

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

**EVALDO MOREIRA DA SILVA JUNIOR**

**“PROCESSO INFLAMATÓRIO DURANTE O REPARO DO MÚSCULO**  
**ESQUELÉTICO EM IDOSOS: O PAPEL DA FOTOBIMODULAÇÃO”**

**São Paulo**

**2019**

**EVALDO MOREIRA DA SILVA JUNIOR**

**“PROCESSO INFLAMATÓRIO DURANTE O REPARO DO MÚSCULO  
ESQUELÉTICO EM IDOSOS: O PAPEL DA FOTOBIMODULAÇÃO”**

Tese apresentada à Universidade Nove de Julho como pré-requisito para a obtenção do grau de doutor em Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Kristianne Porta Santos Fernandes

**São Paulo**

**2019**

Silva Junior, Evaldo Moreira da.

Processo inflamatório durante o reparo do músculo esquelético em idosos: o papel da fotobiomodulação / Evaldo Moreira da Silva Junior. 2019.

62 f.

Tese (Doutorado) - Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2019.

Orientador (a): Dra. Prof. Kristianne Porta Santos Fernandes.

1. Envelhecimento. 2. Fotobiomodulação. 3. Macrófagos. 4. Citocinas. 5. Reparo Muscular.

I. Fernandes, Kristianne Porta Santos.

II. Título.

CDU 615.831

S1o Paulo, 07 de fevereiro de 2019

**TERMO DE APROVAC AO**

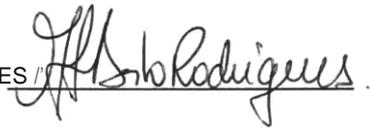
Aluno (a): Evaldo Moreira da Silva Junior

Titulo da Tese: Efeitos da fotobiomodulagão sobre o processo inflamatorio durante o feparo do musculo esquelético em ratos idosos"

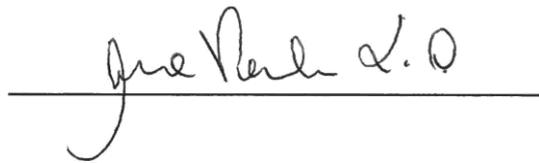
Presidente PROF°. DRª. KRISTIANNE PORTA SANTOS FERNANDES



Membro: PROF°. DR°. MARIA FERNANDA SETUBAL DESTRO RODRIGUES



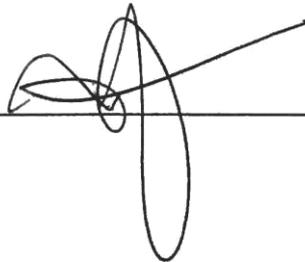
Membro: PROF°. DR.º ANA PAULA LIGEIRO DE OLIVEIRA



Membro: PROF". DR°. ANA CLAUDIA MUNIZ RENNO



Membro: PROF. DR. RICARDO RAITZ



## DEDICATÓRIA

*Dedico aos meus pais, Evaldo e Maria, por todo incentivo, compreensão, apoio e amor incondicional em todos os momentos da minha vida. A vocês, minha eterna gratidão e admiração.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiro, agradeço a *Deus*, pelo dom da vida e por me acompanhar em todas as etapas, sem nunca me desamparar.

A minha orientadora, *Profa. Dra. Kristianne Porta Santos Fernandes*, que esteve presente em todas as etapas durante a execução desse trabalho, por toda paciência, incentivo, ensinamentos e dedicação, a quem devo minha caminhada até aqui. Agradeço pela confiança em mim depositada durante essa trajetória. Aproveito e registro minha admiração, que a faz como um exemplo de profissional e pessoa a seguir.

A *Profa. Dra. Maria Fernanda Setúbal Destro Rodrigues*, por todos os ensinamentos, paciência e dedicação. Registro aqui toda minha admiração e agradecimento pelo conhecimento transmitido.

Aos demais *professores* do programa de pós-graduação em Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde da UNINOVE, pelo convívio e ensinamentos, que contribuíram de forma grandiosa na minha formação.

A *Billi*, por todo incentivo e compreensão ao longo dessa trajetória, os quais foram fundamentais para a realização desse sonho. Por ser peça fundamental na minha vida, sempre acreditando em mim.

As minhas irmãs, *Elaine, Eliane e Evelyn* por todo amor e incentivo que me fazem mais forte diante das adversidades.

Aos meus pais, *Evaldo e Maria*, por todo apoio, incentivo e amor. Eles são minha base, a quem devo tudo que sou hoje.

As minhas sobrinhas, *Natasha e Giovana*, por todo amor e incentivo.

Ao pequeno *Samuel*, que ainda não chegou, mas já me torna mais forte e decidido a ser melhor a cada dia.

A minha amiga Kaline, companheira de laboratório, peça fundamental durante essa caminhada.

Aos alunos de iniciação, Eric e Loriana, que foram fundamentais durante diversos experimentos.

A Nadhia e ao Agnelo, por toda a ajuda nas cirurgias.

Ao técnico Eduardo, por toda ajuda na imunohistoquímica.

Ao meu amigo, o Prof. *Marcelo Corral* pelos ensinamentos e incentivo para os estudos.

Aos demais *colegas* e *funcionários* do laboratório.

A *UNINOVE* por fornecer toda a estrutura necessária para a realização dessa pesquisa e por me fornecer bolsa de estudos.

*“Se podemos sonhar, podemos tornar nossos  
sonhos realidade”*

*Walt Disney*

## RESUMO

A interação entre o sistema imune e o tecido determina o êxito do reparo muscular após a ocorrência de lesões. Com o envelhecimento, porém, a sarcopenia e a imunosenescência tornam este processo mais lento e por vezes incompleto, indicando a necessidade de recursos terapêuticos mais eficientes. Existem evidências de que a fotobiomodulação (FBM) potencializa o reparo muscular em animais jovens, mas seu efeito ainda foi pouco avaliado em idosos. Esse trabalho visa identificar se existe diferença entre jovens e idosos no que se refere à composição das células do infiltrado inflamatório presente no tecido muscular após lesão aguda, bem como elucidar o papel da FBM sobre estes componentes e seus produtos em animais idosos. Para isso, 30 ratos Wistar, com 20 meses de idade, foram submetidos a criolesão no músculo tibial anterior (TA), sendo a metade tratada com FBM. A criolesão foi realizada com duas aplicações diretas de um bastão metálico resfriado em nitrogênio líquido. Outros 15 ratos Wistar (2 meses de idade) também foram submetidos a criolesão. A FBM (780nm, 40mW, 3,2J) foi aplicada diariamente em 8 pontos (10 segundos/ponto) nos animais idosos. Após 1, 3 e 7 dias, os músculos dos animais jovens e idosos (tratados ou não com FBM) foram avaliados quanto a presença de neutrófilos (elastase+) e de macrófagos de fenótipo M1 e M2 (CD68+; CD206+). Nos músculos dos animais idosos (tratados ou não com FBM) também foi avaliada a expressão de *IL-6*, *TNF- $\alpha$*  e *TGF- $\beta$*  (por qPCR) e de VEGF (por imunohistoquímica). A análise comparativa entre os animais jovens e idosos demonstrou uma presença menor de neutrófilos e de macrófagos M1 e M2 após 1 dia no músculo dos animais idosos. Já após 3 dias, os idosos continuam apresentando quantidade menor somente de macrófagos M2, enquanto que após 7 dias da lesão, o número de macrófagos M1 passa a ser maior nos ratos idosos. Nos músculos de animais idosos tratados com FBM, foi possível observar um menor número de neutrófilos após 1 dia de tratamento e um maior número de macrófagos M1 e M2 após 3 dias de tratamento. Já após 7 dias de tratamento, a quantidade de macrófagos dos dois perfis foi menor nos músculos irradiados. A FBM também gerou aumento na expressão genica de *IL-6*, *TNF- $\alpha$*  e *TGF- $\beta$*  após 3 dias de tratamento, sendo que somente a expressão de *TNF- $\alpha$*  se manteve aumentada neste grupo após 7 dias de tratamento. A imunomarcagem de VEGF também se mostrou aumentada no grupo tratado com FBM nos períodos de 3 e 7 dias. As alterações encontradas na

composição do infiltrado inflamatório nos músculos dos indivíduos idosos certamente colaboram para o prolongamento do processo inflamatório e o comprometimento do reparo deste tecido quando comparado ao que ocorre com jovens. A FBM torna a composição do infiltrado inflamatório e de seus produtos cronologicamente mais próximas das observadas em animais jovens, o que ampliaria a chance da ocorrência de um reparo melhor e mais rápido em idosos.

**Palavras chave:** Envelhecimento, fotobiomodulação, macrófagos, citocinas, reparo muscular.

## ABSTRACT

The interaction between the immune system and the tissue determines the success of the muscle repair after the occurrence of injuries. With aging, however, sarcopenia and immunosenescence make this process slower and sometimes incomplete, indicating the need for more efficient therapeutic resources. There is evidence that photobiomodulation (FBM) potentiates muscle repair in young animals, but its effect has still been poorly evaluated in the elderly. This work aims to identify if there is a difference between young and old in the composition of the cells of the inflammatory infiltrate present in muscle tissue after acute injury, as well as to elucidate the role of FBM on these components and their products in elderly animals. For this, 30 Wistar rats, 20 months old, underwent cryoinjury in the anterior tibialis muscle (TA), the half treated with FBM. Creoles were performed with two direct applications of a metallic stick cooled in liquid nitrogen. Another 15 Wistar rats (2 months old) also underwent cryosurgery. The FBM (780nm, 40mW, 3,2J) was applied daily in 8 points (10 seconds / point) in the elderly animals. After 1, 3 and 7 days, the muscles of young and old animals (treated or not with FBM) were evaluated for the presence of neutrophils (elastase +) and macrophages of phenotype M1 and M2 (CD68 +; CD206 +). The expression of IL-6, TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$  (by qPCR) and VEGF (by immunohistochemistry) was also evaluated in the muscles of the elderly animals (treated or not with FBM). The comparative analysis between young and old animals showed a lower presence of neutrophils and macrophages M1 and M2 after 1 day in the muscle of the elderly animals. After 3 days, the elderly continue to present only minor amounts of M2 macrophages, whereas after 7 days of injury, the number of M1 macrophages becomes greater in the elderly rats. In the muscles of elderly animals treated with FBM, it was possible to observe a lower number of neutrophils after 1 day of treatment and a larger number of macrophages M1 and M2 after 3 days of treatment. Already after 7 days of treatment, the amount of macrophages of the two profiles was lower in the irradiated muscles. FBM also generated an increase in the expression of IL-6, TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$  after 3 days of treatment, with TNF- $\alpha$  expression only being maintained in this group after 7 days of treatment. Immunoblotting of VEGF was also increased in the FBM-treated group at the 3 and 7 day periods. The alterations found in the composition of the inflammatory infiltrate in the muscles of the elderly certainly contribute to the prolongation of the inflammatory

process and the repair impairment of this tissue when compared to that of young people. FBM makes the composition of the inflammatory infiltrate and its products chronologically closer to those observed in young animals, which would increase the chance of a better and faster repair in the elderly.

**Key words:** Aging, photobiomodulation, macrophages, cytokines, muscle repair.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS .....	15
LISTA DE FIGURAS .....	16
LISTA DE ABREVIATURAS.....	16
1. INTRODUÇÃO .....	18
1.1. PAPEL DAS CÉLULAS INFLAMATÓRIAS NO REPARO DO MÚSCULO ESQUELÉTICO.....	19
1.2. CÉLULAS INFLAMATÓRIAS NO REPARO DO MÚSCULO ESQUELÉTICO EM IDOSOS.....	21
1.3. PAPEL DA FOTOBIMODULAÇÃO (FBM) NO REPARO MUSCULAR.....	23
2. JUSTIFICATIVA .....	25
3. OBJETIVO.....	26
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
4.1. AVALIAÇÃO <i>IN VIVO</i> .....	27
4.1.1. Animais .....	27
4.1.2. Procedimento de criação.....	28
4.1.3. Fotobiomodulação (FBM) .....	29
4.1.4. Eutanásia dos animais e remoção dos músculos .....	30
4.2. IMUNOMARCAÇÃO (ELASTASE, CD68, CD206 E VEGF).....	30
4.3. ANÁLISE DA PRESENÇA DE NEUTRÓFILOS E DIFERENTES FENÓTIPOS DE MACRÓFAGOS .....	32
4.3.1. Quantificação da imunomarcação de VEGF .....	32
4.4. EXPRESSÃO GÊNICA DE TNF-A, TGF-B E IL-6.....	33
4.4.1. Extração e controle da qualidade do RNA total .....	33
4.4.2. Síntese do DNA Complementar (cDNA).....	34
4.4.3. PCR em tempo real quantitativo (qPCR) .....	34
4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	35
5. RESULTADOS .....	36
5.1. COMPARATIVO DA EXPRESSÃO DE ELASTASE (NEUTRÓFILOS) ENTRE ANIMAIS JOVENS E IDOSOS .....	36

