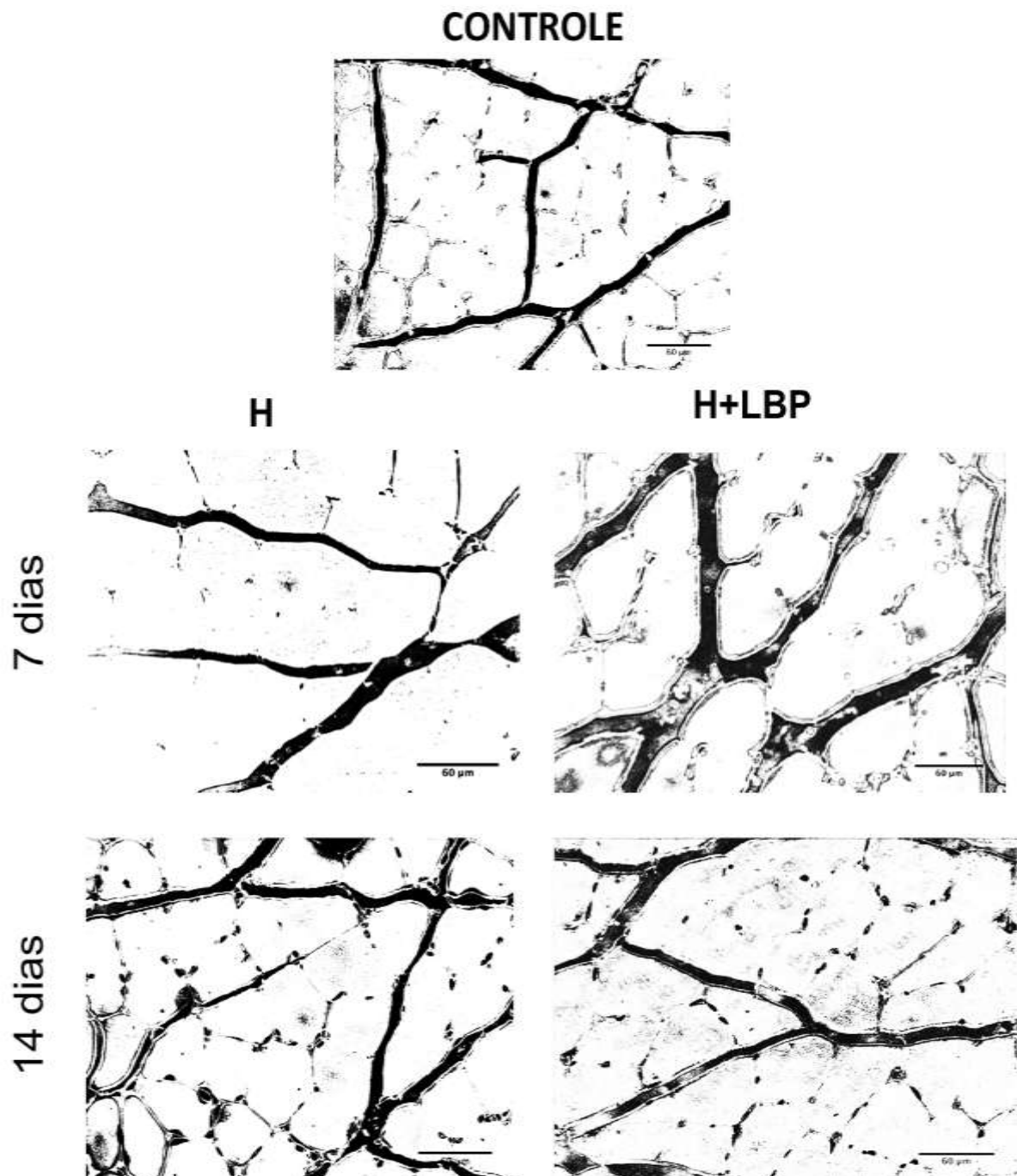


Figura 14: Fotomicrografias de lâminas coradas com HE com cortes transversais. (Objetiva 40x). Foi realizado a inversão de cores através do software imageJ (binary/threshold) para determinação da área do espaço entre os feixes musculares.

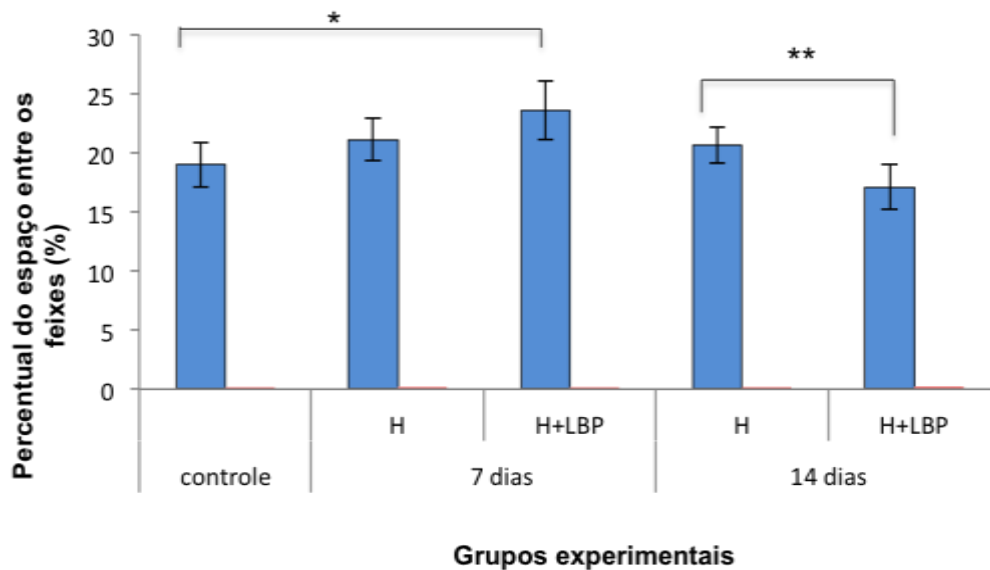


Figura 15: Quantificação da área do espaço entre os feixes musculares em porcentagem. Os valores foram expressos em média e desvio padrão (One Way ANOVA seguido do Dunn's test para comparação entre grupos). Para * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle e ** $p < 0,01$ quando comparado ao grupo não irradiado.

A análise (Figura 16) dos cortes corados com Picrosirius e fotografadas sob luz polarizada, permitiu verificar no tecido muscular uma redução da área do colágeno no grupo irradiado (H+LBP) em comparação grupo não irradiado (H) somente em 14 dias (* $p \leq 0,05$).

Nos demais períodos avaliados não houve diferença estatística entre os grupos que receberam ou não a irradiação. O efeito mostra-se positivo com esta redução da área do colágeno visto que seu aumento pode estar relacionado com fibrose diminuindo a flexibilidade, o que não é adequado funcionalmente.

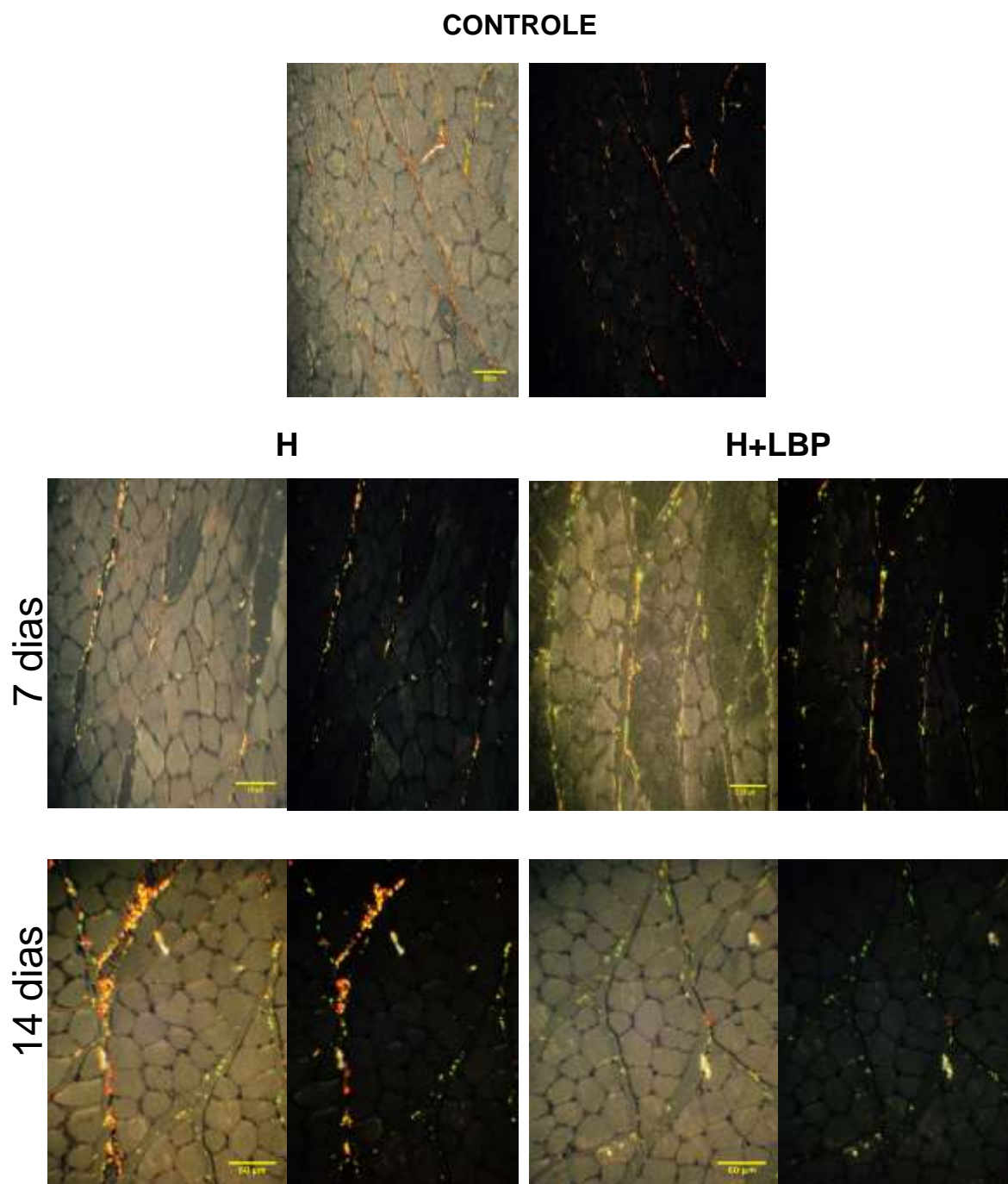


Figura 16: Fotomicrografia de cortes histológicos de tecido muscular corados com Picrosírius (objetiva 40x). Os valores foram calculados pela média e desvio padrão ($*p \leq 0,05$).

Os resultados da quantificação da área de total do colágeno muscular (expressa em μm^2) permitiram verificar que houve uma redução na área de colágeno no grupo irradiado (H+LBP) em relação ao grupo não irradiado em 14 dias ($**p < 0,01$). Também houve um aumento da área de colágeno no grupo não irradiado (H) após 14 dias em comparação ao controle ($*p < 0,05$).

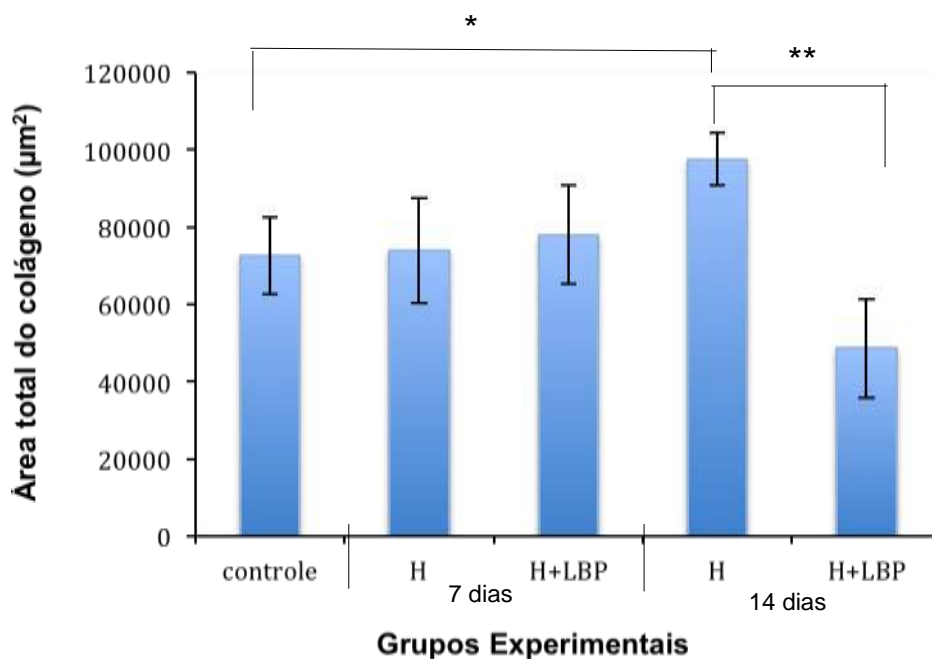


Figura 17: Quantificação da área total de colágeno muscular (µm²). Os valores foram expressos em média e desvio padrão (ANOVA/Tukey). Para $*p<0,05$ quando o grupo não irradiado (H) é comparado ao grupo controle e para $**p<0,01$ quando comparado ao grupo H+LBP.

Os resultados da separação de cores no software imageJ (Figura 18) permitiram verificar que as fibras de colágeno grossas (thick) - representados em vermelho - tiveram uma redução significativa tanto no grupo não irradiado (H) quanto no grupo irradiado (H+LBP) no período de 7 dias quando comparados ao grupo controle, enquanto que as fibras de colágenos mais finas (thin) - representados em verde - tiveram um aumento significativo para os mesmos grupos e no mesmo período ($*p<0,05$).

Foi verificado também que houve uma diminuição significativa tanto das fibras finas quanto das fibras grossas no grupo irradiado (H+LBP) quando comparado ao grupo não irradiado no período de 14 dias ($**p<0,01$).

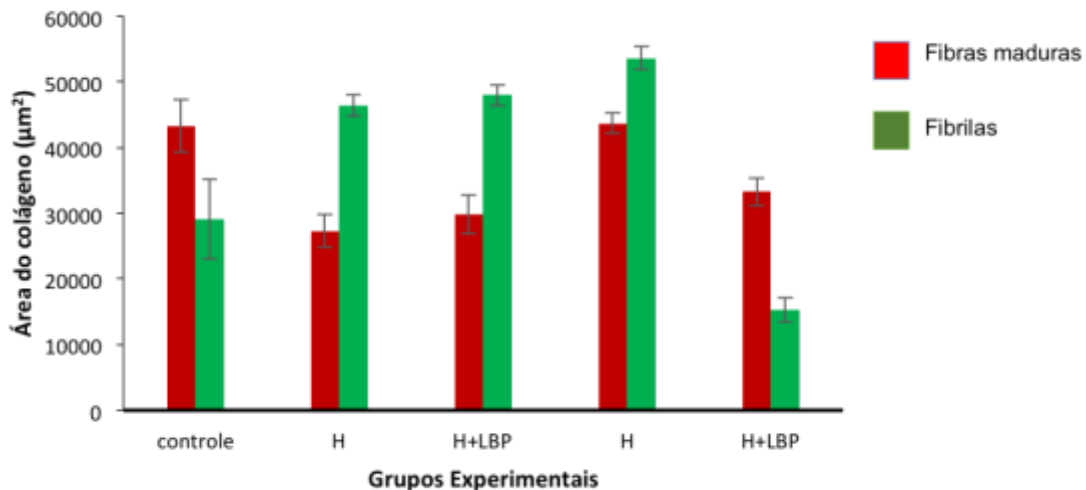


Figura 18: Quantificação dos tipos de colágeno muscular: as fibras maduras (colágeno do tipo I mais resistentes) representadas em vermelho e fibrilas (colágeno do tipo III mais elásticas) representadas em verde. Os valores foram expressos em média e desvio padrão (ANOVA/Tukey). Para $*p \leq 0,05$ quando o grupo não irradiado (H) é comparado ao grupo controle. Quando comparado ao grupo irradiado H+LBP) ($**p \leq 0,01$).