<b>5.2. COMPARATIVO DA EXPRESSÃO DE CD68 (MACRÓFAGOS M1) ENTRE ANIMAIS JOVENS E IDOSOS .....</b>	<b>36</b>
<b>5.3. COMPARATIVO DA EXPRESSÃO DE CD206 (MACRÓFAGOS M2) ENTRE ANIMAIS JOVENS E IDOSOS .....</b>	<b>37</b>
<b>5.4. EFEITO DA FBM NA EXPRESSÃO DE ELASTASE (NEUTRÓFILOS) EM ANIMAIS IDOSOS .....</b>	<b>38</b>
<b>5.5. EFEITO DA FBM NA EXPRESSÃO DE CD68 (MACRÓFAGOS M1) EM ANIMAIS IDOSOS .....</b>	<b>39</b>
<b>5.6. EFEITO DA FBM NA EXPRESSÃO DE CD206 (MACRÓFAGOS M2) EM ANIMAIS IDOSOS .....</b>	<b>40</b>
<b>5.7. EFEITO DA FBM NA EXPRESSÃO DE VEGF EM ANIMAIS IDOSOS.....</b>	<b>41</b>
<b>5.8. IMUNOMARCAÇÃO NOS GRUPOS CONTROLES.....</b>	<b>42</b>
<b>5.9. EFEITO DA FBM NA EXPRESSÃO DE RNAM DE IL-6 EM ANIMAIS IDOSOS .....</b>	<b>42</b>
<b>5.10. EFEITO DA FBM NA EXPRESSÃO DE RNAM DE TNF-A EM ANIMAIS IDOSOS .....</b>	<b>43</b>
<b>5.11. EFEITO DA FBM NA EXPRESSÃO DE RNAM DE TGF-B EM ANIMAIS IDOSOS .....</b>	<b>43</b>
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>45</b>
<b>7. CONCLUSÕES .....</b>	<b>50</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>52</b>
<b>9. ANEXOS.....</b>	<b>62</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Parâmetros dosimétricos da irradiação.....	27
<b>Tabela 2.</b> Anticorpos que foram utilizados.....	30
<b>Tabela 3.</b> Primers utilizados.....	33

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Percentual de neutrófilos e macrófagos de fenótipo M1 e M2 presentes no tecido muscular de indivíduos jovens após a ocorrência da lesão...	18
<b>Figura 2.</b> Fluxograma da parte experimental	25
<b>Figura 3.</b> Procedimento de criolesão.....	27
<b>Figura 4.</b> Técnica pontual.....	28
<b>Figura 5.</b> Exemplo de cálculo da área de marcação pelo DAB.....	31
<b>Figura 6.</b> Comparativo na expressão de elastase entre animais jovens x idosos.	34
<b>Figura 7.</b> Comparativo na expressão de CD68 entre animais jovens x idosos.....	35
<b>Figura 8.</b> Comparativo na expressão de CD206 entre animais jovens x idosos..	35
<b>Figura 9.</b> Avaliação por imunohistoquímica de células elastase+.....	36
<b>Figura 10.</b> Avaliação por imunohistoquímica de células CD68+.....	37
<b>Figura 11.</b> Avaliação por imunohistoquímica de células CD206+.....	38
<b>Figura 12.</b> Gráfico comparativo entre jovens, idosos e tratados.....	39
<b>Figura 13.</b> Avaliação por imunohistoquímica da expressão de VEGF.....	39
<b>Figura 14.</b> Imagens histológicas do grupo controle.....	40
<b>Figura 15.</b> Expressão gênica quantitativa de <i>IL-6</i> .....	40
<b>Figura 16.</b> Expressão gênica quantitativa de <i>TNF-<math>\alpha</math></i> .....	41
<b>Figura 17.</b> Expressão gênica quantitativa de <i>TGF-<math>\beta</math></i> .....	42

## LISTA DE ABREVIATURAS

- CD – Grupamento de diferenciação (do inglês, *cluster of differentiation*)
- CEUA - Comitê de ética no uso de animais
- CPM – Células precursoras miogênicas
- DAB – diaminobenzidina
- DEPC (Dimetil pirocarbonato)
- DNA – Ácido desoxirribonucleico
- FBM – Fotobiomodulação
- GAPDH - Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
- HE - hematoxilina eosina
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- IFN- $\gamma$  - interferon gamma
- IL – interleucina
- MMP – Metaloproteinase de matriz
- MPO – Mieloperoxidase
- NO - óxido nítrico (do inglês, *nitric oxide*)
- RGB – Vermelho, verde e azul (do inglês, *red, green e blue*)
- RNA – Ácido ribonucleico
- RNA<sub>m</sub> - ácido ribonucleico mensageiro
- SIS – Síntese de indicadores sociais
- TA - tibial anterior
- TAD - tibial anterior direito
- TGF- $\beta$  - fator de crescimento transformador  $\beta$  (do inglês, *Transforming Growth Factor*)
- TNF- $\alpha$  - fator de necrose tumoral  $\alpha$  (do inglês, *Tumor Necrosis Factor*)
- VEGF - fator de crescimento vascular endotelial (do inglês, *Vascular Endothelial Growth Factor*)

## 1. INTRODUÇÃO

A síntese de indicadores sociais (SIS) de 2016 apresentada pelo IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) aponta que entre 2005 e 2015, a proporção de pessoas com mais de 60 anos de idade, no Brasil, cresceu em velocidade superior à média mundial, saindo de 9,8% para 14,3% estimando-se que até 2025 o número de pessoas com mais de 60 anos chegue a 31,8 milhões, enquanto esse número limitava-se a 2 milhões de pessoas no ano de 1950 <sup>1</sup>. As projeções atuais da Organização Mundial da Saúde estimam que até 2050 a população mundial considerada idosa (>60 anos) será triplicada, saltando de 650 milhões para até 2 bilhões (aproximadamente 22% da população global), pela primeira vez haverá mais idosos que crianças menores que 15 anos. Esse aumento contínuo da população idosa representa um grande desafio aos serviços de saúde <sup>2</sup>.

No que concerne à musculatura esquelética, por exemplo, o envelhecimento leva a uma diminuição da massa muscular, definida como sarcopenia <sup>3-6</sup>, sendo essa uma das principais causas do declínio progressivo da sua capacidade funcional <sup>7</sup>.

Como consequência, a redução da força e da disposição física, aumentam as chances de restrição às atividades associadas ao trabalho bem como às sociais <sup>4,8,9</sup>.

Com a diminuição do estado funcional e a mobilidade prejudicada, há um maior risco de quedas e lesões <sup>10</sup>, sendo as lesões de ordem musculoesquelética as mais comuns entre idosos <sup>11</sup>.

Após a ocorrência de uma lesão, o músculo passará por um processo denominado reparo muscular que envolve fases interdependentes, que podem ser agrupadas em fase inflamatória, proliferativa e de remodelamento. Todo esse processo é orquestrado por células inflamatórias, com destaque para os neutrófilos e macrófagos, que direcionam também a ativação e diferenciação das células precursoras miogênicas (CPM) <sup>12-14</sup>.

A literatura descreve que o processo de reparo muscular é menos efetivo em idosos e que essa deficiência deve estar associada tanto às alterações na ativação e diferenciação das CPM como às alterações nas células inflamatórias do sistema imune <sup>15-23</sup>.

## 1.1. PAPEL DAS CÉLULAS INFLAMATÓRIAS NO REPARO DO MÚSCULO ESQUELÉTICO

Após a ocorrência da lesão são os neutrófilos os primeiros leucócitos a chegar ao tecido. Além da fagocitose essas células são responsáveis pela liberação de citocinas de caráter pró-inflamatório, radicais livres e enzimas, como a mieloperoxidase (MPO) e as metaloproteinases de matriz (MMPS). Essas substâncias ao serem liberadas auxiliam na eliminação e degradação de restos celulares oriundos da lesão e do processo inflamatório <sup>12;24-27</sup>.

Estima-se que os neutrófilos (figura 1) cheguem ao tecido nas primeiras horas após à lesão muscular e atinjam seu pico numérico em até 24 horas, quando sua presença decai rapidamente, sendo escassos após 36 a 48 horas <sup>13,26</sup>.

Os macrófagos com perfil inflamatório/fagocítico (M1) chegam ao tecido lesionado e atingem concentrações elevadas nas primeiras 24 horas (figura 1) após as lesões aumentando em número, até cerca de 2 dias, quando sua presença atinge o pico e então começa a declinar <sup>13,26</sup>. Estas células estão associadas a áreas teciduais onde há proliferação de células precursoras miogênicas, estimulando a sua proliferação e prevenindo sua diferenciação e fusão <sup>26</sup>.

Os macrófagos M1 são ativados classicamente pelas citocinas de perfil Th1, como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . Além de participarem na remoção de restos celulares, os macrófagos M1 geram agentes oxidantes como o óxido nítrico (NO), produtos como IL-6, IL-1 $\beta$ , VEGF, IL-13, altos níveis de TNF- $\alpha$  <sup>13;14,25,28,29</sup> e enzimas como as MMPS <sup>30-32</sup>.

O fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) atua no recrutamento de neutrófilos e de macrófagos ao sitio da lesão, amplificando o quadro inflamatório <sup>33</sup>. A interleucina 6 (IL-6), atua durante a inflamação inicial, desempenhando papel importante na modulação, proliferação, diferenciação e fusão de novas células musculares <sup>34,35</sup>. Já o fator de crescimento endotelial (VEGF) é um importante regulador da angiogênese, sendo altamente mitogênico para as células endoteliais, possibilitando que novos capilares se diferenciem na direção da área lesionada, auxiliando na chegada de oxigênio e outros componentes importantes para o processo regenerativo <sup>36-38</sup>.

A fase inflamatória mediada principalmente por neutrófilos e macrófagos é fundamental para a regeneração bem-sucedida do músculo esquelético. No entanto,

a exacerbação ou a manutenção do quadro inflamatório pode comprometer a recuperação muscular <sup>13</sup>.

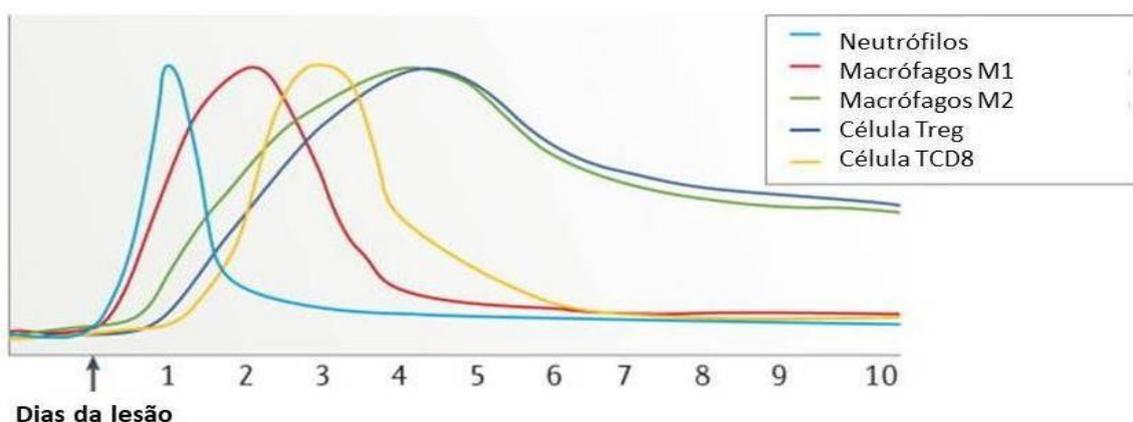
Aproximadamente no terceiro/quarto dia após a lesão, uma população de macrófagos de perfil não fagocítico, denominados M2, começa a atingir concentração elevada no músculo e perdura na área lesionada por muitos dias

<sup>13,14,27,29</sup>.

A mudança no fenótipo da maioria dos macrófagos que povoam o tecido muscular após a lesão, de M1 (inflamatório) para M2 (anti-inflamatório, reparador) é um evento chave no reparo tecidual. Essa transição acontece de acordo com a redução de produtos inflamatórios e o conseqüente aumento de produtos anti-inflamatórios (como IL-4, IL10, IL-13 e TGF- $\beta$ ) que irão induzir a presença majoritária de macrófagos de perfil M2 <sup>13,14,27</sup>.

Os macrófagos M2 produzem níveis elevados de produtos que podem ter caráter anti-inflamatório como IL-4, IL-10, TGF- $\beta$  e a enzima arginase que converte arginina (substrato para a síntese de NO) em ornitina e uréia. Este fenótipo é majoritário nas áreas musculares em regeneração onde ocorre a diferenciação de células precursoras miogênicas que levará à regeneração das fibras lesionadas <sup>26</sup>. Além disso, a ação dos macrófagos M2 irá reduzir a produção espécies reativas de oxigênio (NO e outras) e de enzimas, além de alterar o estado de ativação dos macrófagos M1 diminuindo os danos que podem ser causados por uma exacerbação ou pela presença prolongada do quadro inflamatório no sitio da lesão

<sup>13,14,29,39</sup>.



**Figura 1.** Percentual de neutrófilos (PMN) e macrófagos de fenótipo M1 e M2 presentes no tecido muscular de indivíduos jovens após a ocorrência da lesão (Adaptada de: Tidball, 2017).

O fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ) está envolvido em diversos processos durante o reparo muscular, desde a intensificação da inflamação pós lesão até o processo de fibrose, podendo assumir atividade pró ou anti-inflamatória dependendo da fase do reparo <sup>32</sup>. A atividade pró-inflamatória está ligada à sua atividade quimiotática para macrófagos e linfócitos, além indução da maturação e da síntese de TNF- $\alpha$  em monócitos <sup>40</sup>. Por outro lado, o TGF- $\beta$  é capaz de induzir a deposição progressiva da MEC e elevar a possibilidade de fibrose no tecido, levando a um reparo incompleto se permanecer elevado por períodos prolongados <sup>32,41</sup>.

Uma transição fenotípica de M1 para M2 lenta e/ou um número muito elevado de macrófagos M2 também favorecem a substituição de fibras musculares por tecido fibroso <sup>13,42</sup>. Assim o controle temporal da presença dos diversos fenótipos de células imunes é fundamental para o sucesso do reparo.

## **1.2. CÉLULAS INFLAMATÓRIAS NO REPARO DO MÚSCULO ESQUELÉTICO EM IDOSOS**

Assim como na musculatura jovem, o processo de reparo do músculo esquelético em idosos depende da ação conjunta das células imunes e das CPM <sup>2,23</sup>.

No entanto, com o avanço da idade, ocorrem alterações significativas na composição e nas funções das células imunes, processo que pode ser denominado de imunosenescência <sup>21,43,44</sup>, muitas vezes caracterizado pela capacidade reduzida em responder a novos antígenos e um nível persistente de inflamação de baixo grau <sup>4,23,44,45,46</sup>. Porém efeito destas alterações sobre o processo de reparo muscular ainda não está bem elucidado e descrições muitas vezes contraditórias sobre o estado de imunosenescência <sup>4,23,46</sup>.

Com relação aos neutrófilos, por exemplo, existem relatos que relacionam o envelhecimento à diminuição do número de neutrófilos na circulação, enquanto outros não relatam alterações nesta quantificação <sup>23,47</sup>. Por outro lado, há relatos que indicam que as principais funções destas células (fagocitose, ação bactericida e quimiotactismo) estariam diminuídas com o envelhecimento <sup>23,48,49</sup>.

Especificamente no reparo do músculo esquelético, Ghaly & Marsh (2010) relataram acentuada diminuição da expressão proteica da enzima mieloperoxidase (marcador de neutrófilos) do primeiro para o terceiro dia após lesão por contusão em ratos idosos <sup>50</sup>. E recentemente, um estudo que avaliou a presença de neutrófilos no

tecido muscular de camundongos idosos após 2 e 5 dias da ocorrência de lesão, demonstrou que o número de neutrófilos foi maior no período de 2 dias, chegando a níveis basais no período de 5 dias <sup>51</sup>.

Com relação aos macrófagos, também existe grande discrepância nos relatos <sup>23</sup>, sendo descrito por exemplo aumento, diminuição ou ausência de alteração na capacidade de fagocitose e na produção de citocinas por estas células com o avanço da idade, e predominância ou não dos diferentes fenótipos de macrófagos <sup>21,23,51-55</sup>.

Foi relatado por exemplo que, no estado basal, os músculos de indivíduos idosos possuem menos macrófagos inflamatórios, mas a mesma quantidade de macrófagos de perfil anti-inflamatório que os de indivíduos jovens. Entretanto, a expressão de citocinas de perfil pró-inflamatório e anti-inflamatório seria maior nos músculos de idosos <sup>4,56</sup>. Outro estudo já demonstrou que o número de macrófagos de perfil M2 é maior nos músculos de indivíduos idosos <sup>42</sup>.

Já após uma lesão por exercício, segundo Hamada e colaboradores (2005), o número de macrófagos de perfil pró-inflamatório e anti-inflamatório e a expressão de citocinas aumentariam no músculo dos indivíduos jovens, mas não seriam alterados em idosos <sup>56</sup>. Outro estudo, indicou ainda que a expressão de citocinas pró-inflamatórias, 2h após uma lesão, foi maior em indivíduos idosos do que em jovens <sup>57</sup>.

Ghaly&Marsh (2010) relataram acentuado aumento da expressão proteica de CD68 do primeiro para o terceiro dia após contusão em ratos idosos <sup>50</sup> e Sloboda *et al.* (2018) também observaram, em camundongos idosos, que o número de macrófagos CD68+ e CD163+ foi maior, cinco dias após lesão do que após 2 dias <sup>51</sup>.

Seguindo o que ocorre nos relatos sobre a presença dos diferentes fenótipos celulares, muitos estudos ligam a dificuldade de reparo do músculo esquelético de indivíduos idosos à uma maior quantidade de células inflamatórias e seus produtos <sup>4,42,50,51,58</sup>. No entanto, existem estudos, que relacionam essa dificuldade à uma menor quantidade de mediadores, quando no comparativo com indivíduos jovens <sup>4,51,59</sup>. É importante considerar também que a permanência de macrófagos <sup>4,60</sup> de ambos fenótipos por períodos mais longos no tecido lesionado de indivíduos idosos levará certamente à lentidão ou à ineficiência do processo de reparo.

Além disso, deve ser considerado que a resposta das células imunes, em especial dos macrófagos de indivíduos senis pode estar diminuída ou até ser

contrária à classicamente esperada para um determinado estímulo (imunosenescência) o que também pode dificultar a resolução da lesão <sup>42,61-63</sup>. Assim, parece clara a necessidade de buscar recursos terapêuticos mais eficientes para o tratamento de lesões musculares em idosos.

### **1.3. PAPEL DA FOTOBIMODULAÇÃO (FBM) NO REPARO MUSCULAR**

Dentre as intervenções terapêuticas utilizadas para modular o reparo muscular após a ocorrência de uma lesão, a fotobiomodulação (FBM) tem demonstrado resultados satisfatórios, principalmente na modulação da resposta inflamatória e aceleração do processo de reparo tecidual <sup>35,64-69</sup>.

A FBM consiste no uso de uma fonte de luz (laser ou LED) nos comprimentos de onda vermelho ou infravermelho para auxiliar no processo de reparo tecidual diminuindo da dor e a intensidade do processo inflamatório. Ao ser aplicada sobre o tecido, a luz é absorvida por cromóforos celulares e desencadeia diferentes eventos biológicos que envolvem a produção de energia pelas mitocôndrias. No entanto a complexidade dessa modulação ainda não está totalmente esclarecida <sup>70</sup>.

Os efeitos da FBM no tecido muscular de indivíduos jovens, após lesão aguda, incluem a redução do edema, do influxo de leucócitos, da mionecrose e ainda alteração da expressão de citocinas e enzimas pró-inflamatórias e uma melhor distribuição de colágeno, acelerando o processo de reparo <sup>33,66-68,71,72</sup>.

Já com relação ao fenótipo das células inflamatórias, um estudo recente, demonstrou que o tratamento de criolesão no músculo TA de ratos jovens com FBM (660 e 780nm, 70mW, 8J) foi capaz de reduzir o número de macrófagos M1 (CD68+) e aumentar o número de macrófagos M2 (CD206+) em relação ao grupo controle após 2 dias da ocorrência da lesão. Ainda neste estudo, a expressão de IL-6 se mostrou menor em 2 dias e maior após 4 dias de tratamento no grupo que recebeu a FBM quando da comparação com o não tratado, enquanto que a expressão de TGF- $\beta$  foi maior nos animais que receberam tratamento com FBM do que no grupo não tratado nos períodos de 2, 4 e 7 dias. A expressão de TNF- $\alpha$  não apresentou diferenças significantes entre os grupos <sup>73</sup>.

Existem pouquíssimos estudos avaliando os efeitos da FBM no reparo muscular de ratos idosos e não foi possível localizar nenhum que caracterizasse o fenótipo das células imunes durante este processo <sup>74-76</sup>.

Pertille et al (2012) avaliaram o efeito da FBM (830nm, emissão contínua, 30 mW, 4J/cm<sup>2</sup>, aplicação diária em dois pontos por 16s em cada) em ratos com 18 meses de idade que foram lesionados no músculo tibial anterior por meio de contusão. Depois de 21 dias de tratamento os autores observaram, por meio de análise histológica, uma redução da área da lesão e do infiltrado inflamatório nos tecidos irradiados quando comparados aos não tratados. Já a expressão de TGF- $\beta$  não foi diferente entre os animais irradiados e os não tratados, em nenhum dos períodos avaliados (7 e 21 dias) <sup>74</sup>.

Vatansever et al (2012) avaliaram os efeitos do tratamento com FBM (830nm, 30mW, 30J/cm<sup>2</sup> 0,87J) aplicada por 5 dias consecutivos (primeira aplicação após 24 horas da lesão) em um único ponto (diretamente sobre o local da criolesão) em ratos idosos (10 meses). Os autores relataram aumento da expressão gênica de MyoD, VEGF e do número de capilares sanguíneos no grupo lesionado e irradiado quando comparado com o grupo somente lesionado, no período de 7 dias. Porém não observaram alterações na área de lesão entre os grupos tratados e não tratados com FBM <sup>75</sup>.

Brito et al (2017) avaliaram os efeitos da FBM (780nm, 40mW, 10 J/cm<sup>2</sup>, 3,2J) aplicada em 8 pontos (10 segundos cada) no músculo TA de ratos Wistar com 20 meses de idade que foram submetidos a criolesão e observaram após 7 dias de tratamento por meio de análise histológica, uma redução no número de células inflamatórias, aumento de fibras imaturas e de novos vasos sanguíneos, além de uma melhor disposição das fibras de colágeno no comparativo com o grupo de animais que não foram irradiados <sup>76</sup>.

A fotobiomodulação, bastante utilizada na prática clínica, já apresenta resultados satisfatórios no tratamento de lesões musculares em jovens. Com isso, é possível que seu uso seja também benéfico no tratamento da musculatura senil, tornando o processo mais rápido e eficiente.

## 2. JUSTIFICATIVA

Com o envelhecimento, ocorre um declínio natural no tamanho e número de fibras musculares <sup>4,5</sup> que acarreta redução da massa muscular (sarcopenia) gerando redução da força e da disposição física <sup>4,8,9</sup>. Com isso há prejuízo da mobilidade e aumento do risco de quedas e lesões musculoesqueléticas <sup>10,11</sup>. Por outro lado, o sistema imune, que coordena as diferentes etapas do reparo muscular, também apresenta alterações na composição de suas células efetoras e em suas funções acarretando uma menor capacidade de reparo em idosos <sup>4,44,46</sup> indicando a necessidade de recursos terapêuticos mais eficientes.

A fotobiomodulação (FBM) auxilia o processo de reparo muscular em jovens reduzindo o edema, o influxo de leucócitos, a mionecrose e ainda altera a expressão de citocinas e enzimas pró-inflamatórias e melhora a distribuição de colágeno, acelerando o processo de reparo <sup>35,66,68,69,77</sup>.

Em idosos, também já existem algumas indicações de que a FBM gera resultados favoráveis no reparo muscular<sup>74,75,76</sup> mas a compreensão dos mecanismos de ação desta ferramenta ainda permanece pouco explorada, assim como o conhecimento sobre a composição do infiltrado inflamatório decorrente de lesões musculares nestes indivíduos.

### **3. OBJETIVO**

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da FBM, com laser infravermelho, sobre o fenótipo das células do infiltrado inflamatório e a expressão de mediadores inflamatórios durante reparo do tecido muscular esquelético de ratos idosos após lesão aguda.

#### **3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Comparar a presença de neutrófilos, macrófagos M1 e M2, por meio da imunohistoquímica, no músculo esquelético de ratos jovens e idosos submetidos a lesão aguda;
- Avaliar os efeitos da FBM (por meio de imunohistoquímica) sobre a presença de neutrófilos e dos diferentes perfis fenotípicos de macrófagos;
- Avaliar os efeitos da FBM sobre a expressão proteica de VEGF;
- Avaliar os efeitos da FBM sobre a expressão gênica das citocinas TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , e IL-6.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos (figura 2) foram realizados no laboratório de pesquisa do PPG em Biofotônica Aplicada a Ciências da Saúde da Universidade Nove de Julho (UNINOVE) no campus Vergueiro. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais, CEUA, em 17 de março de 2014 (AN 0002/2014 e An0026/2014).