Os tipos de fibras de colágeno estão relacionados com a adaptação do músculo à demanda funcional. Segundo alguns estudos^{36,44,45,48}, a determinação e quantificação dos tipos de fibra colágena está relacionada com a elasticidade e força (resistência) muscular. As fibras do tipo I (caracterizada em vermelho) conhecidas como *thick collagen*, ou fibras maduras conferem ao tecido maior resistência por serem fibras mais grossas. Já as fibrilas (caracterizada em verde) está relacionada com a elasticidade muscular⁴⁵.

O resultado obtido sugere que o grupo irradiado com LBP após 14 dias teve um aumento na quantidade de fibras maduras quando comparado ao grupo somente hipertrofia.

A análise qualitativa da birrefringência do colágeno tendíneo mostra na figura 19 a melhora na organização das fibras nos grupos experimentais, representadas pelas setas e os círculos nas imagens.

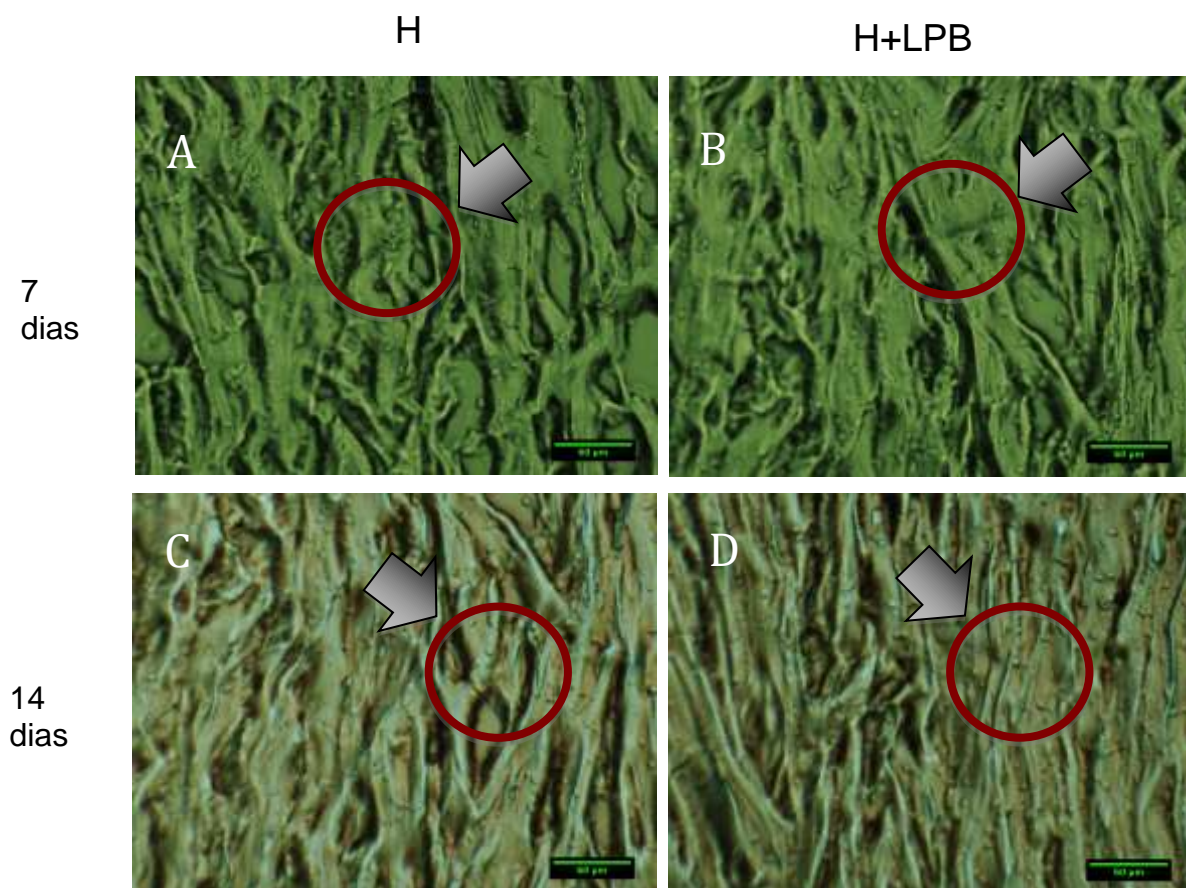


Figura 19: A análise qualitativa das imagens através da birrefringência em microscópio convencional de luz polarizada. No grupo irradiado (B), maior regularidade na organização das fibras do tendão do músculo plantar (mostrado pela seta e círculo) quando comparado com (A) grupo não irradiado no período de 7 dias. Após 14 dias, maior organização no grupo irradiado (D) do que em (C) grupo não irradiado. (Objetiva 40x).

Os resultados da birrefringência (Figura 20) permitiram verificar que houve um aumento da organização das fibras no tendão nos grupos irradiados (H+LBP) quando comparado aos grupos somente hipertrofia em ambos os períodos avaliados.

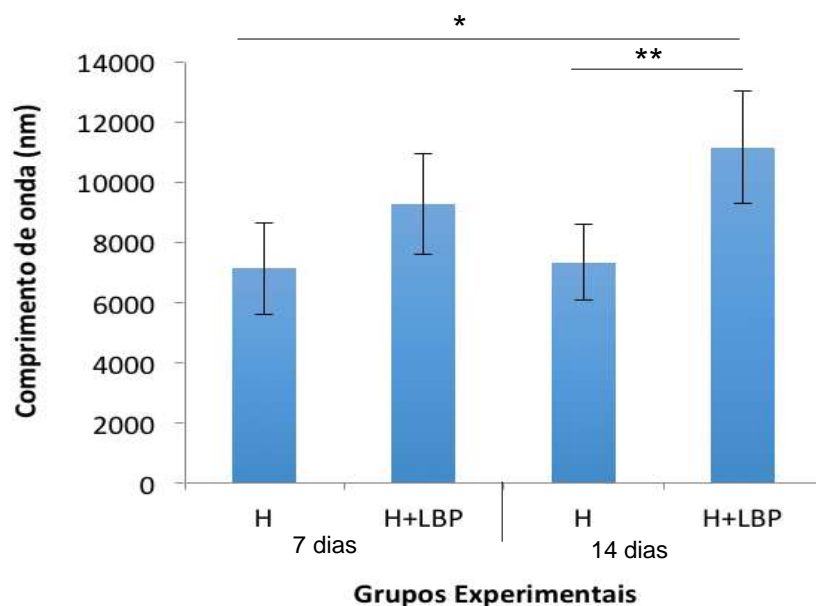


Figura 20: Quantificação da birrefringência do colágeno no tendão do músculo plantar. Dados em média e desvio padrão. Para * $p < 0,05$, quando comparado ao grupo controle e ** $p < 0,01$ quando comparado ao grupo não irradiado no mesmo período.

4.4 Dados em preparação para submissão

A seguir serão apresentados os dados *in vitro* e *in vivo* que não foram publicados, mas estão em preparação para publicação.

Foi realizada a contagem de mionúcleos, a partir do software imageJ e os resultados permitiram verificar que houve aumento do número de mionúcleos no grupo irradiado (H+LBP) em relação ao grupo não irradiado (H) após 14 dias ($p < 0,05$) (Figura 21).

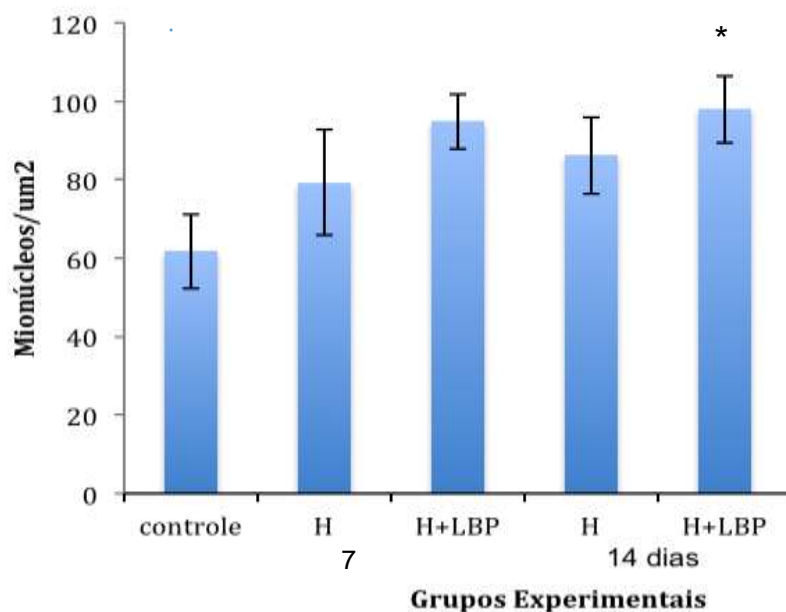


Figura 21: Quantificação do número de mionúcleos. Os valores foram expressos em média e desvio padrão (* $p \leq 0,05$).

Foi realizada também a contagem de vasos (Figura 22) que permitiu verificar que houve um aumento na quantidade dos vasos do grupo irradiado (H+LBP) quando comparado ao grupo não irradiado (H) em 7 dias ($p < 0,05$). Houve também aumento do número de vasos no grupo irradiado (H+LBP) comparado ao grupo não irradiado (H) em 14 dias ($p < 0,05$).

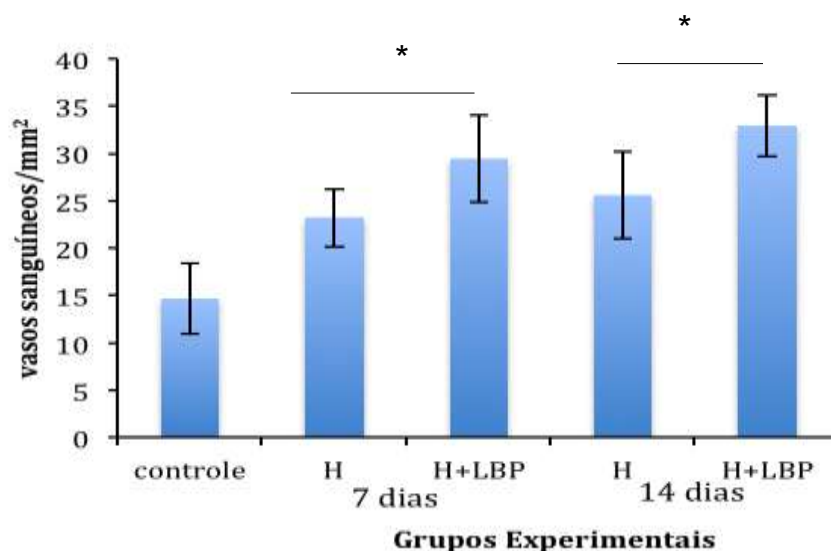


Figura 22: Quantificação do número de vasos (objetiva 10x, contados em 5 campos). Valores expressos em média e desvio padrão para * $p < 0,05$. Diferença entre o grupo irradiado quando comparado ao grupo somente hipertrofia em 7 e em 14 dias.

In Vitro

Os experimentos *in vitro* foram realizados com a colaboração da Prof^a. Maria Helena Raposo Fernandes na Universidade do Porto.

Os resultados da viabilidade permitiram verificar através do ensaio de MTT (Figura 23), que comparados os grupos irradiados com 1,5,10 e 20 J/cm² com o grupo controle ($**p<0,01$) o LBP interferiu na viabilidade celular das Huvecs. Os dados foram normalizados pelo controle assumindo este ser 100%.

Em relação ao percentual obtido, os resultados demonstraram que com a dose de 1J/cm² houve uma redução da viabilidade celular do terceiro ao oitavo dia, com um aumento no décimo dia ($**p\leq 0,01$). Já com dose de 5 j/cm² e 10 j/cm² houve uma redução significativa do segundo até o oitavo dia. Após 10 dias houve uma retomada na viabilidade celular com níveis próximos ao controle.

Em relação a dose de 20 j/cm² houve uma inibição inicial (segundo dia) com uma retomada da viabilidade no terceiro dia. Novamente uma diminuição da viabilidade no sexto até oitavo dia com uma retomada no décimo dia (aumento acima dos níveis do controle).

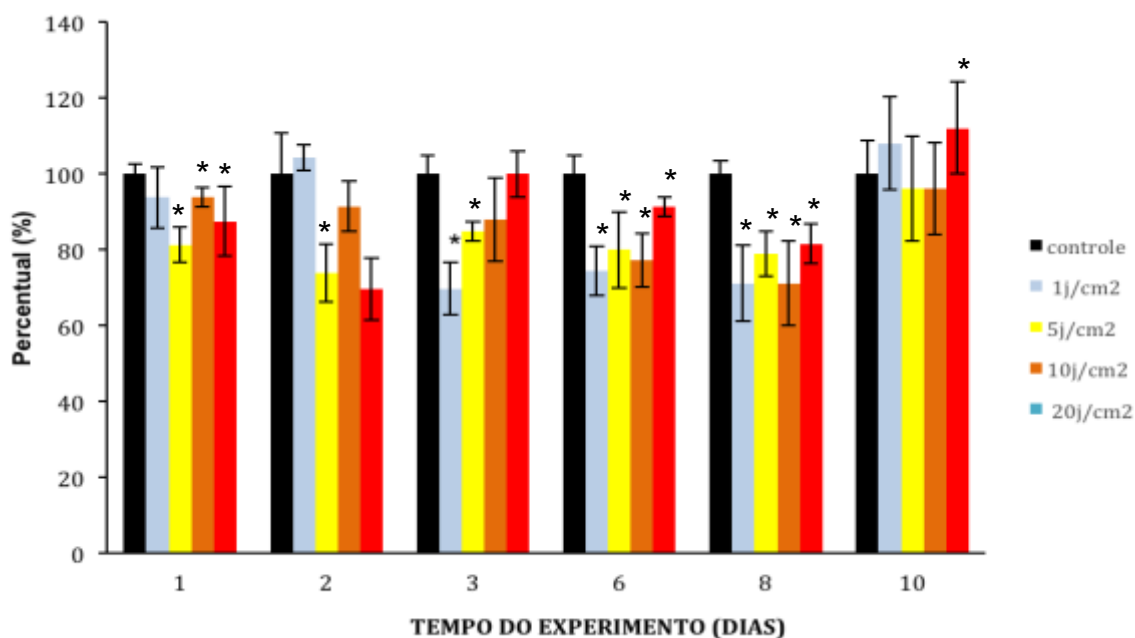


Figura 23: Viabilidade celular das Huvecs após irradiação LBP. Valores expressos em média edesvio padrão para $*p\leq 0,05$ quando comparado ao grupo controle e ($**p\leq 0,01$) quando comparados entre si.