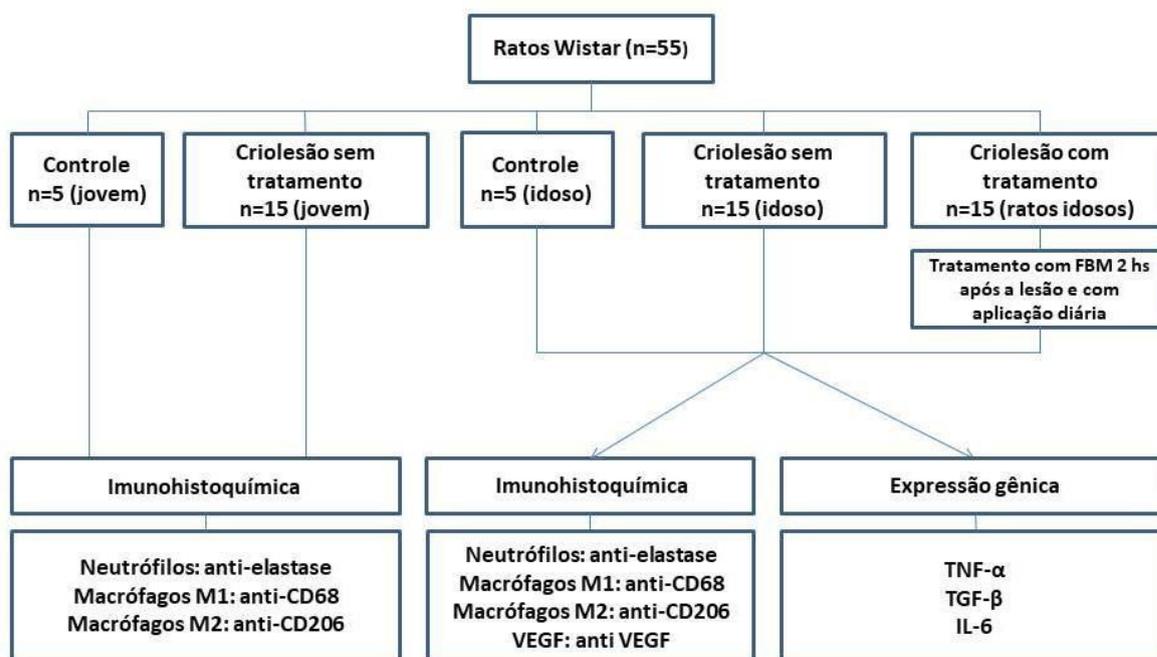


Figura 2. Fluxograma da parte experimental

### 4.1. AVALIAÇÃO *IN VIVO*

#### 4.1.1. Animais

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*: var. albinus, Rodentia, Mammalia) machos, da linhagem Wistar, com vinte meses de idade (massa corporal  $500 \pm 50$  gramas) e com dois meses de idade (massa corporal de  $200 \pm 20$  gramas), mantidos no biotério da UNINOVE em caixas plásticas apropriadas, temperatura ambiente ( $22^\circ\text{C}$ ), umidade relativa (40%), luminosidade controlada com ciclo de 12h (claro/escuro), com comida e água ad libitum.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente nos seguintes grupos experimentais:

- **Grupo 1 – Controle (idoso)**: Os animais não foram submetidos a nenhum procedimento, e após eutanásia, houve remoção do músculo tibial anterior direito (TAD) (n= 5);

- **Grupo 2 - Criolesão sem tratamento (idoso):** Os animais sofreram criolesão no músculo TAD e não receberam tratamento com FBM (n= 15);
- **Grupo 3 - Criolesão tratado com FBM (idoso):** Os animais sofreram criolesão no músculo TAD e foram tratados com FBM diretamente sobre a área correspondente ao local da lesão (n=15);
- **Grupo 4 - Controle (jovem):** Os animais não sofreram criolesão no músculo TAD e não receberam tratamento com FBM (n= 5);
- **Grupo 5 - Criolesão sem tratamento (jovem):** Os animais sofreram criolesão no músculo TAD e não receberam tratamento com FBM (n= 15);

Os animais dos grupos criolesão sem tratamento e criolesão tratado com FBM (grupos 2, 3 e 5) foram eutanasiados após 1,3 e 7 dias. Os animais dos grupos controles (1 e 4) foram eutanasiados sem distinção de período experimental.

#### **4.1.2. Procedimento de criolesão**

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados de acordo com trabalhos anteriores<sup>33,78,79,80</sup>. Os animais foram pesados e em seguida anestesiados 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 foram utilizadas seringas com agulhas ultra finas (modelo insulina, BD, Juiz de Fora, MG, Brasil). Posteriormente à indução anestésica, os animais foram posicionados em uma superfície plana e foi realizada a tricotomia da região correspondente ao músculo TAD.

O músculo TAD foi exposto cirurgicamente e submetido ao procedimento de criolesão, que consiste na aplicação de um bastão metálico de extremidade plana (3 mm de diâmetro) resfriado previamente em nitrogênio líquido, diretamente na superfície do músculo por 10 segundos. Após o descongelamento da área (30 segundos), o procedimento foi repetido na mesma área por mais 10 segundos. Terminado este procedimento, foi realizada a sutura com fio de poliamida (5,0) e os animais foram mantidos em caixas plásticas em ambiente aquecido (37°C) até ficarem conscientes. Para prevenir sofrimento, os animais receberam aplicação intraperitoneal do analgésico cloridrato de tramadol (5 mg/kg), 2 vezes ao dia por 3 dias seguidos.



**Figura 3:** Procedimento de criolesão. A: tricotomia da região; B: incisão cirúrgica; C: lesão com o bastão previamente resfriado em nitrogênio líquido; D: lesão; E: sutura.

O modelo de lesão muscular por meio de criolesão foi o adotado para este estudo devido ao fato deste ser um modelo no qual se consegue executar uma lesão bem delimitada na superfície ventral do músculo, simulando uma contusão muscular; de forma padronizada e com pouca variabilidade em sua severidade <sup>66</sup>.

#### 4.1.3. Fotobiomodulação (FBM)

A irradiação laser foi realizada utilizando o aparelho Twin Laser (MM Optics) e os parâmetros descritos com detalhes na tabela 1.

**Tabela 1:** Parâmetros dosimétricos da irradiação

PARÂMETROS	
Comprimento de onda [nm]	<b>780</b>
Largura espectral [nm]	<b>10</b>
Polarização	<b>aleatória</b>
Modo de Funcionamento	<b>contínuo</b>
Potência [mW]	<b>40</b>
Diâmetro de abertura [cm]	<b>0,23</b>
Irradiância na abertura [mW/cm <sup>2</sup> ]	<b>1000</b>
Área do feixe [cm <sup>2</sup> ]	<b>0,04</b>
Tempo de exposição por ponto [s]	<b>10</b>
Densidade de Energia [J/cm <sup>2</sup> ]	<b>10</b>
Energia [J] por ponto	<b>0,4</b>
Número de pontos irradiados	<b>8</b>
Energia total irradiada [J]	<b>3,2</b>
Técnica de aplicação	<b>contato direto</b>

Para a irradiação, os animais foram contidos manualmente e foi utilizada a técnica pontual e contato sobre a pele que recobre o músculo TAD na região da incisão e ao redor da área da lesão, abrangendo 8 pontos ao redor da área da lesão (figura 4) <sup>66</sup>.



**Figura 4.** Técnica pontual. Os círculos representam os locais que receberam o tratamento com FBM.

A irradiação foi realizada com bases nos parâmetros descritos por Alves *et al* (2014) <sup>68</sup> e Ribeiro *et al* (2015) <sup>81</sup> que observaram uma modulação positiva da FBM sobre o reparo do músculo esquelético em ratos após lesão aguda. Dessa forma, foi aplicada uma energia total de 3,2 J e tempo de 80 segundos por tratamento. Para evitar refração do feixe do laser foi utilizado para aplicação o ângulo de 90°C entre o emissor e a pele do animal. O tratamento foi iniciado 2h após o procedimento de criolesão e posteriormente, foi realizado, diariamente até o período de eutanásia de cada grupo experimental. No início e final do procedimento experimental, a potência de emissão de luz do laser foi aferida utilizando o “*Laser Check power meter*” (MM Optics, São Carlos – SP, Brasil).

#### **4.1.4. Eutanásia dos animais e remoção dos músculos**

Após cada período experimental (1, 3 e 7 dias), os animais foram eutanasiados utilizando-se uma superdose de anestésico. Em seguida, os músculos TAD foram retirados e seccionados ao centro, onde metade foi separado para as imunomarcações e a outra para avaliação da expressão gênica. O material separado para imunomarcação foi imediatamente inserido em solução de formol tamponado (pH 8,0) a 10%, onde permaneceu por 24 horas até a inclusão em parafina e a outra parte foi mantida a refrigeração (-80° C).

#### **4.2. IMUNOMARCAÇÃO (ELASTASE, CD68, CD206 E VEGF)**

Após 24 horas em solução de formol (10%) os músculos foram seccionados transversalmente na região central da área lesionada, desidratados por meio de

banhos consecutivos em concentrações progressivas de álcool, diafanizados e incluídos em parafina. Foram realizados 03 cortes de 3µm de espessura em micrótomo (Leica RM2125, Nussloch, Alemanha) para avaliação da marcação de anti-elastase, anti CD68, anti CD206 e anti VEGF. Os cortes foram colocados em lâminas de microscopia desengorduradas e silanizadas (3-aminopropiltrietoxi-silano, Sigma Chemical, St Louis, MO, EUA). As lâminas contendo os cortes histológicos foram inicialmente desparafinadas em xilol pré-aquecido em 60°C por 5 minutos e hidratadas com banhos sequenciais em soluções alcoólicas com decrescentes concentrações de álcool (absoluto, 90%, 80% e 70%). Após a hidratação, as lâminas foram mantidas em água destilada e lavadas com PBS.

Para as imunomarcações de CD68, CD206 e VEGF foi realizada a recuperação antigênica em tampão citrato (pH 6,0) por 20 minutos a 90°C (em panela) seguido por descanso de 30 minutos em temperatura ambiente (esta etapa não foi realizada para a marcação com elastase por não haver necessidade). Após este período, as lâminas foram lavadas em solução de salina-fosfato tamponada (PBS, pH 7,4) por 5 minutos. Os cortes foram imersos em solução de peróxido de hidrogênio 0,3% por 5 minutos, por 3 vezes, visando o bloqueio da peroxidase endógena. Em seguida, os cortes foram lavados com PBS por 5 minutos e incubados com os anticorpos primários (tabela 2) anti CD68 (1:1000) para identificação de macrófagos, anti CD206 (1:2000) identificação de macrófagos do perfil M2; e anti elastase (1:3500) para identificação de neutrófilos; e anti VEGF (1:1900) por overnight em câmara úmida.

Após este período, as lâminas foram lavadas sucessivamente por 5 minutos com PBS e os cortes foram incubados em câmara úmida com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (Histofine, Simple Stain Rat MAX PO, Tsukiji, Tokyo, Japan) por 30 minutos à temperatura ambiente. Após novas lavagens com tampão PBS, a revelação da reação da peroxidase foi obtida com solução cromógena de diaminobenzidina a 5 % (DAB, Abcam, Cambridge, MA, USA) por 5 minutos. Em seguida as lâminas foram lavadas por 10 minutos em água corrente e os cortes foram contra corados suavemente com hematoxilina de Mayer. As lâminas do grupo controle (animais sem lesão e tratamento) passaram pelo mesmo procedimento.

**Tabela 2.** Anticorpos que foram utilizados

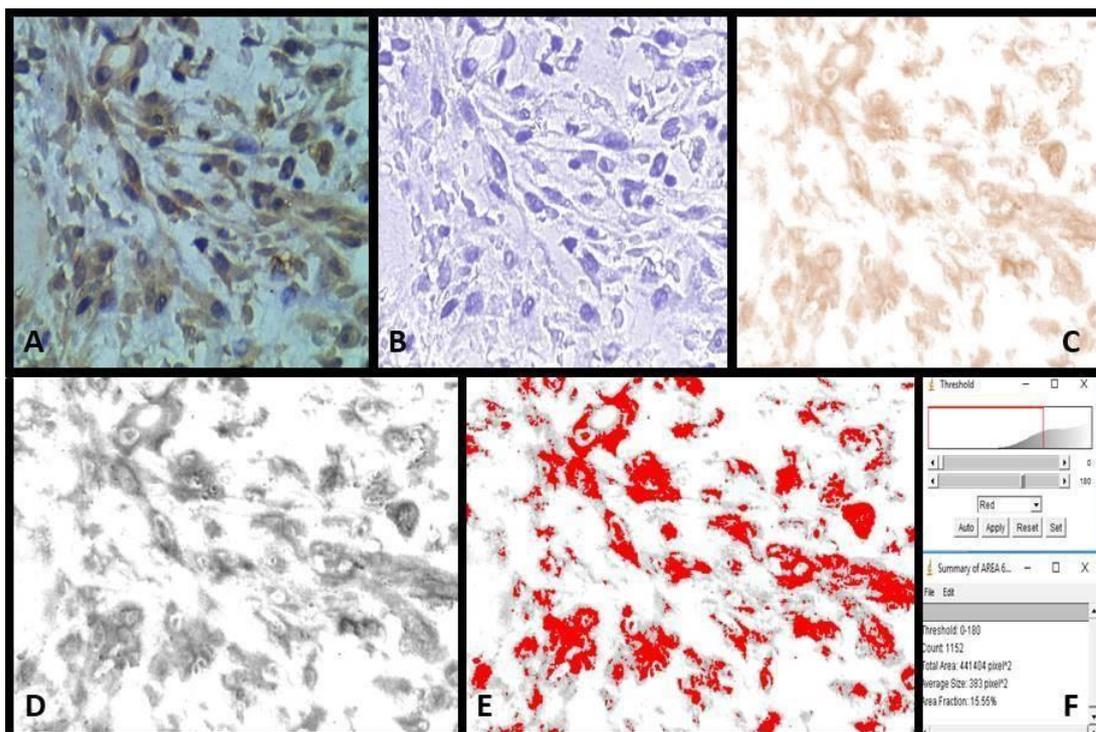
<b>Anticorpos</b>	<b>Clone</b>	<b>Reatividade</b>	<b>Titulação</b>	<b>Incubação</b>
Anti Elastase (Abcam)	Policlonal	Anti rato, camundongo e humano produzido em coelho.	1 : 3500	24 horas, câmara úmida, temperatura ambiente
Anti CD68 (Abcam)	Monoclonal	Anti rato, camundongo, coelho e humano produzido em camundongo.	1 : 1000	24 horas, câmara úmida, temperatura ambiente
Anti CD206 (Abcam)	Policlonal	Anti rato, camundongo e humano produzido em coelho.	1 : 2000	24 horas, câmara úmida, temperatura ambiente
Anti VEGF (Santa Cruz Blotechnology)	Monoclonal	Anti rato, camundongo e humano produzido em camundongo.	1 : 1900	24 horas, câmara úmida, temperatura ambiente

### **4.3. ANÁLISE DA PRESENÇA DE NEUTRÓFILOS E DIFERENTES FENÓTIPOS DE MACRÓFAGOS**

A quantificação de neutrófilos e macrófagos foi obtida através da contagem de células com marcação positiva evidenciada pelo DAB. Inicialmente, procedeu-se a digitalização de 6 campos histológicos, escolhidos aleatoriamente, representativos da área da lesão com aumento de 400 vezes. O procedimento de digitalização foi realizado utilizando um microscópio NIKON Eclipse E200 e câmara acoplada Premiere MA-88300 (NIKON) bem como software de aquisição de imagem TSview (Informer Technologies). A quantificação numérica foi feita usando o plug-in "cell counter" do programa ImageJ 1.45 (free software, NIH, Bethesda, MD, US).

#### **4.3.1. Quantificação da imunomarcação de VEGF**

A quantificação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) foi obtida por meio de porcentagem da área de marcação evidenciada pelo DAB. Inicialmente, procedeu-se a digitalização de 6 campos histológicos, escolhidos aleatoriamente em região representativa da área da lesão, com o aumento original de 400X. O procedimento de digitalização foi realizado utilizando um microscópio NIKON Eclipse E200 e câmara acoplada Premiere MA-88300 (NIKON) bem como software de aquisição de imagem TSview (Informer Technologies). A intensidade de luz foi padronizada em todas as imagens, as quais foram mantidas em RGB, com resolução de 2048 x 1536 pixels e extensão jpg.



**Figura 5.** Exemplo de cálculo da área de marcação pelo DAB. A: corte histológico com marcação evidenciada pelo DAB; B: *deconvolução* da imagem mostrada em A, evidenciando a marcação da hematoxilina; C: *deconvolução* da imagem mostrada em A, evidenciando a marcação do DAB; D: a imagem da *deconvolução* em marrom convertida para 8 bits; E: seleção da área de marcação (vermelho) utilizando a imagem demonstrada em D; quantificação através do threshold.

Para obtenção do percentual da área de marcação, as imagens digitalizadas foram abertas no software Image J (National Institute of Health - NIH, EUA) e submetidas ao filtro de deconvolução RGB (*plugin* color deconvolution). Por esse método, é possível separar a cor do DAB e da hematoxilina, permitindo o cálculo do percentual da área marcada com mais fidelidade. Separando o DAB das demais cores, a imagem foi convertida para 8 bits, os tons de cinza definidores da marcação pelo DAB foram selecionados e a área ocupadas por esses tons foi calculada (figura 4). Para todas as imagens foram adotadas o mesmo ajuste (180) com margem de 10% para mais ou para menos.

#### 4.4. EXPRESSÃO GÊNICA DE TNF-A, TGF-B E IL-6

##### 4.4.1. Extração e controle da qualidade do RNA total

Para este procedimento foram utilizados entre 80-100 mg do tecido muscular, macerado em nitrogênio líquido. O tecido foi homogeneizado em 1 mL do reagente

Trizol (Invitrogen, CA, USA), para o isolamento do RNA total, seguindo as orientações do fabricante. Após a lise, foram adicionados 200  $\mu$ L de clorofórmio gelado, e realizada incubação em temperatura ambiente por 03 minutos seguida de centrifugação a 10.200 xg durante 15 minutos a 4°C, para separação das diferentes frações (DNA, RNA e proteína). A fase aquosa superior contendo o RNA total foi transferida para um novo microtubo livre de DNase/RNase.

Em seguida, foram adicionados 500  $\mu$ L de álcool isopropílico gelado, e realizada incubação em temperatura ambiente por 10 minutos seguida de centrifugação a 10.200 xg durante 10 minutos a 4°C para precipitação do RNA total. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado 700  $\mu$ L de álcool 75% gelado e realizada nova centrifugação a 8.400 xg durante 5 minutos a 4°C. O álcool foi descartado e o RNA total foi ressuscitado em 20  $\mu$ L água livre de RNase tratada com 0,01% de DEPC (Dimetil pirocarbonato). A concentração do RNA total e pureza foram determinadas em NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA) com comprimento de onda 260 e 280 nm e as amostras armazenadas a -80°C. Para análise da integridade do RNA total, 1  $\mu$ g de RNA foi analisado por meio de eletroforese em gel de agarose 1% não desnaturante, corado com brometo de etídeo.

#### **4.4.2. Síntese do DNA Complementar (cDNA)**

A síntese de cDNA foi realizada com 1  $\mu$ g de RNA total, submetido à reação de transcrição reversa utilizando-se o *High Capacity cDNA Reverse Transcriptions Kit* (Applied Biosystems), de acordo com as orientações do fabricante. Todas as amostras receberam DNase I (Invitrogen, CA, EUA) para evitar a contaminação.

#### **4.4.3. PCR em tempo real quantitativo (qPCR)**

As reações foram realizadas nas condições de 50°C por 2 minutos, 95° durante 10 minutos, seguidos de 40 ciclos de 95° durante 15 segundos e 60°C durante 1 minuto utilizando o “SYBR Green Kit” (Applied Biosystems) no a ABI7500 Fast Real-Time System (ABI Prism, Applied Byosistems, Foster City, CA).

Os oligonucleotídeos iniciadores (“*primers forward e reverse*”) específicos para *TNF- $\alpha$* , *TGF- $\beta$* , *IL-6* e *GAPDH* utilizados estão descritos na tabela 3. A quantificação foi realizada usando o método 2 -  $\Delta\Delta$ CT [Livak 2001]<sup>82</sup> e o grupo controle foi usado como referência

**Tabela 3.** Primers utilizados

<b>Primer</b>	<b>Forward (5' – 3')</b>	<b>Reverse (3' – 5')</b>
GAPDH	GCATCCTGGGCTACACTGA	CCACCACCCTGTTGCTGTA
IL-6	TCCAGTTGCCTTTCTTGGGA	GTGTAATTAAGCCTCCGAG
TNF- $\alpha$	GCCCACGTTGTAGCCAATG	GTTGTCTTTCAGCTTCACG
TGF- $\beta$	TCCAACCCAGGTCCTTCCTAAAGT	CCCCTGGAAAGGGCTCAACAC

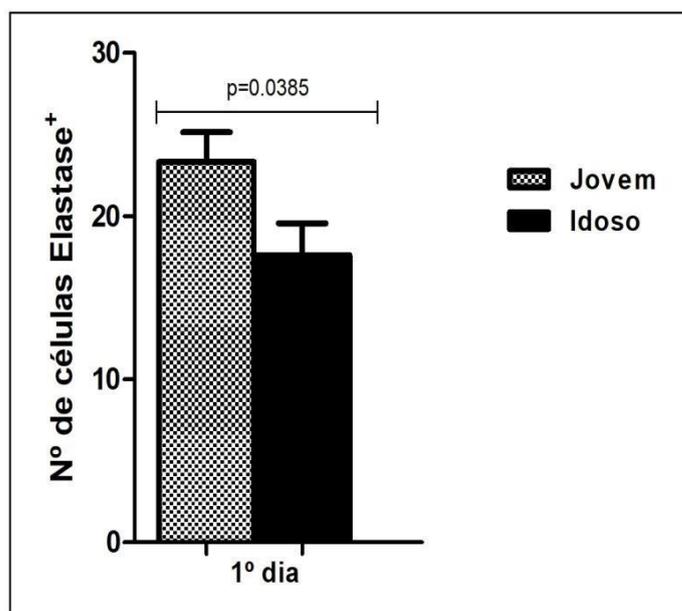
#### **4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

O teste de Kolmogorov-Smirnov foi usado para determinar a distribuição dos dados. Como a distribuição normal foi demonstrada em todas análises, as comparações foram realizadas pelo teste t com correção de Welch (GraphPad Prism 5.0, Califórnia, EUA), com 95% de confiança ( $p < 0,05$ ).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. COMPARATIVO DA EXPRESSÃO DE ELASTASE (NEUTRÓFILOS) ENTRE ANIMAIS JOVENS E IDOSOS NÃO TRATADOS

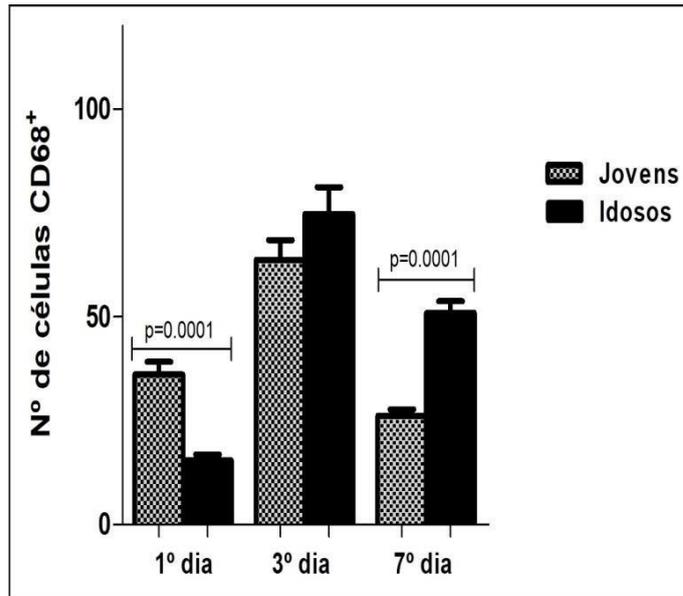
Após 1 dia da lesão foi possível observar uma quantidade menor de neutrófilos no músculo TA dos animais idosos ( $p=0.0385$ ) em relação aos animais jovens que também não foram tratados. Nos períodos de 3 e 7 dias após a lesão não foram observadas células positivas para elastase em ambos os grupos.



**Figura 6.** Avaliação por imunohistoquímica de células elastase+ (neutrófilos). O número de células elastase+ foi avaliado em músculo lesado de ratos jovens e idosos após 1, 3 e 7 dias. Uma diminuição significativa foi encontrada no grupo idoso em comparação com o grupo jovem ( $p=0,0385$ ) no primeiro dia. Dados expressos como média  $\pm$  SEM. Teste T com correção de Welch. Os períodos de 3 e 7 dias e grupo controle não estão representados no gráfico pois não houve marcação positiva de células.

### 5.2. COMPARATIVO DA EXPRESSÃO DE CD68 (MACRÓFAGOS M1) ENTRE ANIMAIS JOVENS E IDOSOS NÃO TRATADOS

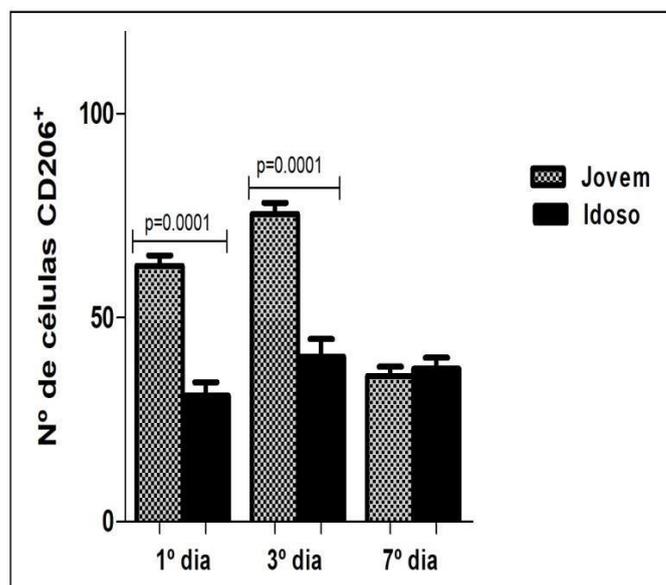
Após 1 dia da lesão, foi possível observar quantidade menor de macrófagos M1 no músculo TA dos animais idosos ( $p=0.0001$ ) em relação aos animais jovens que também não foram tratados. Após 7 dias da lesão foi observado um número maior de macrófagos M1 no grupo de animais idosos em comparação aos jovens apenas lesionados. A avaliação no período de 3 dias não apresentou diferença dignificante entre os grupos.



**Figura 7.** Avaliação por imunohistoquímica de células CD68+ (macrófagos M1). O número de células CD68+ foi avaliado em músculo lesado de ratos jovens e idosos após 1, 3 e 7 dias. Um número menor de macrófagos M1 foi encontrado no grupo idoso em comparação com o grupo jovem ( $p=0,0001$ ) no primeiro dia. Após 7 dias o número de macrófagos M1 foi maior ( $p=0,0001$ ) nos animais idosos em relação aos jovens. Dados expressos como média  $\pm$  SEM. Teste T com correção de Welch. Os períodos de 1, 3 e 7 dias e grupo controle não estão representados no gráfico pois não houve marcação positiva de células.