Os resultados da concentração de proteínas totais (Figura 24) demonstram que na dose de 1J/cm² não houve alteração da concentração de proteínas até o sexto dia, seguido de uma redução no oitavo dia e aumento da quantidade no décimo dia (* $p \leq 0,05$). Com a dose de 5J/cm², os níveis proteicos tiveram um aumento no segundo dia, seguido de uma diminuição no terceiro dia, uma retomada no sexto dia e novamente uma diminuição no oitavo dia.

Com a dose de 10J/cm², a concentração proteica teve aumento significativo no segundo dia e redução no oitavo e décimo dia. Por fim, na dose mais alta (20J/cm²) os resultados demonstraram uma redução no terceiro dia, mantendo seus níveis até o oitavo dia com um aumento no décimo dia.

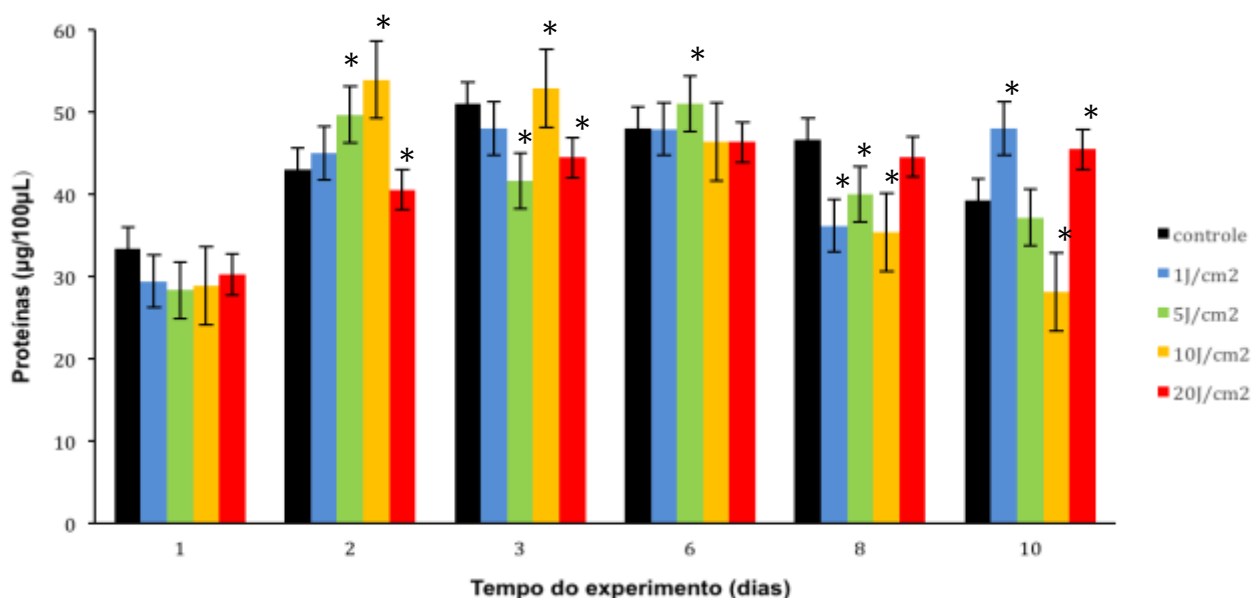


Figura 24: Concentração de proteínas totais nos grupos experimentais após irradiação LBP. Valores expressos em média e desvio padrão para * $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo controle.

A análise qualitativa do matrigel demonstrada na figura 25, evidencia que houve uma modulação da formação de estruturas tubulares pelo LBP especialmente na figura 25-C. Segundo Khoo et al. (2011) o matrigel é um dos métodos mais usados para se estudar a formação tubular das células endoteliais. Contudo sua quantificação apresenta análises diferentes entre diversos grupos de pesquisa o que acaba por tornar difícil a comparação com outros estudos.

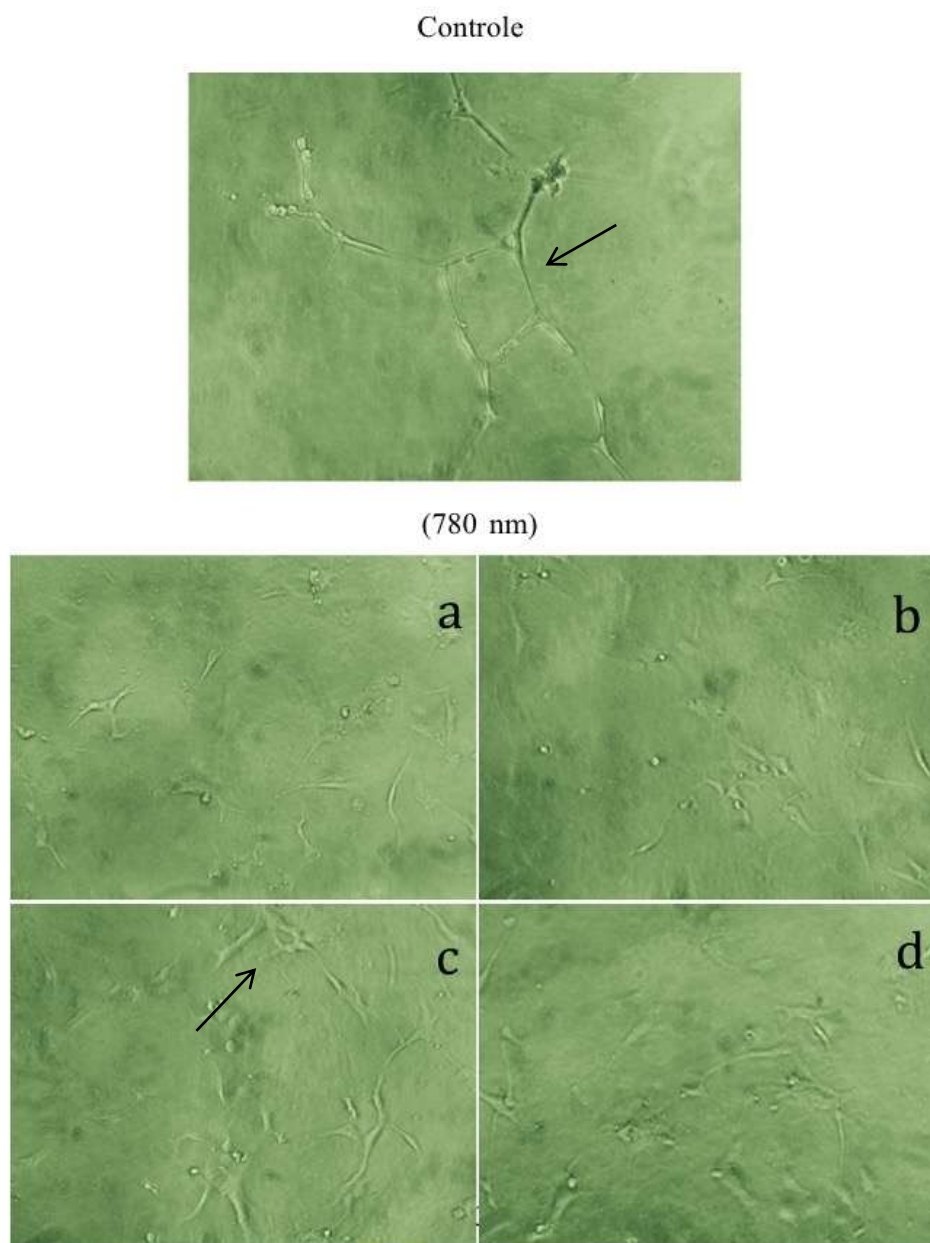


Figura 25: Análise qualitativa da formação d qualitativa do matrigel após 42 horas da irradiação LBP. A seta demonstra a sinalização para a formação da estrutura tubular que dará origem ao vaso. Em (a) irradiação com 1 J/cm^2 , (b) 5 J/cm^2 , (c) 10 J/cm^2 e em (d) 20 J/cm^2 . Fotografados após 48 horas após a irradiação com aumento de 40x. A seta indica a formação de estruturas tubulares na irradiação com 10 J/cm^2 .

5 DISCUSSÃO

O aumento da massa muscular é conhecido como hipertrofia e durante esse processo ocorrem modificações morfológicas na fibra muscular e consequentemente remodelamento não só no tecido muscular mas também nos tendões. Essa adaptação surge da necessidade do aumento de estruturas contráteis e do tecido conjuntivo para adequar os mecanismos de transmissão de força no sistema músculo tendíneo devido à sobrecarga funcional.

O modelo de ablação dos sinergistas utilizado no presente estudo induz uma hipertrofia muscular em poucos dias facilitando o estudo das respostas adaptativas musculares. O músculo mais estudado é o músculo plantar de ratos e os autores justificam esta escolha pela diversidade de tipos de fibras (Tipo I: $8 \pm 2\%$; Tipo IIA: $19 \pm 3\%$; Tipo IIB/D: $74 \pm 4\%$) e suas diferentes possibilidades de adaptação. A revisão sistemática desse modelo experimental (dados submetidos para publicação) permitiu verificar que o período de maior hipertrofia ocorre entre 10 e 14 dias e que a AST da fibra muscular também teve um aumento significativo neste mesmo período. A relação entre a AST, hipertrofia e tipo de fibra indica que a sobrecarga induziu diversas transformações na expressão de proteínas promovendo alterações na fibra muscular.

O presente trabalho trouxe resultados interessantes no que diz respeito às alterações morfológicas frente ao efeito do LBP aplicado durante o processo de hipertrofia compensatória. Um dos resultados demonstrou que o músculo plantar do grupo irradiado teve seu peso maior que o grupo não irradiado em 11,51% após 14 dias e a AST do grupo irradiado também aumentou em relação ao grupo não irradiado após o mesmo período⁴⁵. Um trabalho realizado por Assis *et al.* (2014) utilizando a hipertrofia induzida por exercícios dos músculos posterior (sóleo) e anterior (tibial anterior) da pata traseira de ratos, realizou irradiação LBP durante um treinamento com exercícios em 8 semanas. Seus resultados permitiram verificar que a AST do músculo tibial anterior aumentou significativamente no grupo irradiado em relação ao não irradiado (utilizando o comprimento de onda de 808 nm, 30mW, 5,6 J de energia total). Este resultado mostra que alguns autores estão verificando que a irradiação LBP parece contribuir para aumentar o diâmetro da fibra muscular em

diferentes modelos de hipertrofia e em diferentes músculos, contudo utilizando o modelo de hipertrofia compensatória não foram encontrados relatos na literatura.

Outro resultado, quanto ao número de mionúcleos, permitiu verificar que houve aumento dos mionúcleos no grupo irradiado quando comparado ao não irradiado após 14 dias sugerindo que o LBP teve influência na modulação da expressão de fatores miogênicos que ativam células satélites aumentando assim a AST da fibra muscular.

Juntamente com o aumento da AST frente a sobrecarga funcional ocorre um remodelamento da MEC, também para atender essa alteração na demanda músculo tendínea. As adaptações da MEC contribuem para a integridade da membrana basal (melhorando a contratilidade da fibra) e a transmissão de força a ser transmitida ao tendão (White *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2014). O colágeno é a principal proteína da MEC e está relacionada com características de extensibilidade e resistência do tecido muscular e tendíneo.

O remodelamento da MEC é dinâmico e reage à sobrecargas mecânicas (como na hipertrofia) aumentando a síntese de colágeno, modificando sua organização (paralelas ou em *cross-linking*) ou degradando parte de suas fibras para permitir o aumento da área de secção transversa da fibra muscular, principal característica deste processo⁶. Segundo Kannus (2000) estudos de histopatologia tendínea revelam que a degeneração e o desarranjo das fibras colágenas parecem estar relacionadas com a maior ocorrência de lesões em atletas cujo treinamento promove maior hipertrofia muscular.

Dada a grande importância destes componentes da MEC, especialmente do colágeno durante a hipertrofia compensatória os presentes resultados evidenciaram que houve uma redução no percentual da área de colágeno muscular após 14 dias no grupo que recebeu a irradiação em relação ao grupo que não recebeu a irradiação. Esse resultado parece sugerir que devido ao aumento da AST, houve uma redução da área de colágeno para permitir o aumento do tamanho da fibra. Contudo analisando as fibras grossas (maior resistência) e as fibras finas (maior elasticidade) do colágeno muscular, os resultados permitiram verificar que no grupo irradiado houve maior quantidade de fibras grossas (mais resistentes) em relação à quantidade de fibras finas (mais elásticas).

O efeito da redução do colágeno no tecido muscular promovido pela irradiação com LBP parece ter sido positivo uma vez que o aumento do colágeno está relacionado com a fibrose, o que não é bom para o músculo e sua função.

Em relação ao tendão os resultados obtidos pela birrefringência permitiram verificar que houve maior síntese e organização dessas fibras no grupo irradiado após 14 dias quando comparado com o grupo não irradiado. Esses sugerem que no caso do complexo músculo - tendão o paralelismo parece ser o melhor arranjo para evitar lesões pois facilita a transmissão da força pelas fibras musculares diretamente ao tendão como descrito por Franchi et al (2007). No tendão as fibras estão alinhadas de tal forma que qualquer esforço aplicado no músculo faz com que sigam na direção do eixo do próprio tendão ou seja, as fibras se alinharão paralelamente ao vetor do esforço^{5,47}. Esse complexo estrutural paralelo provê a capacidade do tendão de suportar forças em todas as direções durante os movimentos. Quando há uma alteração na organização das fibras há um aumento do estresse tendíneo podendo ocasionar lesões. Astrom e Rausing (1997) demonstraram em seus estudos com 163 corredores com sinais de tendinopatias e que tinham uma hipertrofia muscular, desarranjo das fibras de colágeno com perda das bandas paralelas e aumento de *cross-linking* (arranjos cruzados) analisando as biópsias através da birrefringência.

Com relação às células endoteliais e angiogênese, Gasparyan *et al* (2004) utilizaram o LBP (660 nm, 20 nW) em células de aorta torácica divididas e seus resultados demonstraram que o LBP estimulou com a mesma intensidade a angiogênese quando comparado ao grupo que recebeu somente o VEGF, mostrando ser um potente modulador deste processo. Em concordância com este achado, Schindl *et al.* (2002) reportaram que a irradiação do LBP vermelho (660nm) aumenta significativamente a proliferação das células endoteliais *in vitro* e aumenta a expressão de genes pró-angiogênicos (TGF- β e VEGF).