### 5.3. COMPARATIVO DA EXPRESSÃO DE CD206 (MACRÓFAGOS M2) ENTRE ANIMAIS JOVENS E IDOSOS NÃO TRATADOS

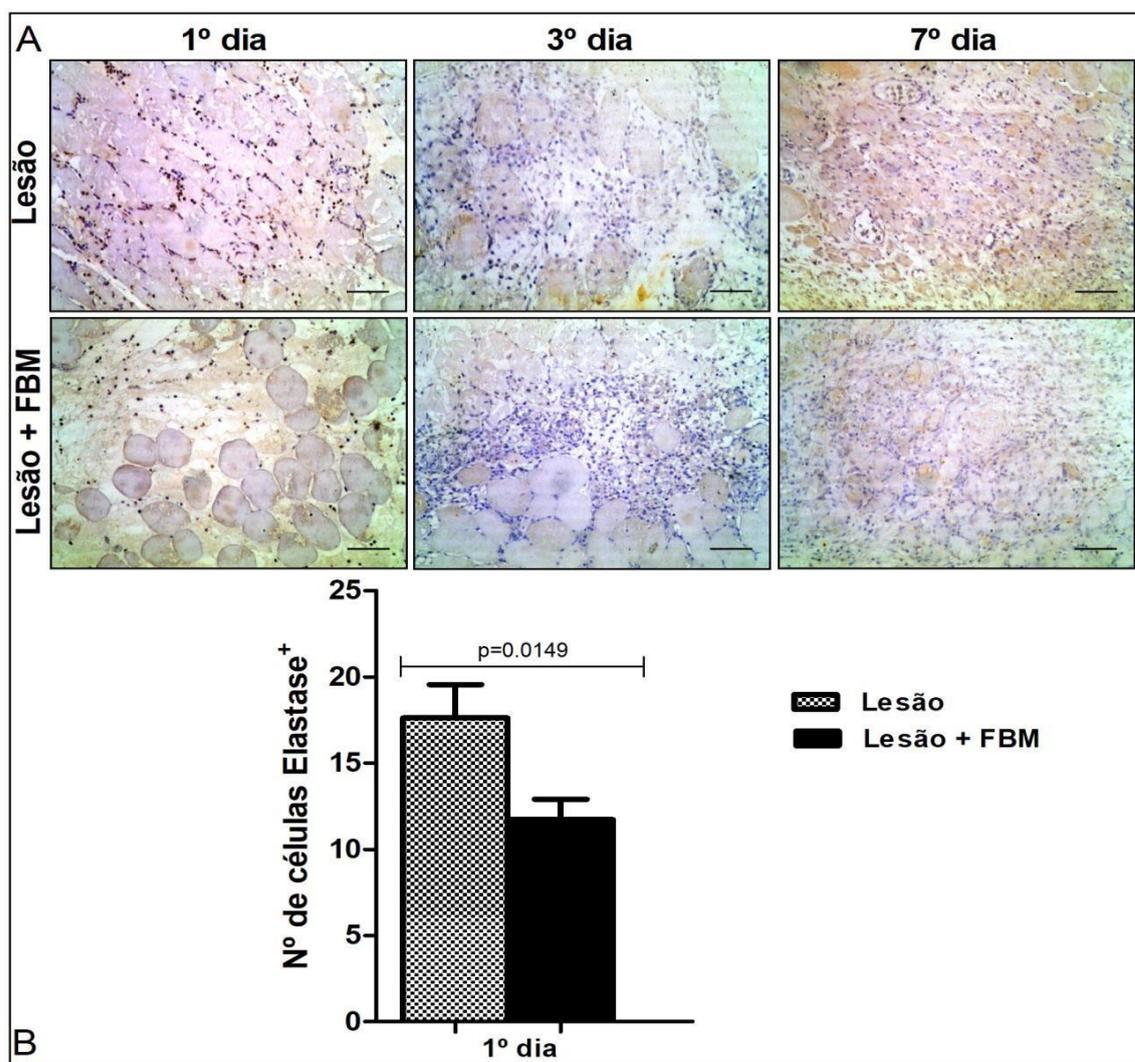
Após 1 e 3 dias da lesão foi possível observar um menor número de macrófagos M2 no músculo TA dos animais idosos ( $p=0,0001$ ) em relação aos animais jovens que também não foram tratados. A avaliação no período de 7 dias não apresentou diferença significativa entre os grupos.



**Figura 8.** Avaliação por imunohistoquímica de células CD206+ (macrófagos M2). O número de células CD206+ foi avaliado em músculo lesado de ratos jovens e idosos após 1, 3 e 7 dias. Um menor número de macrófagos M2 foi encontrado no grupo idoso em comparação com o grupo jovem ( $p=0,0001$ ) após 1 e 3 dias ( $p=0,0001$ ). Após 7 dias não houve diferença entre os grupos. Dados expressos como média  $\pm$  SEM. Teste T com correção de Welch. Os períodos de 1, 3 e 7 dias e grupo controle não estão representados no gráfico pois não houve marcação positiva de células.

#### 5.4. EFEITO DA FBM NA EXPRESSÃO DE ELASTASE (NEUTRÓFILOS) EM ANIMAIS IDOSOS

Após 1 dia da lesão foi possível observar uma redução no número de neutrófilos nos animais tratados com FBM ( $p=0,0149$ ) em relação aos animais não tratados. Nos períodos de 3 e 7 dias após a lesão não foram observadas células positivas para elastase em ambos os grupos.

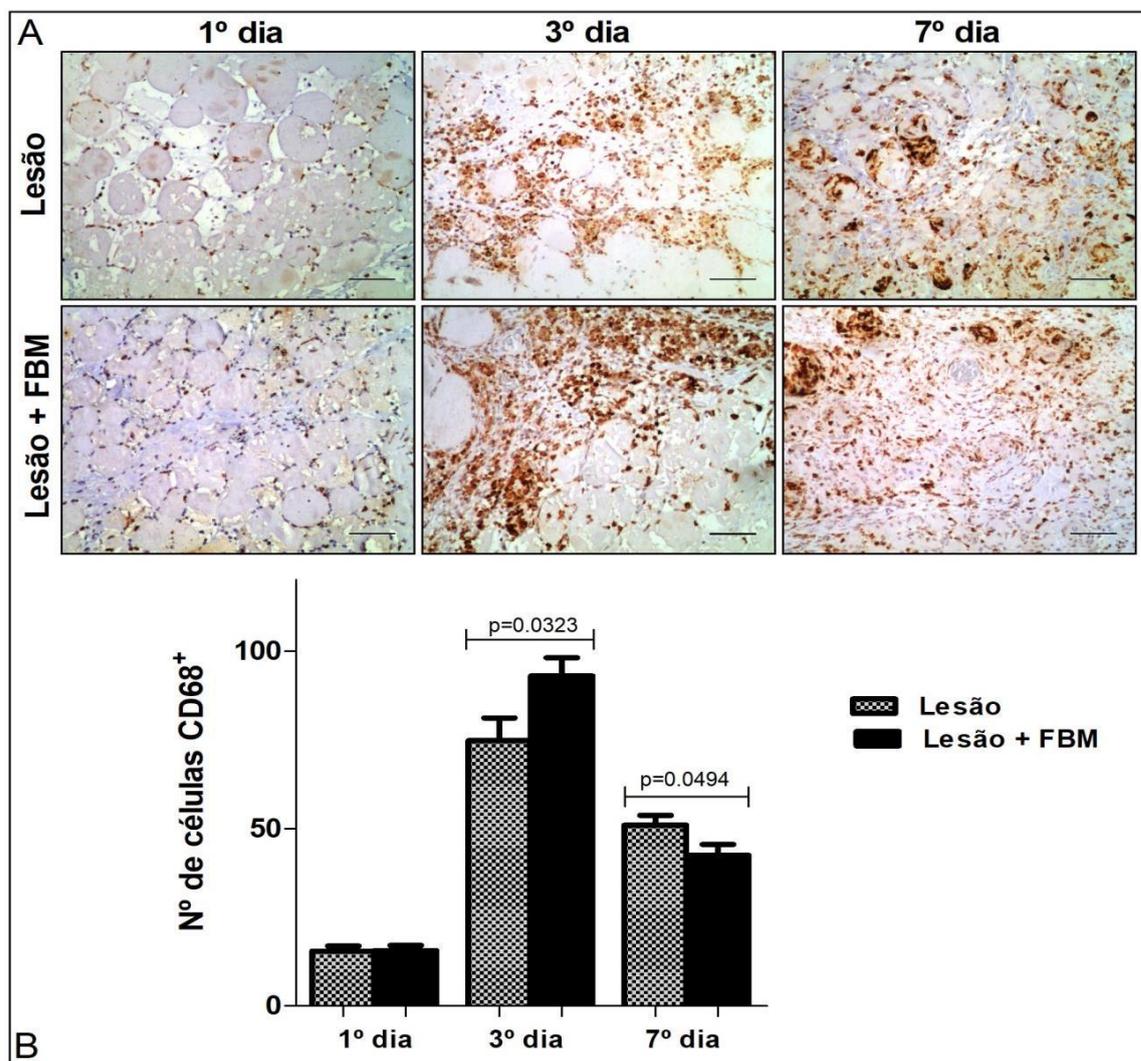


**Figura 9.** Avaliação por imunohistoquímica de células elastase+ (neutrófilos). Imagens representativas (A) e análise quantitativa (B). O número de células elastase+ foi avaliado em músculo de animais idosos lesado tratado ou não com FBM após 1, 3 e 7 dias. Um menor número de neutrófilos foi encontrado no grupo FBM em comparação com o grupo lesão ( $p=0,0149$ ) no primeiro dia. Os períodos de 3 e 7 dias e grupo controle não estão representados no gráfico pois não foram

encontradas células com marcação positiva. Imagens com ampliação 100x, escala 100µm.. Dados expressos como média ± SEM. Teste T com correção de Welch.

### 5.5. EFEITO DA FBM NA EXPRESSÃO DE CD68 (MACRÓFAGOS M1) EM ANIMAIS IDOSOS

Após 1 dia da lesão não houve diferença significativa entres os grupos lesão e lesão com tratamento com FBM. No período de 3 dias, os animais que receberam a FBM apresentaram maior número de macrófagos M1 ( $p=0,0323$ ) do que os não tratados, já após 7 dias, os animais tratados com FBM apresentaram um número menor de macrófagos M1 ( $p=0,0494$ ) em relação aos animais que não foram tratados.

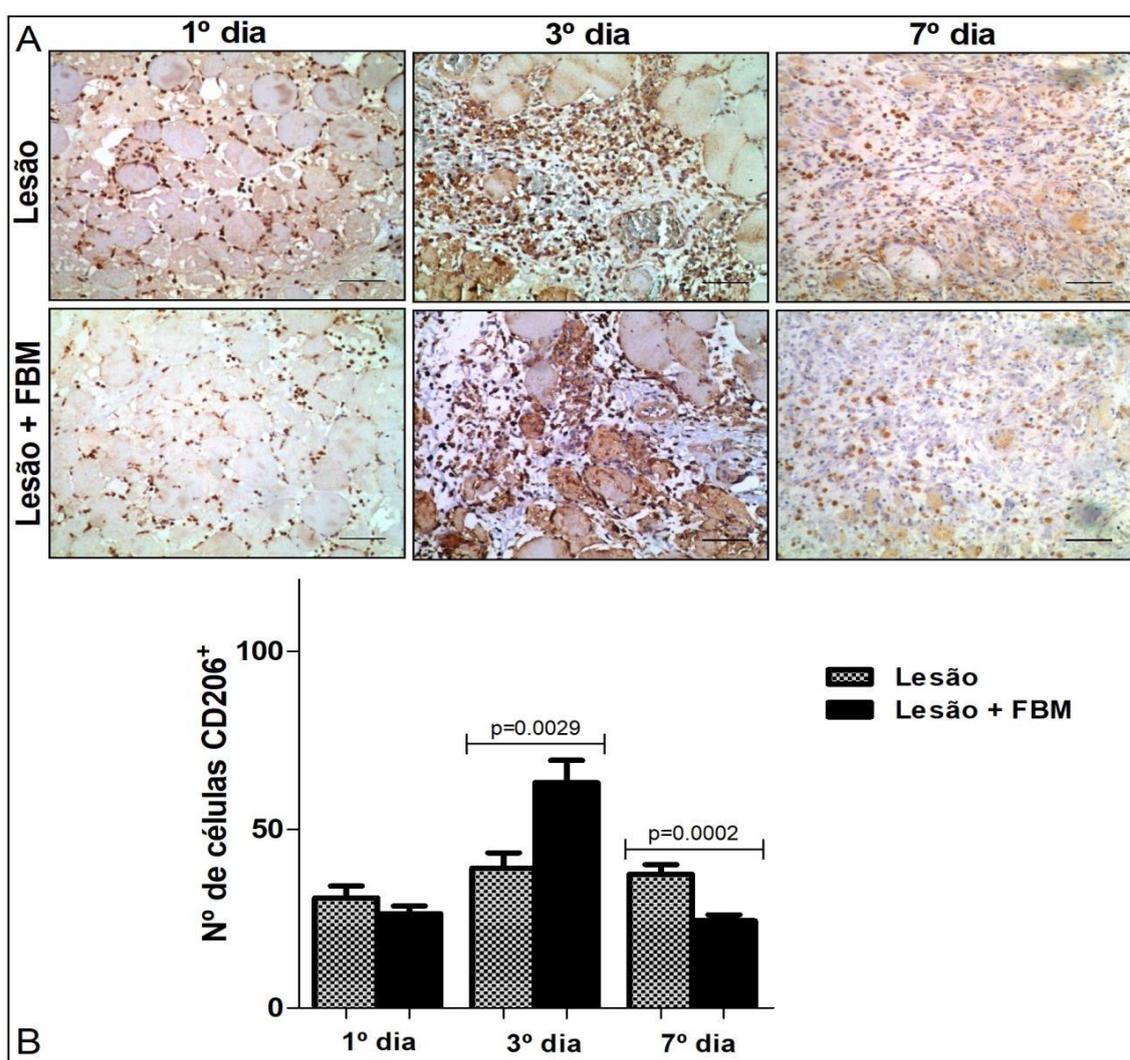


**Figura 10.** Avaliação por imunohistoquímica da presença de células CD68+ (macrófagos M1). Imagens representativas (A) e análise quantitativa (B). O número de células CD68+ foi avaliado em músculo lesado tratado ou não com FBM após 1, 3 e 7 dias. Uma quantidade maior de células CD68+ foi encontrada no grupo FBM em comparação com o grupo lesão ( $p = 0,0323$ ) no terceiro dia. No dia 7, o grupo tratado com FBM apresentou um número menor ( $p = 0,0494$ ) de células CD68+ em relação ao grupo não tratado. Imagens com ampliação 100x, escala 100µm. Dados expressos como média ±

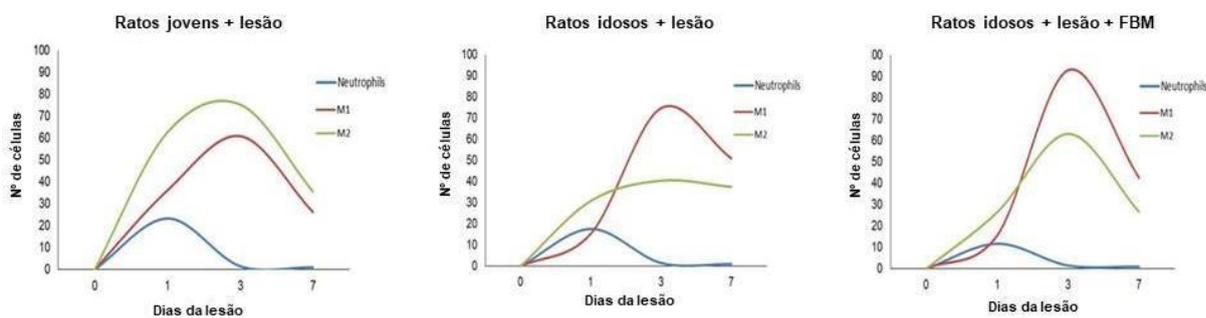
SEM. Teste T com correção de Welch. O grupo controle não está representado no gráfico pois não houve marcação positiva de células.