No presente estudo o LBP demonstrou modular de forma dose e tempo dependente a viabilidade das Huvecs uma vez que com 1J/cm² houve uma redução entre o terceiro e oitavo dia seguida de uma retomada ao décimo dia. Contudo em relação à concentração proteica não houve alteração até o sexto

dia seguida de uma redução ao oitavo dia e um aumento da concentração ao décimo dia. Góralczyk et al. (2016) também demonstraram em seus estudos com Huvecs, em condições de hiperglicemia que o LBP de 830nm, 4mW e 2 J/cm² induziu a redução da viabilidade celular após 7 dias de irradiação quando comparadas ao grupo controle. Contudo o modelo experimental e parâmetros foram diferentes dos utilizados no presente estudo.

Já com a dose de 5J/cm², houve uma redução significativa do primeiro ao oitavo dia com uma retomada da viabilidade semelhante ao controle em dez dias. Com relação à concentração proteica houve um aumento em relação ao controle no segundo dia, seguida de uma redução no terceiro, retomada no sexto dia e do oitavo ao décimo dia uma redução da concentração. Esse fato demonstra que apesar destas doses induzirem um comportamento semelhante em relação a viabilidade celular não causaram a mesma resposta no que se refere a quantidade de proteína total ou seja, no perfil proteico destas células.

Na dose de 10 J/cm², houve uma redução na viabilidade celular do primeiro ao oitavo dia com uma retomada ao décimo dia. Este comportamento é semelhante ao encontrado na dose de 5J/cm², porém a concentração proteica teve um aumento no segundo dia, seguida de uma redução ao terceiro dia, novamente uma retomada ao sexto dia, seguida de uma redução do oitavo ao décimo dia. Segundo Alghandi *et al.* (2011) esse resultado pode ser explicado pela ação bifásica do laser, onde doses de energia menores podem ocasionar a longo prazo um efeito negativo ou positivo na cultura celular. Já em relação aos níveis proteicos a irradiação com 10J/cm² houve um aumento significativo após o segundo dia e redução da concentração após o oitavo e décimo dia. Esse fato também demonstra que os níveis de concentração de proteínas apresentam-se de forma diferente em relação à viabilidade celular.

Por fim, na dose de 20J/cm² houve uma inibição inicial no segundo dia, uma retomada da viabilidade celular aos níveis do grupo controle no terceiro dia e novamente uma diminuição da viabilidade celular no sexto e oitavo dias com aumento da viabilidade no décimo dia. nesta dose os resultados da concentração proteica evidenciaram uma redução na concentração após o terceiro dia.

As Huvecs, segundo estudos recentes se comportam de maneira diferente em relação as doses de energia como também verificado no presente

estudo (Ling *et al.*, 2008; Góralczyk *et al.* 2015, 2016). Os dados da literatura evidenciam que o LPB pode alterar a viabilidade celular (células endoteliais, fibroblastos, C2C12)³⁷ e induzir a neoangiogênese³⁸, contudo os parâmetros dosimétricos são essenciais para a comparação entre os estudos e verificação de cada efeito.

Estudos *in vivo* demonstram que o LBP nos mesmos parâmetros utilizados nas Huvecs, modulou de maneira positiva a quantidade de vasos maduros após uma lesão muscular aguda após 3 dias ^{7,8,9}. Contudo é importante ressaltar que nesta situação condições são diferentes daquelas encontradas na cultura celular incluindo a existência de diferentes tipos celulares que produzem diferentes citocinas e fatores de crescimento.

Por fim, com relação ao aumento do suprimento sanguíneo durante a hipertrofia compensatória verificado pelos resultados *in vivo*, o LBP promoveu aumento dos vasos após 14 dias. Contudo os resultados obtidos *in vitro* no presente estudo não evidenciaram um efeito direto na viabilidade e quantidade de proteínas totais das Huvecs nesse comprimento de onda (780nm). pode-se sugerir que estes efeitos podem ter sido influenciados pela síntese de outros fatores locais pelos demais tipos celulares encontrados incluindo fatores de crescimento e diversas citocinas.

Em conclusão, irradiação laser aumentou a massa muscular, o número de mionúcleos e o número de vasos maduros e diminuiu a área total de colágeno no tecido muscular após 14 dias; melhorou a organização do colágeno tendíneo em 7 e em 14 dias e interferiu na viabilidade e concentração de proteína total de maneira dose dependente das células endoteliais Huvecs.

6 CONCLUSÃO

Conclui-se que o LBP, com os parâmetros estudados e nesse modelo de hipertrofia compensatória induziu o aumento da massa muscular, aumento do número de mionúcleos, aumento do número de vasos maduros, diminuição da área total de colágeno no tecido muscular após 14 dias, melhora da organização do colágeno tendíneo em 7 e em 14 dias e modulou de maneira dose tempo dependente a viabilidade e proteína total em células endoteliais (Huvecs).

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo demonstrou que a irradiação laser teve um efeito positivo durante o processo de hipertrofia no que diz respeito ao remodelamento. Nesse contexto, esses dados são importantes para que haja continuidade dos estudos desse efeito em relação aos mionúcleos (analisar a expressão de VEGF, MyoD e miogenina), angiogênese (marcação de células endoteliais-CD31) para melhor entendimento dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na ação do LBP durante a hipertrofia compensatória.

Estudos futuros podem contribuir para diminuir a fibrose muscular e prevenir tendinopatias em atletas que realizam seus treinamentos utilizando-se da hipertrofia muscular para aumentar seu rendimento.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. DiPasquale, DM.; Cheng, M.; Billich, W.; Huang, SA.; Rooijen, N.; Hornberger, TA.; Koh, TJ. Urokinase – type plasminogen activator and macrophages are required for skeletal muscle hypertrophy in mice **Am J Physiol Cell Physiol.** 2007: 293, p. 1278-85.
2. Pavarese, KC.; Huber, AM.; Brochin, RL.; Bacon, PL.; McCall, GE.; Huey, KA.; Hyatt, JK. Acute vascular endothelial growth factor expression during hypertrophy is muscle phenotype specific and localizes as a striated pattern within fibers **Exp Physiol.** 2010: 95, p. 1098-1106.
3. McCarthy, JJ; Mula, J; Miyasaki, M; Erfani, R; Garrison, K.; Farooki, AB; Srikuea, R; Lawson, BA; Grimes, B; Keller, C; Zant, G.V.; Campbell, KS; Esser, KA; Dupont-Versteegden, EE; Peterson, CA. Effective fiber hypertrophy in satellite cell-depleted skeletal muscle **Development.** 2011: 138, p. 3657-66.
4. Schoenfeld, BJ. The mechanisms of muscle hypertrophy and their application to resistance training. **Journal of Strength and Conditioning Research.** 2010: 24 (10), 2857-72.
5. Franchi M, *et al.* Collagen structure of tendon relates to function. **The Scientific World Journal.** (2007) 7: 404-420.
6. Heinemeier KM, *et al.* Expression of collagen and related growth factors in rat tendon and skeletal muscle in response to specific contraction types. **The Journal of physiology** 582.3 (2007): 1303-1316.
7. Alves *et al.* Modulating effect of low level-laser therapy on fibrosis in the repair process of the tibialis anterior muscle in rats. **Lasers in Med Sci.** 2014: 29(2), 813-21.
8. Souza TO, Mesquita DA, Ferrari RA, Dos Santos Pinto D Jr, Correa L, Bussadori SK, Fernandes KP, Martins MD. Phototherapy with low-level laser affects the remodeling of types I and II collagen in skeletal muscle repair. **Lasers Med Sci.** 2011: 26, 803-14.
9. Ribeiro *et al.* The effect of low level-laser therapy (LLLT) applied prior to muscle injury. **Lasers in Surgery and Medicine.** 2015: 47(7), 571-578.

10. Adams, G.R.; Caiozzo, V. J.; Haddad, F.; Baldwin, K.M. Cellular and molecular responses to increased skeletal muscle loading after irradiation. **Am J Physiol Cell Physiol.** 2002: 283, C1182-C1195.
11. Sakuma K, Nishikawa J, Nakano H, Sano M, Yasubara M. Serum response factor plays an important role in the mechanically overload plantaris muscle of rats. **Histochem Cell Biol.** 2003; 119 (2): 149-60.
12. Yamaguchi, A.; Ikeda, Y.; Hirai, T.; Fugikawa, T.; Morita, I. Local changes of IGF-1 mRNA, GH receptor mRNA, and fiber size in rat plantaris muscle following compensatory overload **Jpn J Physiol.** 2003 53(1): p.53-60.
13. Yamaguchi, A.; Ikeda, Y.; Hirai, T.; Fugikawa, T.; Morita, I. Local changes of IGF-1 mRNA, GH receptor mRNA, and fiber size in rat plantaris muscle following compensatory overload **Jpn J Physiol.** 2003 53(1): p.53-60.
14. Marino, J.S.; Taush, B.J.; Dearth, C.L.; Manacci, M.V.; McLoughlin, T.J.; Rakita, S.J.; Linsenmayer, M.P.; Pizza, F.X. 2008 2- Integrins contribute to skeletal muscle hypertrophy in mice **Am J Physiol.** 2008: 295, p. 1026-36.
15. Huey, K.A.; Burdette, S.; Zhong, H.; Roy, R.R. Early response os heat shock proteins to functional overload of the soleus and plantaris in rats and mice **Exp Physiol.** 2010: 95, p. 1145-55.
16. Goodman, C.A.; Mayhew, D.L.; Hornberger, T.A. Recent progress toward understanding the molecular mechanisms that regulate skeletal muscle mass **Cellular signaling.** 2011: 23: p.1896-1906.
17. Gordon, B.S.; Delgado Dias, D.C.; White, J.P.; Carson, J.A.; Kostec, M.C. Six1 and Six1 cofactor expression is altered during early skeletal muscle overload in mice **J Physiol Sci.** 2012: 62 (5), p. 393-401.
18. Terada, M.; Kawano, F.; Oshira, T.; Nakai, N.; Nishimoto, N. Effects os mechanical over-loading on the properties of soleus muscle fibers, with or without damage, in wild type and Mdx mice **PLoS ONE.** 2011: 7(4), e.34557
19. Allen, D.L.; Harrison, B.C.; Sartorius, C.; Byrnes, W.C.; Leinwand, L.A. 2001 Mutation of the IIB myosin heavy chain gene results in muscle fiber loss and compensatory hypertrophy. **Am J Physiol Cell Physiol.** 2001: 280: C637-C645.
20. Myazaki M & Esser KA. Cellular mechanisms regulating protein synthesis and skeletal muscle hypertrophy in animals. **J Appl Physiol.** 2009: 106, 1367-1373.

21. Bodine, S.C.; Stitt, T.N.; Gonzalez, M.; Kline, W.O.; Stover, G. L.; Bauerlein, R.; Zlotchenko, E.; Scrimgeour, A.; Lawrence, J.C.; Glass, D.J.; Yancopoulos, G.D. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. **Nature Cell Biol.** 2001: v. 3, p. 1014-19.
22. Pehme, A.; Alev, K.; Julkunen A.; Seene, T. The effect os mechanical loading on the MyHC synthesis rate and composition in rat plantaris muscle **Int J Sports Med.** 2004 25(5): p. 332-8.
23. Glass, D.J. 2005 Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.** 2005: v. 37, p. 1974-84.
24. Nader, G.A. Molecular determinants of skeletal muscle mass: getting the "AKT" together **Int J Biochem Cell Biol.** 2005: v. 37(10), p.1985-96.
25. Schuenke, M.D.; Brooks, N.E.; Hikida, R.S. Interactions of aging, overload and creatine supplementation in rat plantaris muscle **J Aging Research.** 2011: ID 393416.
26. Wang, M.; Yu, H.; Kim, Y.S.; Bidwell, C.A.; Kuang, S. 2012 Myostatin facilitates slow and inhibits fast myosin heavy chain expression during myogenic differentiation. **Biochemical and Biophysical Research Communications.** 2012: 426:p.83-88.
27. Teixeira, C.E.; Duarte, J.A. Myonuclear domain in skeletal muscle fibers. A critical review **Arch Exerc Health.** 2011: 2(2), p. 92-101.
28. Zhang, B.T.; Yeung, S.S.; Liu, Y.; Wang, H.H.; Wan, Y.M.; Ling, S.K.; Zhang, H.Y.; Li, Y.H.; Yeung, E.W. The effects of low frequency electrical stimulation on satellite cell activity in rat skeletal muscle during hindlimb suspension. **BMC Cell Biology.** 2010: 11(87):p.1-9.
29. Martin, N.R.W; Lewis, M.P. 2012. Satellite cell activation and number following acute and chronic exercise: A mini review. **Cellular and Molecular Exercise Physiology.** 2012: 11,p.1-3.
30. Schiaffino,S.; Dyar, K.A.; Ciciliot, S. Blaauw, B.; Sandri, M. Mechanisms regulating skeletal muscle grow and atrophy. **FEBS Journal,** 2013: p.1-21.
31. Fernandes, T; Soci, UPR, Alves CR, Carmo, EC, Barros, JG, Oliveira, EM. Determinantes moleculares da hipertrofia do músculo esquelético mediados

pelo treinamento físico: estudo das vias de sinalização. **Revista Mackenzie de Educação Física e Esporte**. 2008; 7 (1): 169-188.

32. Elliott, B.; Renshaw, D.; Getting, S.; Mackenzie, R. The central role of myostatin in skeletal muscle and whole body homeostasis. **Acta Physiol**. 2012; 205: p.324-340.

33. Lamalice L, Le Boeuf F, Huot J. Endothelial cell migration during angiogenesis. **Circ Res**. 2007; 100: 782-794.

34.Senger DR, Davis GE. Angiogenesis. **Cold Spring Harb Perspect Biol**. 2011; 3: a005090. DOI: 10.1101/cshperspect.a005090.

35.Schindl A, Heinze G, Schindl M, Pernerstorfer-Schön H, Schindl L. Systemic effects of low-intensity laser irradiation os skin microcirculation in patients with diabetic microangiopathy. **Microvascular Research**. 2002; 64: 240-6.

36. Gillies AR & Lieber RL. Structure and function of the skeletal muscle extracellular matrix. *Muscle nerve*. 2011; 44(3), 318-31.

37. AlGhandi KM, Kumar A, Moussa NA. Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. **Lasers Med Sci**. 2012; 27(1): 237-49.

38. Gasparyan L, Brill G, Makeda A. Activation of angiogenesis under influence of red low level laser radiation. **Laser Florence**. 2004; Proc. *SPIE* 5968: 45-50.

39. Gargett CE, Bucak K, Rogers PA. Isolation, characterization and long-term culture of human myometrial microvascular endotelial cells. **Human Reprocdution**. 2000; 15: 293-301.

40. Rennó AC, Toma RL, Feitosa SM, Fernandes K, Bossini PS, De Oliveira P. et al. Comparative effects of low-intensity pulsed ultrasound and low- level laser therapy on injured skeletal muscle. **Photomed Laser Surg**. 2011; 29:p. 5-10.

41. Mesquita-Ferrari RA; Martins MD, Silva JA Jr., Da Silva TD, Piovesan RF, Pavesi VC *et al*. Effects of low-level laser therapy on expression of TNF- α and TGF- β in skeletal muscle during the repair process. **Lasers Med Sci**. 2011; 26:335-40.

42. Huang YY, Chen ACH, Caroll JD, Hamblin MR. Biphasic Dose Response in Low Level Light Therapy. **Dose -Response an International Journal**. 2009; 7(4), 358-383.