## 5.6. EFEITO DA FBM NA EXPRESSÃO DE CD206 (MACRÓFAGOS M2) EM ANIMAIS IDOSOS

Após 1 dia da lesão não houve diferença significativa entres os grupos lesão e lesão tratado com FBM. No período de 3 dias houve um maior número de macrófagos M2 ( $p=0,0029$ ) nos animais que receberam o tratamento, já após 7 dias, os animais tratados com FBM apresentaram um número menor de macrófagos M2 ( $p=0,0002$ ) em relação aos animais que não foram tratados.



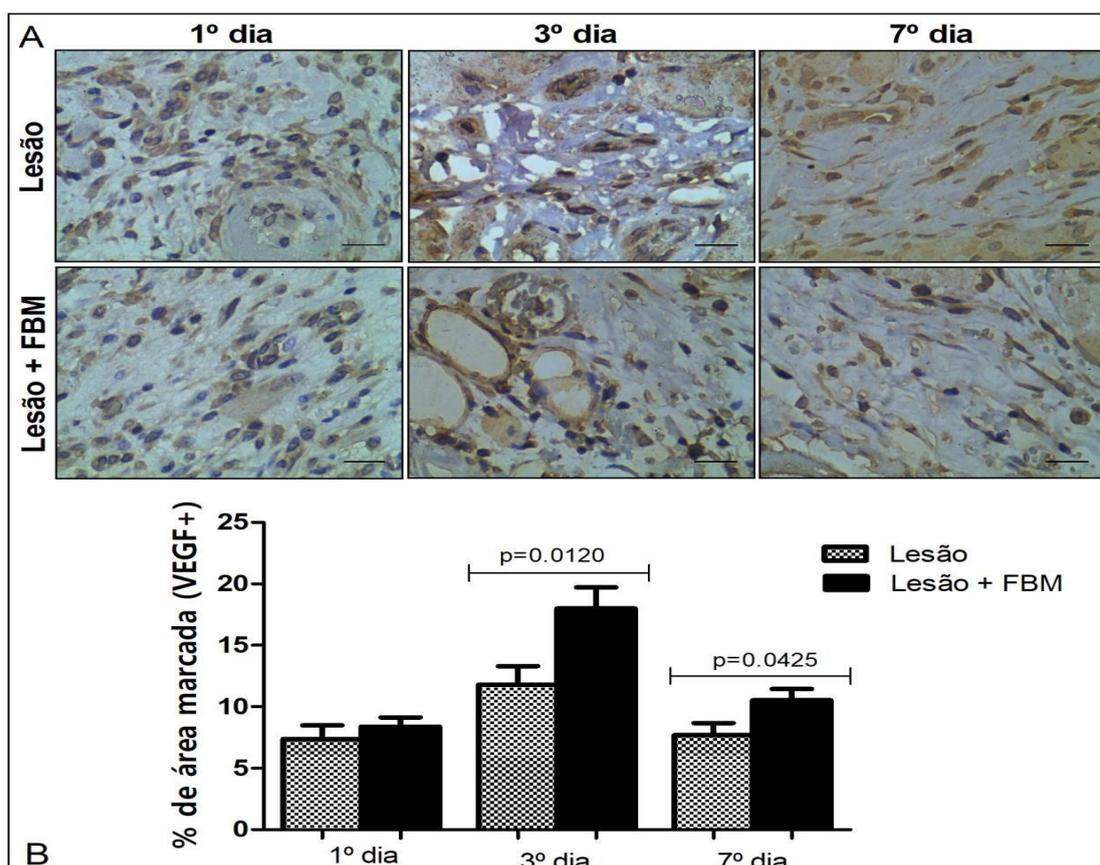
**Figura 11.** Avaliação por imunohistoquímica da presença de células CD206+ (macrófagos M2). Imagens representativas (A) e análise quantitativa (B). O número de células CD206+ foi avaliado em músculo lesado tratado ou não com FBM após 1, 3 e 7 dias. Uma maior quantidade de células CD206+ foi encontrada no grupo FBM em comparação com o grupo lesão ( $p= 0,0029$ ) no terceiro dia. No dia 7, o grupo tratado com FBM mostrou um número menor ( $p= 0,0002$ ) de CD206+ que o grupo não tratado. Imagens com ampliação 100x, escala 100 $\mu$ m. Dados expressos como média  $\pm$  SEM. Teste T com correção de Welch. O grupo controle não está representado no gráfico pois não houve marcação positiva de células.



**Figura 12.** Gráfico comparativo entre jovens, idosos e tratados. Representação gráfica dos ratos jovens + lesão; ratos idosos + lesão; ratos idosos + lesão + FBM. Dados expressos como média. Teste T com correção de Welch. O grupo controle não está representado no gráfico pois não houve marcação positiva de células.

### 5.7. EFEITO DA FBM NA EXPRESSÃO DE VEGF EM ANIMAIS IDOSOS

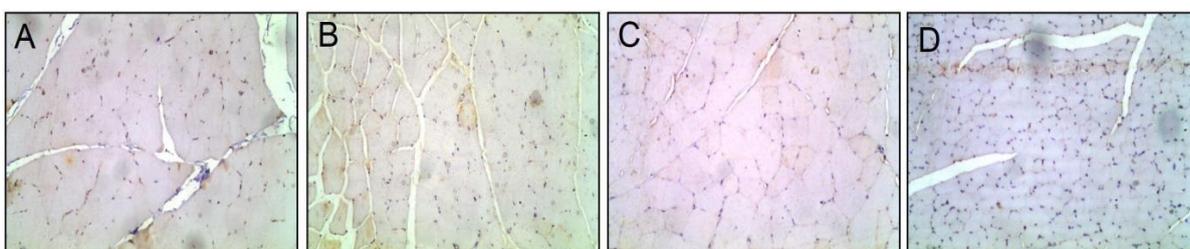
Não houve diferença significativa entre os grupos após o período de 1 dia. Após 3 dias de tratamento a quantificação de VEGF foi maior ( $p=0,0120$ ) no músculo dos animais tratados com FBM em relação aos não tratados. Esse fato, repetiu-se no período seguinte (7 dias) com maior expressão ( $p=0,0425$ ) de VEGF no músculo tratado com FBM em relação ao mesmo período dos animais não tratados.



**Figura 13.** Avaliação por imunohistoquímica da expressão de VEGF. Imagens representativas (A) e análise quantitativa (B). O percentual de área marcada foi avaliado em músculo lesado tratado ou não com FBM após 1, 3 e 7 dias. Um maior percentual de marcação foi encontrado no grupo FBM em comparação com o grupo de lesão ( $p= 0,0120$  e  $p=0,0425$ ) no terceiro e sétimo dia. Imagens com ampliação 100x, escala 100 $\mu$ m. Dados expressos como média  $\pm$  SEM. Teste T com correção de Welch.

## 5.8. IMUNOMARCAÇÃO NOS GRUPOS CONTROLES

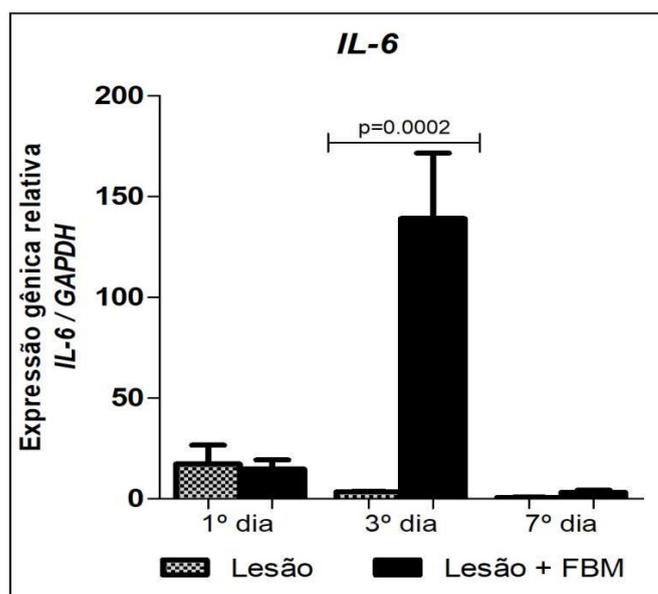
Nos músculos dos grupos controle (jovens e idosos), não foram encontradas marcações positivas para os anticorpos anti-elastase; anti-CD68; anti-CD206 e anti-VEGF em todos períodos experimentais, conforme observado na imagem a seguir (figura 9).



**Figura 14.** Imagens histológicas dos grupos controles demonstrando que não houve marcação positiva para as imunomarcações realizadas. A – anti elastase; B – anti CD68; C – anti CD206; D – anti VEGF. Aumento de 100x.

## 5.9. EFEITO DA FBM NA EXPRESSÃO DE RNA<sub>M</sub> DE IL-6 EM ANIMAIS IDOSOS

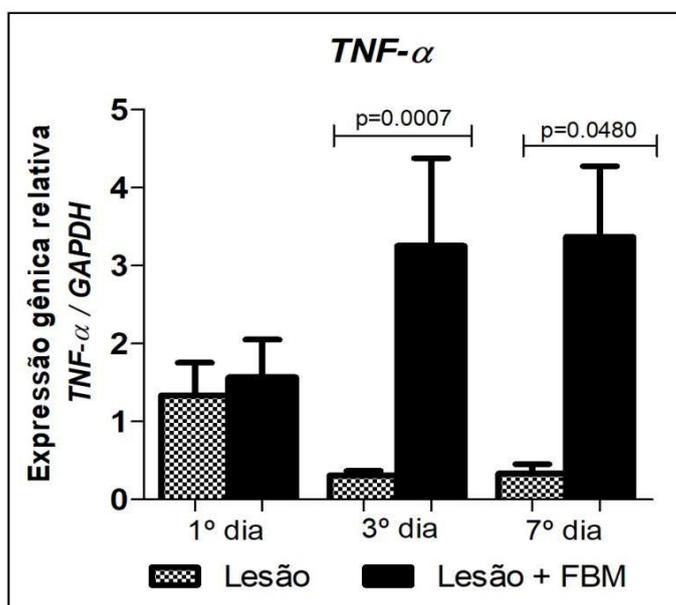
A expressão de RNAm de *IL-6* foi maior ( $p=0,0002$ ) no período de 3 dias no músculo dos animais que receberam tratamento quando comparado ao grupo lesão. Nos períodos de 1 e 7 dias não houve diferença significativa entre os grupos.



**Figura 15.** Expressão gênica quantitativa de *IL-6*. A expressão foi avaliada em músculo lesado tratado ou não com FBM após 1, 3 e 7 dias. Uma maior ( $p=0,0002$ ) expressão foi encontrada após 3 dias no grupo tratado com FBM em relação ao grupo não tratado. Dados expressos como média  $\pm$  SEM. Teste T com correção de Welch.

### 5.10. EFEITO DA FBM NA EXPRESSÃO DE RNAm DE TNF- $\alpha$ EM ANIMAIS IDOSOS

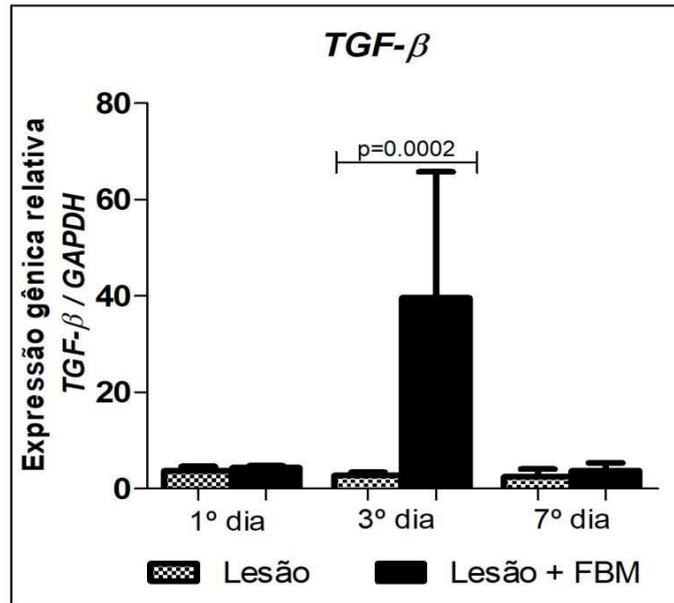
A expressão de RNAm de *TNF- $\alpha$*  foi maior nos músculos dos animais que receberam o tratamento com FBM quando comparados aos do grupo lesão nos períodos de 3 dias ( $p=0,0007$ ) e 7 dias ( $p=0,0480$ ). Após 1 dia de tratamento não houve diferença significativa entre os grupos.