43. Zhou et al. Laser controlled singlet oxygen generation in mitochondria to promote mitochondrial DNA replication in vitro. **Scientific reports**. 2015: doi:10.1038.
44. Vogel, B, Siebert H, Hofmann U, Frantz S. Determination of collagen content within picrosirius red stained paraffin-embedded tissue sections using fluorescence microscopy. **Methods X**. 2015: 2, 124-134.
45. Ruifrok AC, Johnston DA. Quantification of Histochemical staining by color deconvolution. *Anal quant Cytol Histol*, 2001: 23(4), 291-9.
46. Terena *et al*. Effects of low level laser in the morphology of the skeletal muscle fiber during compensatory hypertrophy in plantar muscle of rats. **Proceedings of SPIE - International Society for Optical Engineering**. 2015: v.9531.
47. Assis et al. Effect of low-level laser therapy (808nm) on skeletal muscle after endurance exercise training in rats. **Braz J Phys Ther**. 2014: doi:10.1590.
48. Yang G, Rothrauff BB, Tuan RS. Tendon and Ligament regeneration and repair; clinical relevance and developmental paradigm. **Birth Defects Res C Embryo Today**. 2013;99(3), 203-222.
49. Surov'y P, Dinis C, Marusák R, Ribeiro NA. Importance of automatic threshold for image segmentation for accurate measurement of fine roots of woody plants. **Jesn Cas For J**, 2014: 60,244-249.
50. Hadi AM, Mouchaers KTB, Schaly I, Grumberg K, Meijer GA, Vonk-Noordegraaf A, Van Der Laarse WJ, B, Beliñe JAM. Rapid quantification of myocardial fibrosis: a new macro-based automated analysis. **Cell Oncol**. 2011; 34(4): 343-354.
51. Khoo CP, Micklen K, Watt SM. A comparison of methods for quantifying angiogenesis in the Matrigel assay in vitro. *Tissue Eng Part C methods*, 2011; 17(9): 895-906.

ANEXOS

ANEXO 1

Carta de aprovação do CEUA



Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA – UNINOVE
Rua Francisco Matarazzo, no 612, Prédio C, Diretoria da Saúde
ceua@uninove.br

Protocolo de Pesquisa referente ao Projeto nº An007/2013reap1avez

Título do Projeto:
AValiação DOS EFEITOS DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE NA DIFERENCIAÇÃO E PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS SATÉLITES NA HIPERTROFIA COMPENSATÓRIA

Orientador: **Profa. Raquel Agnelli Mesquita Ferrari**

Aluno:

Objetivos: Avaliar o efeito do LBI nas expressões de imunomarcadores regulatórios miogênicos (Myd, Miogenina) e fatores de crescimento (Miostatina e Calcineurina) envolvidos na diferenciação e proliferação de células satélites na hipertrofia compensatória.

Método:

Animais (procedência, raça, linhagem, número de animais, peso, sexo):

Serão utilizados 25 ratos WISTAR, de 200-250 g, divididos aleatoriamente em 3 grupos: (1) controle (sem intervenção e sem tratamento); (2) com intervenção e tratamento de LBI 880 nm e (3) com intervenção e tratamento de LBI 780nm. Anestesiados e em condições estéreis será realizado uma incisão longitudinal na região dorsal da pata traseira expondo o m. gastrocnêmio e o músculo sóleo. O tendão é então isolado na sua porção inferior e então seccionado. Isola-se o tendão superior, secciona e então o músculo é retirado. Esse procedimento deve ter o cuidado de remover os músculos sem sem lesar a inervação e nem o suprimento sanguíneo. O m. plantar fica logo abaixo do m. sóleo e que sofrerá sobrecarga funcional e será analisado posteriormente. Após o procedimento será realizada a sutura das áreas incisadas utilizando-se fio de poliamida (5,0) e os animais serão mantidos em gaiolas com aquecimento para prevenir a hipotermia. O tratamento será realizado utilizando o Twin Laser® (MM Optics, São Carlos – SP, Brasil), com potência de 40 mW (densidade de potência de 1W/cm²), área do feixe de 0.04 cm², e comprimento de onda 780nm, meio ativo de Arseneto de Gálio e Alumínio (AsGaAl), com densidade de energia de 10 J/cm² (energia de 0.4 J) e tempo de aplicação de 10 segundos. E com o laser. O tratamento será iniciado após do procedimento da ablação dos músculos gastrocnêmio e Sóleo, sendo realizado diariamente até o período de eutanásia de cada grupo. Será utilizada a técnica pontual diretamente sobre a pele que recobre o músculo plantar, na região da incisão e ao redor da área do músculo, abrangendo aproximadamente 8 pontos. Para evitar refração do feixe do laser será utilizado para aplicação o ângulo de 90 graus entre o emissor e a pele do animal. No início e final do procedimento experimental, a potência de emissão de luz do laser será aferida utilizando o "LaserCheck power meter" (Coherent, Santa Clara, CA, USA). Ao término do protocolo proposto, os animais serão submetidos à eutanásia com overdose de anestésico. As substâncias usadas serão a ketamina e a xilazina, em duas ou três vezes a dose anestésica, administrados por via intraperitoneal e os músculos plantares serão removidos para a para a confecção de cortes histológicos e análise da imunomarcação dos fatores miogênicos. Após a eutanásia dos animais, os músculos plantares serão cuidadosamente removidos (10 amostras correspondentes a 5 animais de cada grupo) e acondicionados para evitar a contração indevida do músculo, crioprotetidos com isopentano por 10 segundos para em seguida serem congelados em nitrogênio líquido.

Condições de alojamento e nutrição: Os animais serão mantidos no biotério da UNINOVE – unidade Vergueiro em caixas plásticas apropriadas, num máximo de 3 animais por caixa, a temperatura ambiente (22°C) e luminosidade controlados com ciclo de 12 horas. A comida e água serão *ad libitum* em garrafinhas posicionadas na grade da gaiola, a comida estará disponível na grade da gaiola. O Biotério possui exaustor.

Medidas para evitar estresse e/ou dor nos animais: Caso o animal realize movimentos estereotipados sinalizando que está com dor, ele receberá uma dose de clonidrato de tramadol (8 mg de Tramal em 100 microlitros de água destilada) de 12 em 12 horas, por gavagem durante 2 dias. Protocolo de Souza et al., 2000. Revista Brasileira de Anestesiologia

Procedimento Anestésico e/ou Analgésico (incluir dose e vias de administração):

Os animais serão pesados e em seguida anestesiados proporcionalmente à massa corporal com administração intraperitoneal de 1 mL/kg de 1% ketamina HCL (Dopalen, Vetbrands, São Paulo, Brasil) e 2% xilazina (Anasedan, Vetbrands, São Paulo, Brasil). Para aplicação da anestesia serão utilizadas seringas da marca BD 100 Unidades com Agulha BD Ultra-Fine®, modelo insulina com a agulha Ultra-Fine® (regular), comprimento: 12,7 mm, calibre: 0,33 mm e bisel trifacetado (Mesquita-Ferrari et al., 2011).

Eutanásia: Os animais serão eutanasiados com overdose de anestésico. As substâncias usadas serão a ketamina e a xilazina, em duas ou três vezes a dose anestésica, administrados por via intraperitoneal

As alterações no processo de eutanásia foram realizadas.

Pertinência e valor científico do estudo proposto:

O Projeto é da expertise da pesquisadora.

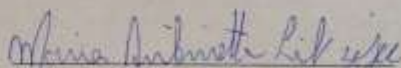
Apresentado a este Comitê para análise ética, foi considerado:

(X) Aprovado, sendo que este projeto deverá permanecer arquivado por 05 (cinco) anos nesta Secretaria.

() Com pendência (relacionar), devendo o Pesquisador encaminhar as modificações sugeridas, e iniciar a coleta de dados somente após a aprovação do projeto por este Comitê.

() Não-Aprovado

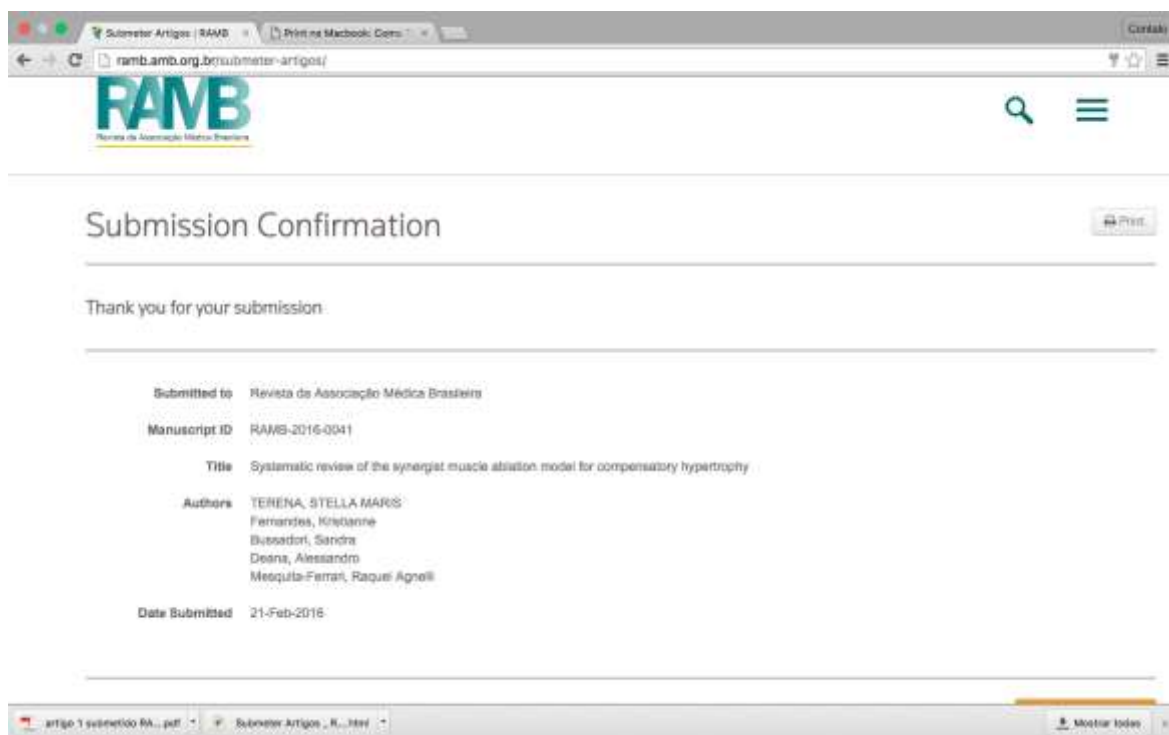
São Paulo, 22 de maio 2013



Prof. Dra. Maria Antonietta Leitão Zajac
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais da
Universidade Nove de Julho

ANEXO 2

ARTIGO 1 (Em processo de análise) Comprovante da submissão



ANEXO 3

ARTIGO 1 completo

SUMMARY

Objectives: The aim was to evaluate the effectiveness of the experimental synergists muscle ablation model to promote muscle hypertrophy, determine the period of greatest hypertrophy and its influence on muscle fiber types and determine differences in bilateral and unilateral removal to reduce the number of animals used in this model.

Methods: Following the application of the eligibility criteria for the mechanical overload of the plantar muscle in rats, nineteen papers were included in the review.

Results: The results reveal a greatest hypertrophy occurring between days 12 and 15 and based on the findings, synergist muscle ablation is an efficient model for achieving rapid hypertrophy and the contralateral limb can be used as there was no difference between unilateral and bilateral surgery, which reduces the number of animals used in this model. **Conclusion:** This model differs from other overload models (exercise and training) regarding the characteristics involved in the hypertrophy process (acute) and result in a chronic muscle adaptation with selective regulation and modification of fast-twitch fibers in skeletal muscle. This is an efficient and rapid model for compensatory hipertrophy.

Keywords: *ablation of synergists, compensatory hypertrophy, experimental models, muscle mass, skeletal muscle cross-sectional area.*

RESUMO

Objetivos: avaliar a eficácia do modelo experimental de ablação dos sinergistas para promover a hipertrofia muscular, determinar o período de maior hipertrofia, sua influência sobre os tipos de fibras musculares e determinar diferenças na remoção unilateral ou bilateral para reduzir o número de animais utilizados neste modelo. **Métodos:** Após a aplicação dos critérios de elegibilidade para sobrecarga mecânica do músculo plantar em ratos, dezenove artigos foram incluídos na revisão. **Resultados:** Os resultados revelam que ocorre uma maior hipertrofia entre os dias 12 e 15 que torna o modelo eficiente para alcançar a hipertrofia rapidamente e o membro contralateral também pode ser usado pois não houve diferença entre a cirurgia unilateral e bilateral, o que reduz o número de animais usados no experimento. **Conclusão:** o modelo difere de outros modelos de sobrecarga (exercício e treinamento) devido as características envolvidas no processo de sobrecarga imposta (aguda) resultando numa adaptação crônica muscular com modificação de fibras de contração rápida do músculo esquelético. É um modelo rápido e eficiente para se estudar hipertrofia compensatória.

Palavras chave: ablação dos sinergistas, hipertrofia compensatória, modelos experimentais, massa muscular, área de secção transversa do músculo esquelético.

Introduction

Skeletal muscle is highly adaptive and has a self-regulating capacity [1,2,3]. Hypertrophy is an example of this plasticity and is the increase in muscle mass necessary to enable the muscle to optimize its response to the demands of sustaining and generating force [1,2,4,5,6].

Skeletal muscle mass is regulated by a variety of stimuli, the best known of which is mechanical overload. Overload is a fundamental principle of the muscle adaptation process and can be induced by stretching/immobilization^[44,46], compensatory mechanisms (chronic)^[1,2,4,5,6,8,9,12,14,18,19,20,61,62,63,64,65] and exercise/training [33,46]. Evidence of this is derived from a large number of studies demonstrating that overload leads to an increase in muscle mass and cross-sectional area of the muscle fibers and induces chronic changes in the balance between the synthesis and degradation of proteins [2,7,8,9]. Compensatory hypertrophy through the ablation of synergists of plantar flexion is one of the ways to produce chronic overload experimentally [3,7,12,13,20,59]. The ablation of synergists for compensatory hypertrophy consists of the surgical removal of all or part of synergistic muscles to generate chronic functional overload that causes hypertrophy [3,7,12,13,20,59]. According to Parvaresh *et al.* [1], complete muscle removal can compromise the neurovascular supply, which increases edema and the recovery of the animal in the postoperative period. Thus, the removal of only the distal portion of synergist muscle is recommended (**Figure 1**). Ablation can be either unilateral or bilateral.

The synergist muscle ablation model induces muscle hypertrophy in only a few days, thereby facilitating the study of adaptive responses [2,3,7,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20]. The most studied muscles are plantar flexors in the rear paw of rats. As skeletal muscle has different types of fibers (type I [slow-twitch] and type II [fast-twitch – IIa, IIb, IIx/IIc]) [21], a number of authors justify the choice of the plantaris muscle due its diversity of fiber types (type I: $8 \pm 2\%$; type IIA: $19 \pm 3\%$; type IIB/D: $74 \pm 4\%$) and its different adaptation possibilities [9]. Compensatory hypertrophy induced by the functional elimination of synergistic muscles results in an increase in muscle fiber diameter and muscle mass as well as the regulation of protein synthesis in different types of muscle fibers.

The present systematic review of the literature discusses the results found in studies using this experimental model to cause overload in the plantar muscle in rats, comparing the findings with regard to the percentage increase in the mass of the plantar

muscle, the period of greatest muscle mass gain and differences between unilateral and bilateral surgery. The aim of this review was to evaluate the effectiveness of the experimental synergist muscle ablation model to promote muscle hypertrophy in different overload models, determine the period of greatest hypertrophy and its influence on muscle fiber types and determine differences in bilateral and unilateral removal to reduce the number of animals used in this model, thereby facilitating its reproduction and its choice among different chronic hypertrophy models.

Methods

Searches were performed in the Pubmed, Science Direct, Medline and CAPES Portal databases for articles published in English between January 1999 and July 2013 using the key words “compensatory hypertrophy”, “mechanical overload”, “experimental models”, “ablation of synergists” and “skeletal muscle cross-sectional area”. The following criteria were used for the selection of papers: **(1)** the use of a rat model; **(2)** the use of synergist ablation to overload the plantaris muscle; **(3)** bilateral or unilateral muscle removal; and **(4)** the determination of the cross-sectional area of muscle fibers and muscle mass. A total of sixty-three articles were retrieved using combinations of the keywords. Twenty-four papers were review articles [7,9,21-42]; eight studies used a model other than the ablation of synergists to cause hypertrophy [43-50]; and six were *in vitro* studies [51-56]. Among the remaining 25 studies, seven did not compare the cross-sectional area of the muscle and/or muscle mass to a control group [3,13,15,57,48,57,59,60]. Thus, 19 studies met the inclusion criteria and were selected for the present review (**Figure 2**).

Statistical analysis

The data from graphs were grouped based on collection time and percentage of increase in mass of the plantaris muscle with error propagation. A scatter plot was created to show the distribution of muscle mass gain in function of the number of days following the ablation procedure. Two regressions were employed: one for less than 15 days of data and another for more than 15 days of data. A slope of the regression line coefficient of $0.042 \pm 0.002\%$ and linear coefficient of $0.095 \pm 0.021\%$ were used for this calculation (slope of the regression line coefficient + x linear coefficient, in which x is the number of days). The R^2 values demonstrate how the data approach the progression and form a straight line ($R^2 = 0.52$ in the first 15 days following the ablation

of synergists and $R^2 = 0.06$ after 15 days since surgery). The greater than 50% for the former figure demonstrates that the linear fit is adequate. Chebyshev's inequality test was used to compare muscle mass following unilateral or bilateral removal. This test makes no assumptions regarding the normality of the data distribution and only requires the means and standard errors as inputs. Only periods of 14 and 28 days were compared, which were the periods used by most authors. The results were $p = 0.2996$ for 14 days and $p = 0.2584$ for 28 days.

Results

Table 1 summarizes the findings of the nineteen articles analyzed in the present systematic review. Considerable variation was found in the analysis period following the ablation of synergists. Increases in muscle mass (g) and fiber cross-sectional area (μm^2) of the plantar muscle were reported in all studies evaluated, demonstrating compensatory hypertrophy.

The data were grouped based on collection time and percentage of increase in mass of the plantar muscle with error propagation. The trend line revealed linear progression up to 15 days, with stabilization of the data after this period. The method of least squares was used, including the error of the data reported by the authors. For studies that did not provide such information, the mean error was used. The trend line in **Figure 3** shows the percentage (\pm error) of increase in muscle mass according to days after surgery as follows: $13.6 \pm 2.1\%$ one day after ablation, $38.7 \pm 2.6\%$ seven days after ablation and $68.0 \pm 3.6\%$ 14 days after ablation.

Only periods of 14 and 28 days were compared, which were the periods used by most authors. The results were $p = 0.2996$ for 14 days and $p = 0.2584$ for 28 days. Considering $\alpha = 0.05$, no significant differences were found between unilateral and bilateral surgery in the two periods. Despite the lack of statistical significance, the power of the test was low due to the limited data in the literature on unilateral synergist ablation reporting the percentage gain in plantar muscle mass.

All data were grouped based on the period after the ablation of synergists (**Figure 4**). Greatest hypertrophy occurred between 12 and 15 days postoperatively. The increase in the cross-sectional area of the muscle and muscle fibers was studied using histological techniques [1,7,8,9,60]. The mean increase in cross-sectional area in comparison to the control was $66 \pm 4\%$ at Day 14, demonstrating that compensatory hypertrophy is an effective model for increasing muscle mass.

Discussion

Compensatory hypertrophy occurs in response to a sustained increase in the mechanical load of skeletal muscle. Although the mechanisms involved in compensatory hypertrophy are not yet fully understood, this is an intense topic of research, which includes the definition, measuring, loading stimulus parameters, acute responses, hyperplasia, experimental models, adaptations of muscle fiber types, the involvement of satellite cells and endocrinology. The purpose of the present systematic review was to gather results reported by researchers who have used the standard ablation of synergists (gastrocnemius and soleus muscles) model to determine the induction of hypertrophy in the plantar muscle of rats, comparing the percentage of muscle gain to facilitate and standardize the use of this model for the study of muscle plasticity following functional overload. The increasing interest in the molecular and cellular mechanisms responsible for hypertrophy in recent years ^[1,6,7,8,9] underscores the need for a reliable and easily reproducible model. Rats are often used due to their considerable activity and their larger size in comparison to mice. The mean weight of the animals used in the studies analyzed was 220 ± 12 g ^[1,2,3,4,5,7,14,15,16,18].

Among the models described in the literature for changes in muscle demand, different protocols of mechanical loading have been used: resistance training (RT) and compensatory hypertrophy after ablation and tenotomy ^[2,3,5,6,7,13,18,65]. Current theories suggest differences between mechanisms that induce hypertrophy through exercise and compensatory hypertrophy. Both methods cause changes in the muscle, but the molecular signaling pathways seem to be different ^[26,49]. Compensatory hypertrophy due to the ablation of synergists and tenotomy differ in terms of phases. The former has two distinct phases: an inflammatory phase, followed by the response of the muscle to the demand for a functional increase. Tenotomy has the disadvantage of the rapid reconnection of the cut tendon, which limits functionality ^[66].

Most commonly studied muscles

Compensatory hypertrophy by the ablation of synergists is an efficient model for studies on muscle hypertrophy ^[2,3,7,10-20], as the fast increase in muscle mass reduces the duration of the experiment. In recent years, changes have occurred in the standard of surgery (bilateral or unilateral) and the relationship between the number of days and increase muscle mass, which led to need for this systematic review.

In rats, the most commonly studied muscles are the tibial anterior, digitorum longus, soleus and plantar muscles [1,2,3,4,5,7,14,15,16,18]. In the 1980s and 90s, the model most often employed was the entire removal of the tibialis anterior to generate overload of the digitorum longus [15]. Currently, the most used muscles in such models are the soleus and plantar muscle and compensatory hypertrophy commonly involves the removal of the distal portion of the gastrocnemius. Despite displaying anatomical proximity in rats, these muscles are distinct in their architecture and biochemistry [6,9,16,19,59].

Considering the different types of muscle fiber (slow-twitch [type I] and fast-twitch [type IIa, IIb, IIx and IIc]) [21], a number of authors justify the choice of the plantar muscle for studies on adaptation due to its composition of different fiber types. The plantar muscle is predominantly composed of fibers IIc and therefore has a smaller amount of mitochondria as such fibers use the glycolytic pathway for a faster response during gait. Authors attribute this adaptation feature of the plantar muscle to its constant activation during the stance phase and weight bearing in quadrupeds, which use this muscle to resume ambulation [9].

Unilateral vs. bilateral surgery

Based on the data analyzed, both unilateral and bilateral synergist ablation lead to an increase in muscle mass, with no statistically significant difference between the two types of surgery. Researchers working with unilateral surgery report a mean increase in muscle mass of $46.8 \pm 2.6\%$ 14 days following synergist ablation [4,12,61,63], whereas those working with bilateral surgery report an increase of $52.3 \pm 3.1\%$ in the same period [4,12,61,63]. Although the number of studies involving unilateral ablation (n = 4) was smaller than the number involving bilateral ablation (n = 14), the similar increase in muscle mass demonstrates the benefits of unilateral surgery, which reduces the number of animals used in experiments and is in line with the goals of the International Council for Laboratory Animal Sciences.

Expected time for hypertrophy

The data collection period varied considerably among the studies analyzed. Moreover, it is important to determine how the data are distributed for adequate visualization of the period of greatest hypertrophy. The synergist ablation model led to an increase in muscle mass in the first three days due to inflammation and edema caused

by the surgical procedure ^[1,2,6,20,62,63]. This disadvantage in the compensatory hypertrophy model by synergist ablation is due to the inflammation process that occurs after surgery. However, Novack *et al.* ^[18] demonstrated that components of the acute inflammatory response are required in the muscle repair and remodeling process and the intensity of the inflammatory response is related to the magnitude of hypertrophy. With synergist ablation, the increase in COX-2 seems to be related to the considerable increase in muscle mass that occurs in this model and the inflammatory response enables and facilitates the activity of extracellular proteases, the accumulation of macrophages and cell proliferation, including the activation and proliferation of satellite cells, which seems to exert an influence on the greater hypertrophy achieved with this model in comparison to exercise-induced hypertrophy.

According to Marino *et al.* (2008), no statistically significant difference in the cross-sectional area of the muscle fibers was found in the first three days following ablation. At three to five days, the edema is reduced, followed by an increase in the cross-sectional area of the muscle fibers as well as enzyme activity and protein synthesis, which constitute hypertrophy as an adaptation to the new condition of chronic overload ^[1,6,18,61,63]. The period of 12 to 15 days was identified as that with the greatest percentage increase in muscle mass in comparison to the control (Figure 3), demonstrating a linear progression (i.e., a progressive gain in muscle mass over the first 15 days after ablation). At 28 days, the authors found no further increase in gene expression related to increased muscle mass ^[9,64,65], as demonstrated by the cessation of linear progression and stabilization of the data (**Figure 2**). Thus, peak hypertrophy (greatest increase in muscle mass and cross-sectional area of the muscle fibers) occurs between the second and third week following synergist ablation. Concentrating studies on this period is fundamental to determining the impact of novel therapies and interventions designed either to diminish or potentiate the effects of compensatory muscle hypertrophy.

Cross-sectional area and types of muscle fiber

The increase in the cross-sectional area of the muscle and muscle fibers was studied using histological techniques ^[1,7,8,9,61]. The mean increase in cross-sectional area in comparison to the control was 18.66% in 14 days, demonstrating that compensatory hypertrophy is an effective model for increasing muscle mass. The trend line in Figure 2 shows the percentage increase in muscle mass according to days following surgery:

approximately 10% one day after ablation, 38% seven days after ablation and 68% 14 days after ablation.

The increase in the cross-sectional area of muscle is related to protein synthesis of the muscle fibers and the activation of satellite cells. Studies suggest that satellite cells are responsible for the both the growth of muscle fibers and the regulation of the muscle fiber phenotype ^[8,14,19,20,37,46]. At the onset of compensatory hypertrophy, the muscle fiber alters its response. The relationship among the cross-sectional area, hypertrophy and fiber type ^[37] indicates that chronic overload induces changes in the expression of heavy chain myosin.

Goodman *et al.* ^[8] demonstrated a significant increase in protein synthesis in four types of muscle fiber (slow-twitch [type I] and fast-twitch [type IIa, IIb and IIx]) in the plantaris muscle in rats submitted to synergist ablation. Type IIb fibers exhibited the least amount of protein synthesis, whereas IIa fibers exhibited the most amount of protein synthesis, which did not differ significantly from that found in type I fibers. The cross-sectional area was smallest of type IIb fibers and largest in IIa fibers, which also surpassed the area found in type I fibers. These findings suggest that this model results in the selective regulation and modification of fast-twitch fibers in skeletal muscle.

Conclusion

Based on the findings of the present systematic review, the following conclusions may be drawn: **[1]** the synergist ablation model differs from other overload models regarding the characteristics involved in the hypertrophy process; **[2]** 12 to 15 days following ablation is the period of greatest muscle hypertrophy; **[3]** the lack of a significant difference in the gain in muscle mass between unilateral and bilateral ablation demonstrates that contralateral limb can be used as the control, which reduces the number of animals used in this model; and **[4]** synergist muscle ablation is an efficient reproducible model for achieving rapid hypertrophy and results in the selective regulation and modification of fast-twitch fibers in skeletal muscle.

List of abbreviations

RT: resistance training

COX-2: prostaglandin-endoperoxide s

References

1. DiPasquale DM, Cheng M, Billich W, Huang SA, Rooijen N, Hornberger TA, Koh TJ. Urokinase – type plasminogen activator and macrophages are required for skeletal muscle hypertrophy in mice. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007; 293:1278-85.
2. Pavaresh KC, Huber AM, Brochin RL, Bacon PL, McCall G.E, Huey KA, Hyatt JK. Acute vascular endothelial growth factor expression during hypertrophy is muscle phenotype specific and localizes as a striated pattern within fibers. *Exp Physiol.* 2010; 95:1098-1106.
3. McCarthy JJ, Mula J, Miyasaki M, Erfani R, Garrison K, Farooki AB, Srikuea R, Lawson BA, Grimes B, Keller C, Zant GV, Campbell KS, Esser KA, Dupont-Versteegden EE, Peterson CA. Effective fiber hypertrophy in satellite cell-depleted skeletal muscle. *Development.* 2011; 138: 3657-66.
4. Adams GR, Haddad F, Baldwin KM. Time course of changes in markers of myogenesis in overload rat skeletal muscles. *J Appl Physiol.* 1999; 87:1705-12.
5. Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, Kline WO, Stover G L, Bauerlein R, Zlotchenko E, Scringeour A, Lawrence JC, Glass DJ, Yancopoulos GD. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nature Cell Biol.* 2001; 3, 1014-19.
6. Marino JS, Taush BJ, Dearth CL, Manacci MV, McLoughlin TJ, Rakita SJ, Linsenmayer MP, Pizza FX. 2- Integrins contribute to skeletal muscle hypertrophy in mice. *Am J Physiol.* 2008; 295:1026-36.
7. Goodman CA, Mayhew DL, Hornberger TA. Recent progress toward understanding the molecular mechanisms that regulate skeletal muscle mass. *Cellular Signaling.* 2011; 23: 1896-1906.
8. Goodman CA, Kotecki JA; Jacobs BL, Hornberger TA (2012). Muscle fiber type-dependent differences in the regulation of protein synthesis. *PLoS ONE.* 2012; 7(5): e37890.
9. Schuenke MD, Brooks NE, Hikida RS. Interactions of aging, overload and creatine supplementation in rat plantaris muscle. *J Aging Research Article.* 2011; ID 393416.
10. White JP, Reecy MJ, Washington TA, Sato, ELe M, Davis JM, Wilson LB, Carson JA. Overload-Induced skeletal muscle extracellular matrix remodeling and myofiber growth in mice lacking IL-6. *Acta Physiol.* 2009; 197 (4), 321-332.

11. Almurshed KS & Grunewald K K. Dietary protein does not affect overloaded skeletal muscle in rat. *J.Nutr.* 2000; 130:1743-1748.
12. Yamaguchi A, Ikeda Y, Hirai T, Fugikawa T, Morita I. Local changes of IGF-1 mRNA, GH receptor mRNA, and fiber size in rat plantaris muscle following compensatory overload. *Jpn J Physiol.* 2003; 53(1): 53-60.
13. Sakuma K, Nishikawa J, Nakano H, Sano M, Yasubara M. Serum response factor plays an important role in the mechanically overload plantaris muscle of rats. *Histochem Cell Biol.* 2003; 119 (2): 149-60.
14. Pehme A, Alev K, Julkunen A, Seene T. The effect os mechanical loading on the MyHC synthesis rate and composition in rat plantaris muscle. *J Sports med.* 2004; 25(5): 332-8.
15. Young RE & Young JC. The effect of creatine supplementation on mass and performance of rat skeletal muscle. *Life Sci.* 2007; 81(9): 710-716.
16. Locke M. Heat shock protein accumulation and heat schock transcription factor activation in rat skeletal muscle during compensatory hypertrophy. *Acta Physiol.* 2008; 192 (3): 403-11.
17. Choi H, Selpides IPJ, Novell MM, Rourke BC. Functional overload in ground squirrel plantaris muscle fails to induce myosin isoforms shifts. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2009; 297(3): 578–586.
18. Novack ML, Billich W, Smith S, Sukhija KB, McLoughlin TJ, Hornberger TA, Koh TJ. COX-2 inhibitor reduces skeletal muscle hypertrophy in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2008; 296: R1132-R1139.
19. Huey KA, Burdette S, Zhong H, Roy RR. Early response os heat shock proteins to functional overload of the soleus and plantaris in rats and mice. *Exp Physiol.* 2010; 95:1145-55.
20. Gordon BS, Delgado Dias DC, White JP, Carson JA, Kostec MC. Six1 and Six1 cofactor expression is altered during early skeletal muscle overload in mice. *J Physiol Sci.* 2012; 62(5): 393-401.
21. Schiaffino S, Dyar KA, Ciciliot S, Blaauw B, Sandri M. Mechanisms regulating skeletal muscle grow and atrophy. *FEBS Journal.* 2013; 1-21.
22. Bismuth, K. & Relaix, F. Genetic regulation of skeletal muscle development. *Experimental Cell Research.* 2010; 316:3081-3086.
23. Elliott B, Renshaw D, Getting S, Mackenzie R. The central role of myostatin in skeletal muscle and whole body homeostasis. *Acta Physiol.* 2012; 205:324-340.

24. Glass DJ. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2005; 37:1974-84.
25. Guerci A & Sotiropoulos A. A key factor controlling muscle hypertrophy by enhance the recruitment of muscle stem cells. *Bioarchitecture*. 2012; 2(3): 88-90.
26. Martin NRW & Lewis MP. Satellite cell activation and number following acute and chronic exercise: A mini review. *Cellular and Molecular Exercise Physiology*. 2012; 11: 1-3.
27. Otto A. & Patel K. Signalling and the control of skeletal muscle size. *Exp Cell Research*. 2010; 316: 3059-3066.
28. Ohira Y, Kawano F, Wang DX, Nakai N, Ohira T, Okabe H, Naito H, Goto K. Role(s) of mechanical load and satellite cells in the regulation of the size os soleus muscle fiber in rats. *Biological Scienses in Space*. 2010; 24 (3-4): 135-144.
29. Kawano F, Nakai N, Ohira Y. Regulation os soleus muscle properties by mechanical stress and/or neural activity. *J Phys Sports med*. 2012; 1(1): 29-36.
30. Morgan J E. & Partridge TA. Muscle satellite cells. *The international journal of biochemistry & Cell Biology*. 2003; 35:1151-1156.
31. Stewart CE & Pell JM. Point: IGF is the major physiological regulation os muscle mass. *J Appl Physiol*. 2010; 108:1820-1821.
32. Sakuma K. & Yamaguchi A. The functional role of Calcineurin in hypertrophy, regeneration, and disorders of skeletal muscle. *Journal of Biomedicine and Biotechn*. 2010; ID: 72129.
33. Sakuma K. & Yamaguchi A. Molecular determinants of skeletal muscle hypertrophy in animals. *J Sport medic Dopping Studie*. 2012; S1:002. DOI 10.4172/2161-0673.S1-002.
34. Scharner J. & Zammit PS. The muscle satellite cell at 50: the formative years. *Skeletal Muscle*. 2011; 1(28):1-13.
35. Schadrach JL, Wagers AJ. Stem cells for skeletal muscle repair. *Phil Trans R Soc B*. 2011; 366, doi: 10.1098/rstb.2011.0027.
36. Schmalbruch H. The satellite cell of skeletal muscle fibres. *Braz J morphol Sci*. 2006; 23(2): 159-172.
37. Teixeira CE. & Duarte J.A. Myonuclear domain in skeletal muscle fibers.A critical review. *Arch Exerc Health*. 2011; 2(2): 92-101.
38. Yabolnka-Reuveni Z. The skeletal muscle satellite cell: still young and fascinating at 50. *J Histochem Cytochem*. 2011; 59: 1041-59.

39. West DWD, Burd NA, Staples AW, Phillips SM. Human exercise-mediated skeletal muscle hypertrophy is an intrinsic process. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2010; 42:1371-1375.
40. Wessel T, Haan A, Van der Laarse WJ, Jaspers RT. The muscle fiber type-fiber paradox: hypertrophy or oxidative metabolism? *Eur J Appl Physiol*. 2010; 110: 665-694.
41. Zanou N, Gailly P. Skeletal muscle hypertrophy and regeneration: interplay between the myogenic regulatory factors (MRFs) and insulin-like growth factors (IGFs) pathways. *Cell Mol Life Sci*. 2013; doi: 10.1007/s00018-013-1330-4.
42. Yan Z, Okutsu M, Alhtar YN, Lira V. Regulation of exercise-induced fiber type transformation, mitochondrial biogenesis, and angiogenesis in skeletal muscle. *J Applied Physiol*. 2011; 110 (1): 264-274.
43. Allouh MZ, Yabolnka-Reuveni Z, Rosser BWC. Pax7 reveals a greater frequency and concentration of satellite cells at the ends of growing skeletal muscle fibers. *J Histochem Cytochem*. 2008; 56: 77-87.
44. Allen DL, Harrison BC, Sartorius C, Byrnes WC, Leinwand, LA. Mutation of the IIB myosin heavy chain gene results in muscle fiber loss and compensatory hypertrophy. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001; 280: C637-C645.
45. Aoki MS, Miyabara EH, Soares AG, Salvini TF, Moriscot AS. Cyclosporin-A does not affect skeletal muscle mass during disuse and recovery. *Braz J Med Biol Res*. 2006; 39(2): 243-251.
46. Fuller PM, Baldwin KM, Fuller AA. Parallel and divergent adaptations of rat soleus and plantaris to chronic exercise and hypergravity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2006; 290:R442-R448.
47. Qaisar R, Renaud G, Morine K, Barton ER, Sweeney HL, Larsson L. Is functional hypertrophy and specific force coupled with the addition of myonuclei at the single muscle fiber level? *The FASEB journal*. 2012; 26:1077-1085.
48. Kawano F, Goto K, Wang XD, Terada M, Oshira T, Nakai N, Yoshiota T, Ohira Y. Role(s) of gravitational loading during developing period on the growth of rat soleus muscle fibers. *J Appl Physiol*. 2010; 108:676-85.
49. Seene T, Pehme A, Alev K, Kassik P, Umnova M, Aru M. Effects of resistance training on fast-and slow- twitch muscles in rats. *Biol Sport*. 2010; 27: 221-229.

50. Zhang BT, Yeung SS, Liu Y, Wang HH, Wan YM, Ling SK, Zhang HY, Li YH, Yeung EW. The effects of low frequency electrical stimulation on satellite cell activity in rat skeletal muscle during hindlimb suspension. *BMC Cell Biology*. 2010; 11(87):1-9.
51. Blaauw B, Canato M, Agatea L, Toniolo L, Mammucari C, Masiero E, Abraham R, Sandri M, Schiaffino S, Reggiani C. Inducible activation of Akt increases skeletal muscle mass and force without satellite cell activation. *The Faseb Journal*. 2009; 23: 3896-3905.
52. Chen JF, Tao Y, Li J, Deng Z, Yan Z, Xiao X, Wang DZ. MicroRNA-1 and microRNA-206 regulate skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by repressing Pax7. *JBC*. 2010; 180(5): 887-79.
53. Jacquemim V, Furling AB, Butler-Browne GS, Mouly V. IGF-1 induces human myotube hypertrophy by increasing cell recruitment. *Experimental Cell Research*. 2004; 299:148-158.
54. Shefer G, Wleklinski-Lee M, Yabolnka – Reuveni, Z. Skeletal muscle satellite cells can spontaneously enter an alternative mesenchymal pathway. *J Cell Sciense*. 2004; 117(22):5393-5404.
55. Liadaki K, Casar JC, Wessen M, Luth EC, Jun S, Gussoni E, Kunkel LM. β 4 Integrin marks interstitial myogenic progenitor cells in adult murine skeletal muscle. *J Histochem Cytoche*. 2012; 60: 31-44.
56. Wang, M., Yu, H., Kim, Y.S., Bidwell, C.A., Kuang, S. Myostatin facilitates slow and inhibits fast myosin heavy chain expression during myogenic differentiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2012; 426: 83-88.
57. Ishido M, Kami K, Masuhara M. Localization of MyoD, myogenin and cell cycle regulatory factors in hypertrophying rat skeletal muscle. *Acta Physiol Scand*. 2004; 180:281-289.
58. Kawano F, Matsuoda YO, Higo Y, Terada M, Wang XD, Nakai N, Fukuda H, Imajoh-Ohmi, Oshira Y. Role(s) of nucleoli and phosphorylation of ribosomal protein S6 and/or HSP27 in the regulation of muscle mass. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006; 293: C35-C44.
59. Terada M; Kawano F, Oshira T, Nakai N, Nishimoto N. Effects of mechanical overloading on the properties of soleus muscle fibers, with or without damage, in wild type and Mdx mice. *PLoS ONE*. 2011; 7(4):e.34557.

60. Reynolds IV, TH, Bodine, SC, Lawrence Jr, JC. Control of Ser 2448 phosphorylation in the mammalian target of rapamycin by insulin and skeletal muscle load. *J Biological Chemistry*. 2002; 277(20):17657-17662.
61. Bentzinger CF, Lin S, Romanino K, Castets P, Guridi M, Summermatter S, Handschin C, Tintignac LA, Hall MN, Ruegg MA. Differential response of skeletal muscles to mTORC1 signaling during atrophy and hypertrophy. *Skeletal Muscle*. 2013; 3: 6.
62. Lee WJ, Thompson RW, McClung JM, Carson JA. Regulation of androgen receptor expression at the onset of functional overload in rat plantaris muscle. *Am J Physiol Reg Integr Comp Physiol*. 2003; 285: R1076-R1085.
63. Sakuma K, Watanabe K, Sano M, Uramoto I, Totsuka T. Differential adaptation of growth and differentiation factor 8/myostatin, fibroblast growth factor 6 and leukemia inhibitory factor in overloaded, regenerating and denervated rat muscles. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2000; 1497: 77-88.
64. Dunn SE, Burn JL, Michel RN (1999). Calcineurin is required for skeletal muscle hypertrophy. *J Biol Chem*. 1999; 274(31): 21908-12.
65. Adams GR, Caiozzo VJ, Haddad F, Baldwin M. Cellular and molecular responses to increased skeletal muscle loading after irradiation. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002; 283: C1182-C1195.
66. Armstrong RB, Marum P, Tullson P and Saubert CW. Acute hypertrophic response of skeletal muscle to removal of synergists. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol*. 1979; 46, 835-42.

ANEXO 4

ARTIGO 2 (completo publicado)

“Effects of Low Level Laser in the morphology of the skeletal muscle fiber during Compensatory Hypertrophy in Plantar muscle of rats”

Stella Maris Lins Terena¹, Kristiane Porta Santos Fernandes², Sandra Kalil³, Agnelo Neves Alves¹, Raquel Agnelli Mesquita Ferrari ²

1 Doctoral student in Biophotonics Applied to Health Sciences, Universidade Nove de Julho – UNINOVE, São Paulo – SP, Brazil

2 Full Professor, Rehabilitation Sciences and Biophotonics Applied to Health Sciences, Universidade Nove de Julho – UNINOVE, São Paulo – SP, Brazil

3 Full Professor, Biophotonics Applied to Health Sciences, Universidade Nove de Julho – UNINOVE, São Paulo – SP, Brazil

Corresponding author:

Raquel Agnelli Mesquita-Ferrari

raquel.mesquita@gmail.com

Departamento de Pós Graduação, Mestrado em Ciências da Reabilitação;

Universidade Nove de Julho – UNINOVE

Rua Vergueiro, 249, Liberdade, CEP 01504001

São Paulo – SP, Brazil

Phone/fax number: 55-11-3385-9222.

There is no conflict of interest

Running head: Compensatory Hypertrophy: systematic review

Abstract

The hypertrophy is known as an increase the cross-sectional area of the muscle as a result of a muscular work against an overload, and it is compensatory because the overload is induced by functional elimination of synergistic muscles. The importance of study the compensatory hypertrophy is understand how this process can be influenced by the irradiation with regard to the weight and muscle cross-sectional area, to assist in the rehabilitation process and the effectiveness functional return. The aim was evaluate the effects of low-level laser irradiation on morphological aspects of muscle tissue, comparing the weight and cross-sectional area in rat skeletal muscle. Wistar rats were divided into three groups: control, hypertrophy group without irradiation (right plantar muscle) and hypertrophy group and irradiation (left plantar muscle), both analyzed after 7 and 14 days. The irradiation was performed daily immediately after the surgery. The parameters were: $\lambda = 780\text{nm}$, beam spot of 0.04 cm^2 , output power of 40mW , power density of $1\text{W}/\text{cm}^2$, energy density of $10\text{J} / \text{cm}^2$ and 10s exposure time with a total energy of 3.2 J . The results revealed that low level laser irradiation an increase the weight of the plantaris muscle after 7 and 14 days with a difference of 7.06% and 11.51% respectively. In conclusion, low level laser irradiation has an effect on compensatory hypertrophy to produce increased muscle weight and promoted an increase in cross-sectional area of muscle fibers in the compensatory hypertrophy model after 14 days with parameters cited above.

Key word: compensatory hypertrophy, low-power laser, skeletal muscle

1. Introduction

Skeletal muscle has the ability to change their mass characteristics to meet the changes of functional demands ^{1,2,3}. An example of this hypertrophy is the plasticity, which is necessary to increase the muscle mass to allow the best possible way fulfill the demand being required with regard to generate force against stimulus such as injury training, functional clearing and after atrophy ^{3,4,5,6}.

The compensatory hypertrophy model is widely used being described as the model produces a consistent increase of increased muscle mass and resulting in numerous cellular and molecular mechanisms studied by numerous current jobs. Surgical removal of the synergistic muscles of the plantar muscle movement generates a chronic functional overload which causes rapid hypertrophy involving increase mass, protein synthesis, and enzymatic activation ^{4,5,6,7,8,9}.

The low level laser is considered a modulator tissues, for through its biological effects in different clinical and experimental conditions being able to induce increased proliferation cellular ^{10,11,13}. There are various types of lasers and the most frequently used lie in the optical portion of the red and infrared spectrum ($400\text{ to }780\text{ nm}$ and 780 nm) ^{11,12}.

The action of laser irradiation on the tissues is the absorption of light (photons) by the photoreceptors located in cells that are capable of modulating the specific biochemical and photochemical reactions within the cell and stimulate a cascade of intracellular reactions resulting in an acceleration of the transfer electrons in parts of the respiratory chain occurring so the synthesis of ATP ¹³. The mitochondria appears as the key that involves metabolic adaptation of the muscle fiber during overload. Mitochondrial DNA increases with nuclear transcription factors (NRF-1, NFR-2 and TFAM) that control mitochondrial genes. As a result, stimulated mitochondrial biogenesis in compensatory hypertrophy appears to positively control the overload responses through various routes such as reactive oxygen. The oxygen reative species (ROS), calcineurin and protein-kinase-dependent calcium (CaMKs). As a result of laser action on mitochondria cell division increases interfering in remodeling processes and cellular activities ¹³.

These phenomenons depends on the type of laser, its power, wavelength and irradiation time and there are no studies that used the low level laser in compensatory hypertrophy was not possible to compare the findings in the literature.

2. Objective

The aims of present paper was the evaluate the effects of low level laser irradiation on morphological aspects of muscle tissue, comparing the weight and cross-sectional area in rat skeletal muscle with compensatory hypertrophy.

3. Materials and Methods

3.1 **Animals:** Wistar rats weighing $242,5g \pm 13,59$ were divided into three groups: control ($n=5$) (without plant ablation and without irradiation), hypertrophy group without irradiation ($n=10$) (right plantar muscle) and hypertrophy group and irradiation ($n=10$) (irradiation in the left plantar muscle), both analyzed after 7 and 14 days.

The experiment were carried accordance with the guidelines of the Brazilian National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and of the Animal Research Ethics Committee of the Universidade Nove de Julho (Brazil) under process number AN007/2013.

3.2 **Surgical Procedures:** Animals were anesthetized with intraperitoneal administration of 1ml/Kg of 1% xylazine and 2% ketamine. The ablation model consisted of partial removal of synergist muscles causing overload of plantaris muscle. The surgical procedures are described elsewhere [8]. The plantar muscles were carefully removed and weighed on a precision balance with three decimal places. Morphological aspects were evaluated using H&E staining. The circumference of each fiber marked using ImageJ to generate cross - sectional area was obtained.

3.3 **Irradiation:** The irradiation was performed daily immediately after the surgery with an AlGaAs. The parameters were: $\lambda = 780\text{nm}$, beam spot of 0.04cm^2 , output power of 40mW, power density of $1\text{W}/\text{cm}^2$, energy density of $10\text{J} / \text{cm}^2$ and 10s exposure time with a total energy of 3.2 J. The animals were euthanized at 7 and 14 days.

3.4 **Statistics:** Os dados foram analisados utilizando o software Bioestat 5.0 (PA, Brasil). A distribuição da normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Os dados com distribuição paramétrica foram submetidos ao teste One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey para comparação entre os grupos. Os dados com distribuição não paramétrica foram submetidos ao teste One-way ANOVA on Ranks seguido pelo teste de Dunn's para a comparação entre grupos. Os níveis de confiança foram ajustados para 95% ($p<0.05$).

4. Results

4.1 Muscle weight

Os animais utilizados no estudo apresentaram peso corporal inicial de $242 \pm 13,5\text{ g}$ não havendo diferença significativa quando comparado ao peso final.

Já com relação ao peso do músculo plantar a média foi de $223 \pm 3,78\text{ mg}$ inicialmente sendo verificado um aumento significativo nos grupos com hipertrofia irradiados com LBI (H+LBI) após 14 (* $p<0,05$). Os resultados permitiram também verificar um aumento no peso do músculo plantar no grupo com hipertrofia não irradiado (H) após 14 dias em relação ao grupo controle ($p<0,001$). Foram encontradas diferenças significativas em todos os grupos quando comparados ao controle em todos os períodos avaliados, porém não foram encontradas diferenças significantes entre os grupos irradiados e não irradiados no período de 7 dias (Figure 1).

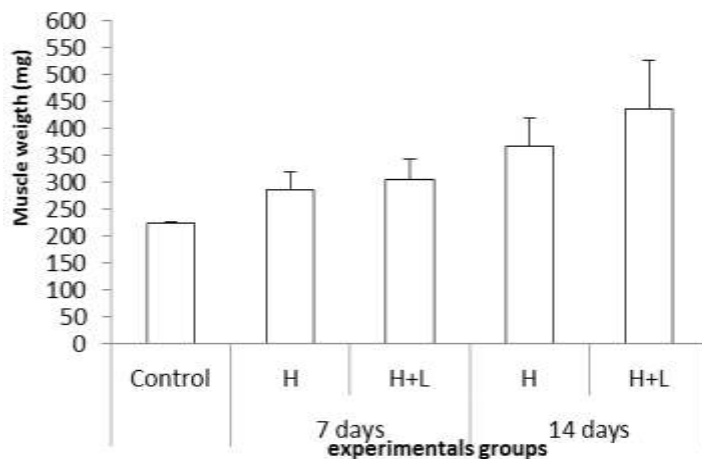


Figure 1: Diferenças entre os grupos com hipertrofia do músculo plantar (H) e os grupos com hipertrofia e com irradiação de LBI (H+LBI) nos períodos de 7 e 14 dias ($p < 0,05$).

4.2 Cross Seccional Area

Os cortes histológicos foram corados com hematoxilina – eosina, fotografados e a imagem capturada foi de 40x (Figure 2). A circunferência de cada fibra foi marcada usando o programa Image J para gerar a Área de Secção Transversa de cada fibra (AST). O critério para mensurar a área foi incluir fibras intactas, com membranas celulares sem distorções e fibras alongadas foram excluídas.

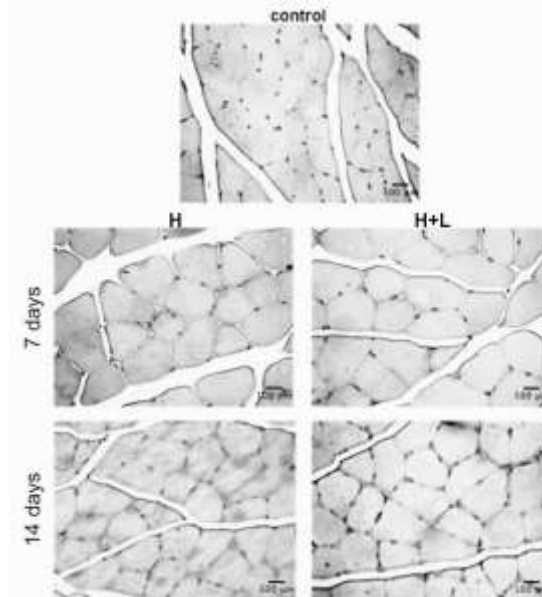


Figure 2: Cortes transversais das fibras muscular do músculo plantar de ratos coradas com hematoxilina-eosina.

Os resultados permitiram verificar uma diferença significativa entre a AST do grupo irradiado (H+LBP) por 14 dias e o grupo não irradiado (H) pelo mesmo período ($*p < 0,001$). Foram encontradas diferenças significativas em todos os grupos comparados ao controle em todos os períodos, porém não houve diferença entre os grupos irradiados (H+LBP) por 7 dias e o grupo não irradiado (H) pelo mesmo período (Figure 3).

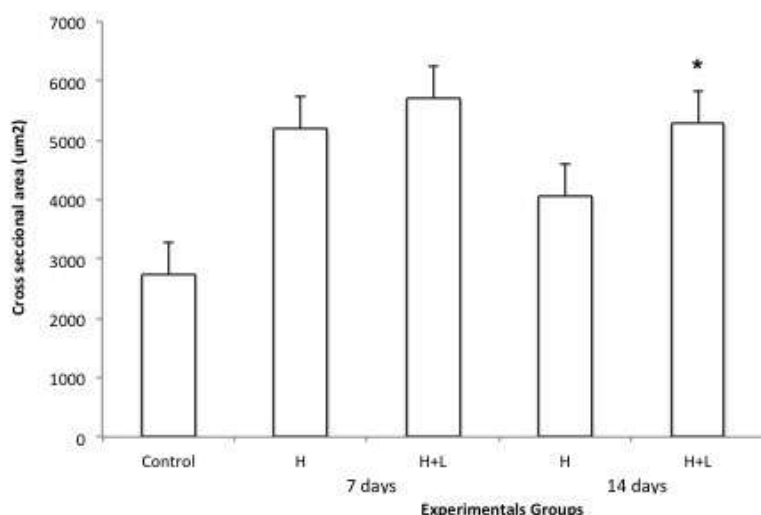


Figure 3: Diferenças entre a área de secção transversa das fibras musculares

dos grupos com hipertrofia do músculo plantar (H) e os grupos com

hipertrofia e com irradiação de LBI (H+LBI) nos períodos de 7 e 14 dias ($p < 0,05$).

5. Discussion

Em estudos com modelo de ablação dos sinergistas, as adaptações e mecanismos celulares e moleculares que ocorrem na sobrecarga funcional são claramente diferentes dos que ocorrem com o treinamento e exercício⁹. As alterações induzidas pelo modelo de sobrecarga no músculo plantar de ratos resultaram no significativo aumento da massa muscular (chegando a um aumento de 10% a 30% no corte transversal das fibras musculares segundo Schuenke *et al.*, 2011 e proporcional aumento do número de mionúcleos. Estudos atuais¹⁵ demonstram significantes evidências que os mionúcleos novos são advindos de células satélites que foram ativadas, proliferaram e se fundiram a fibras pré-existentes para possibilitar a hipertrofia.

As células satélites (CS) são conhecidas como células residentes miogênicas mononucleadas quiescentes, situadas entre o sarcolema e a membrana basal das fibras musculares, que são ativadas durante processos de regeneração e sobrecarga funcional. Uma vez ativadas, a CS saem do seu estado quiescente e seguem uma sequência de eventos que incluem: a) proliferação; b) diferenciação e migração e a c) fusão com a fibra adulta ou formação de nova fibra^{7,8}.

A cascata reguladora de proliferação e diferenciação das CS tem sido cada vez mais estudada pois estes processos relacionam-se diretamente e influenciam o aumento da área de secção transversa da fibra muscular como resultado da necessidade de remodelamento tecidual à uma sobrecarga crônica⁵.

Há controvérsias sobre a real participação das CS durante a hipertrofia compensatória uma vez que estudos demonstram que na ausência destas células houve aumento do tamanho da fibra⁵. No entanto, o modelo de ablação dos sinergistas é o que causa imediata proliferação e fusão de CS com consequente aumento do número de mionúcleos como demonstrado por vários autores.

6. Conclusion

In conclusion, low level laser irradiation has an effect on compensatory hypertrophy to produce increased muscle weight. It was possible to conclude that LLL irradiation, wavelength 780 nm and parameters cited above, promoted an increase in cross-sectional area of muscle fibers in the compensatory hypertrophy model after 14 days.

7. References

- [1] Allen, D.L.; Harrison, B.C.; Sartorius, C.; Byrnes, W.C.; Leinwand, L.A. 2001 Mutation of the IIB myosin heavy chain gene results in muscle fiber loss and compensatory hypertrophy. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001: 280: C637-C645.
- [2] Bodine, S.C.; Stitt, T.N.; Gonzalez, M.; Kline, W.O.; Stover, G. L.; Bauerlein, R.; Zlotchenko, E.; Scringeour, A.; Lawrence, J.C.; Glass, D.J.; Yancopoulos, G.D. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nature Cell Biol*. 2001: v. 3, p. 1014-19.
- [3] DiPasquale, D. M.; Cheng, M.; Billich, W.; Huang, S.A.; Rooijen, N.; Hornberger, T.A.; Koh, T.J. Urokinase – type plasminogen activator and macrophages are required for skeletal muscle hypertrophy in mice *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007: 293, p. 1278-85.
- [4] Dunn, S.E.; Burns, J.L.; Michel, R.N. Calcineurin is required for skeletal muscle hypertrophy *J Biol Chem*. 1999: 274 (31): p.21908-12.
- [5] McCarthy, J.J.; Mula, J.; Miyasaki, M.; Erfani, R.; Garrison, K.; Farooki, A.B.; Srikuera, R.; Lawson, B.A.; Grimes, B.; Keller, C.; Zant, G.V.; Campbell, K. S.; Esser, K.A.; Dupont-Versteegden, E.E.; Peterson, C.A. 2011 Effective fiber hypertrophy in satellite cell-depleted skeletal muscle *Development*. 2011: 138, p. 3657-66.
- [6] Huey, K.A.; Burdette, S.; Zhong, H.; Roy, R.R. Early response os heat shock proteins to functional overload of the soleus and plantaris in rats and mice *Exp Physiol*. 2010: 95, p. 1145-55.
- [7] Goodman, C.A; Kotecki, J.A.; Jacobs, B.L.; Hornberger, T.A. Muscle fiber type-dependent differences in the regulation of protein synthesis *PLoS ONE* . 2012: 7(5): e37890.
- [8] Terada, M.; Kawano, F.; Oshira, T.; Nakai, N.; Nishimoto, N. Effects os mechanical over-loading on the properties of soleus muscle fibers, with or without damage, in wild type and Mdx mice *PLoS ONE*. 2011: 7(4), e.34557
- [9] Adams, G.R.; Haddad, F.; Baldwin, K. M. Time course of changes in markers of myogenesis in overload rat skeletal muscles *J Appl Physiol*. 1999: 87, p.1705-12.

- [10] AlGhandi KM, Kumar A, Moussa NA. Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. *Lasers Med Sci.* 2012; 27(1): 237-49.
- [11] Fujihara NA, Hiraki KR, Marques MM. Irradiation at 780 nm increases proliferation rate of osteoblasts independently of dexamethasone presence. *Lasers Surg Med.* 2006; 38, n. 4, p. 332-36.
- [12] Mesquita-Ferrari RA; Martins MD, Silva JA Jr., Da Silva TD, Piovesan RF, Pavesi VC *et al.* Effects of low-level laser therapy on expression of TNF- α and TGF- β in skeletal muscle during the repair process. *Lasers Med Sci.* 2011; 26:335-40.
- [13] Stein A, Benayahu D, Maltz L, Oron U. Low level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. *Photomed. Laser Surg.* 2005; 23:161–166.
- [14] Wang, M.; Yu, H.; Kim, Y.S.; Bidwell, C.A.; Kuang, S. 2012 Myostatin facilitates slow and inhibits fast myosin heavy chain expression during myogenic differentiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2012: 426:p.83-88.
- [15] Schuenke, M.D.; Brooks, N.E.; Hikida, R.S. Interactions of aging, overload and creatine supplementation in rat plantaris muscle *J Aging Research.* 2011: ID 393416.