**Figura 16.** Expressão gênica quantitativa de *TNF- $\alpha$* . A expressão foi avaliada em músculo lesado tratado ou não com FBM após 1, 3 e 7 dias. Uma maior expressão foi encontrada após 3 e 7 dias ( $p=0,0007$  e  $0,0480$ ) no grupo tratado com FBM em relação ao grupo não tratado. Dados expressos como média  $\pm$  SEM. Teste T com correção de Welch.

### 5.11. EFEITO DA FBM NA EXPRESSÃO DE RNAm DE TGF- $\beta$ EM ANIMAIS IDOSOS

Não houve diferença na expressão de RNAm de *TGF- $\beta$*  entre os grupos lesão e lesão + FBM nos períodos de 1 e 7 dias, no entanto após 3 dias de tratamento houve uma expressão maior *TGF- $\beta$*  ( $p=0,0002$ ) no grupo tratado com FBM quando no comparativo com o grupo lesão.



**Figura 17.** Expressão gênica quantitativa de *TGF-β*. A expressão foi avaliada em músculo lesado tratado ou não com FBM após 1, 3 e 7 dias. Uma maior ( $p=0,0002$ ) expressão foi encontrada após 3 dias no grupo tratado com FBM em relação ao grupo não tratado. Dados expressos como média  $\pm$  SEM. Teste T com correção de Welch.

## 6. DISCUSSÃO

Os mecanismos que levam ao reparo muscular têm sido amplamente explorados na literatura devido à considerável ocorrência de lesões musculares na população e ao fato de que o reparo dessas condições é geralmente lento, muitas vezes incompleto e acompanhado de fibrose, indicando a necessidade de um tratamento terapêutico mais eficiente <sup>27,83,84</sup>. No entanto, só recentemente foi completamente estabelecido que o processo de reparação muscular é cronologicamente coordenado por diferentes populações de células imunes <sup>27,84</sup>.

Em indivíduos jovens, os neutrófilos colonizam o tecido muscular após uma lesão aguda e atingem um pico no primeiro dia após a ocorrência da lesão <sup>27,80</sup>. A seguir, os macrófagos (M1) tornam-se numerosos no local da lesão, atingindo um pico numérico no segundo dia, e o microambiente é dominado por mediadores pró-inflamatórios nesse período, como o IFN- $\gamma$  e o TNF- $\alpha$  <sup>27,80</sup>. Por volta do terceiro dia após a lesão, a presença de macrófagos inflamatórios começa a diminuir e ocorre um aumento na presença do fenótipo pró-regenerativo de macrófagos (M2). Essa população torna-se predominante a partir do quarto dia após a lesão, com redução até o sétimo dia, mas o número permanece alto até 10 dias após a lesão <sup>27,80</sup>. A expressão do TNF- $\alpha$  é maior nos primeiros dois dias após a lesão <sup>27</sup>, enquanto a expressão de IL-6 é maior no terceiro dia e permanece alta até o sétimo dia após uma lesão aguda <sup>35</sup>. A expressão do TGF- $\beta$  parece ser maior no sétimo dia após uma lesão aguda, diminuindo a partir de então <sup>33</sup>. Já a expressão de VEGF é aumentada após o início da fase inflamatória e pode perdurar por vários dias <sup>37</sup>.

Os presentes achados revelaram que o músculo lesionado em animais idosos abriga neutrófilos em menor número que os observados nos animais jovens, mas que cronologicamente atingem um pico numérico no primeiro dia após a lesão e não ocorrem nos dias subsequentes, o que é muito semelhante ao padrão encontrado em indivíduos jovens <sup>27,80</sup>. Ghaly & Marsh (2010) relataram acentuada redução na expressão proteica da enzima mieloperoxidase, que é um marcador de neutrófilos, do primeiro ao terceiro dia após uma lesão por contusão em ratos idosos <sup>50</sup>. Recentemente, um estudo avaliando a presença de neutrófilos no tecido muscular de camundongos idosos, dois e cinco dias após a ocorrência de uma lesão de contração prolongada, demonstrou que o número de neutrófilos foi maior após dois dias e retornou aos níveis basais após cinco dias <sup>51</sup>. A diferença na presença

continuada de neutrófilos entre os estudos citados e a presente investigação pode estar relacionada à magnitude e ao tipo de lesão <sup>27</sup> ou ao tipo de marcação para a identificação de neutrófilos. No entanto, todos os três modelos experimentais demonstraram que a presença de neutrófilos foi breve, como ocorre em indivíduos jovens.

A presença de macrófagos CD68+ (fenótipo M1) nos músculos de animais idosos não tratados foi maior no terceiro dia e diminuiu no sétimo dia, um padrão cronológico semelhante ao padrão descrito para animais jovens submetidos à lesão aguda <sup>27,73,80</sup>. Em indivíduos jovens, entretanto, o número desse tipo de célula retorna aos níveis mais próximos aos basais após sete dias, enquanto a presença de macrófagos M1 na presente investigação continuou sendo maior do que a encontrada no primeiro dia após a lesão e superior a encontrada nos músculos de animais jovens neste período, demonstrando a presença dessas células por um mais tempo em indivíduos idosos. Além disso na comparação com os indivíduos jovens, o número de macrófagos M1 foi menor no primeiro dia após a lesão nos idosos, o que poderia indicar uma ativação mais lenta, já que só no terceiro dia foi possível observar um número de macrófagos M1 semelhante ao encontrado nos músculos dos animais jovens. Ghaly & Marsh (2010) relataram um aumento acentuado na expressão proteica de CD68 do primeiro para o terceiro dia após uma lesão por contusão em ratos idosos <sup>50</sup> e Sloboda *et al.* (2018) também verificaram que o número de células CD68+ era maior cinco dias após o alongamento da lesão de contração em camundongos idosos do que após dois dias <sup>51</sup>.

O número de macrófagos CD206+ (fenótipo M2) atingiu um pico no terceiro dia e permaneceu praticamente no mesmo nível no sétimo dia nos animais idosos não tratados. Na comparação com os indivíduos jovens, o número de macrófagos M2 foi menor nos idosos nos períodos de 1 e 3 dias, se igualando aos dos jovens somente no período de 7 dias. O mesmo estudo citado acima <sup>51</sup> relatou um número maior de macrófagos M2 (CD163+) em um período posterior (5 dias) após um alongamento da lesão de contração em camundongos idosos. Em indivíduos jovens, a ocorrência de macrófagos M2 (CD206+) no tecido muscular lesionado atinge um pico no quarto dia e depois diminui, permanecendo estável por pelo menos sete dias. Os macrófagos M2 (CD163+) permanecem elevados entre o quarto e o sétimo dia após a lesão <sup>27,73,80</sup>.

A presença continuada de macrófagos M1 por período mais longo em animais idosos pode indicar uma maior expressão das citocinas produzidas por esses macrófagos. No presente estudo, entretanto, a expressão de TNF- $\alpha$  e IL-6 foi maior no primeiro dia (grupo controle), principalmente o TNF- $\alpha$ , e declinou rapidamente nos dias seguintes. Em contraste, a expressão do TGF- $\beta$  permaneceu praticamente inalterada durante todos os períodos experimentais. Sloboda *et al.* (2018) encontraram uma redução na expressão de iNOS, TNF- $\alpha$ , arginase 1 e IL-10 entre dois e cinco dias após um alongamento da lesão de contração em camundongos idosos <sup>51</sup>. Hamada *et al.* (2005) verificaram que os níveis de mRNA para TNF- $\alpha$ , IL-6 (e não estatisticamente significante) e TGF- $\beta$  foram aumentados três dias após uma lesão aguda excêntrica, mas foram menores nos homens mais velhos em comparação aos homens mais jovens <sup>59</sup>. Com o mesmo tipo de lesão, Ghaly & Marsh (2010), encontraram maior expressão proteica de TGF- $\beta$  no tecido muscular de ratos idosos em comparação com ratos jovens, bem como um aumento na marcação desta proteína entre o primeiro e terceiro dia após uma lesão por contusão em ratos idosos <sup>50</sup>.

Muitos pesquisadores associam a dificuldade em relação à reparação do músculo esquelético em indivíduos mais velhos a um grau maior <sup>4,42,50,51,58</sup> ou menor <sup>4,51,59</sup> da quantidade de células imunes e respectivos produtos no tecido lesado comparada às quantidades encontradas em indivíduos mais jovens. Também é importante considerar que a presença continuada de ambos os fenótipos de macrófagos <sup>4,60</sup> por um período maior em indivíduos mais velhos certamente leva à lentidão ou ineficiência do processo de reparo. Além disso, a resposta de células imunes, especialmente macrófagos, em indivíduos mais velhos pode ser diminuída ou até mesmo contrária ao que é classicamente esperado para um dado fenômeno. Esse fenômeno é conhecido como imunossenescência, o que também pode dificultar a resolução do processo de lesão <sup>42,61-63</sup>.

Em relação à cronologia do processo de reparação muscular em ratos jovens após uma lesão aguda, o tecido apresenta maior área de infiltrado inflamatório, edema e mionecrose até o terceiro dia após a lesão e redução dos processos inflamatórios no sétimo dia, com mionecrose escassa e a ocorrência de fibras musculares imaturas (<sup>66,68</sup>). Relatos sobre o processo de reparo muscular em ratos idosos também indicam que o tecido apresenta moderado infiltrado inflamatório acompanhado por áreas de necrose e edema até o terceiro dia após a lesão, mas

apresenta intenso infiltrado inflamatório e maior área de mionecrose no sétimo dia, com um número muito pequeno de fibras musculares imaturas, indicando a perpetuação do processo inflamatório e conseqüente retardo no reparo <sup>76</sup>. No presente estudo, a permanência de um elevado número de macrófagos M1 após 7 dias da lesão e o menor número de macrófagos M2 nos períodos iniciais podem auxiliar a entender a permanência da necrose tecidual mesmo após 7 dias da ocorrência da lesão muscular nos indivíduos idosos.

No presente estudo, o tecido muscular lesado tratado com FBM exibiu uma modulação temporal e quantitativa nas diferentes células imunes, o que tornou o processo de reparo em ratos idosos muito mais próximo do que ocorre em indivíduos jovens <sup>27,80</sup>, com redução do número de neutrófilos e aumento transitório na quantidade de ambos os fenótipos de macrófagos no terceiro dia, seguido de redução nos dois tipos no sétimo dia. A expressão gênica de citocinas importantes para o processo de reparo também foi aumentada de forma temporal. Aos três dias após a lesão, o aumento da expressão de TNF- $\alpha$  encontrado nos músculos tratados com FBM pode ter contribuído para a intensificação do processo inflamatório, coincidindo com a maior presença de macrófagos M1 nesse período. O aumento na expressão do TGF- $\beta$  (coincidindo com a presença de macrófagos M2), que é uma citocina que pode apresentar efeito antiinflamatório, mas que também tem papel quimiotático para linfócitos e macrófagos <sup>27,29,41,84</sup> também pode ter contribuído para este quadro. Além disso, ambas as citocinas desempenham um papel importante na estimulação da proliferação de células precursoras miogênicas <sup>27,84</sup>, o que poderia explicar o maior número de fibras musculares imaturas descritas por Brito *et al.* (2017) após sete dias de tratamento para lesões musculares em ratos idosos (utilizando o mesmo modelo e parâmetros dosimétricos empregados no presente estudo) <sup>76</sup>. O aumento da expressão de TGF- $\beta$  apenas no período de três dias no grupo irradiado também pode ter contribuído para melhor organização tecidual, conforme descrito Brito *et al.* (2017) <sup>76</sup>, uma vez que essa citocina exerce influência na regulação da produção de colágeno <sup>84</sup>. Pertille *et al.* (2012) verificaram que o tratamento das lesões de contusão com fotobiomodulação (830nm, 30mW, 4J/cm<sup>2</sup>, 0,96J por tratamento e 21 sessões) em ratos idosos levou a uma redução significativa na área lesada após 21 dias, mas não encontraram alterações na expressão dos fatores reguladores miogênicos MyoD e miogenina, bem como TGF- $\beta$  nos animais irradiados neste período <sup>74</sup>. A diferença na modulação do TGF- $\beta$  e

diferenças nos resultados entre o estudo citado e a presente investigação estão muito provavelmente relacionados ao modelo de lesão e intensidade, bem como aos parâmetros de tratamento dosimétricos, como a densidade de energia. Os efeitos do FBM dependem fortemente dos parâmetros dosimétricos empregados. Assim, densidades de energia maiores ou menores que a ideal podem não gerar um efeito terapêutico ou podem ter efeitos contrários aos desejados, o que é denominado “efeito bifásico” <sup>70</sup>.

O aumento da expressão de IL-6 no grupo lesionado tratado apenas com FBM no terceiro dia também pode ter contribuído para o aumento do número de fibras imaturas relatadas Brito *et al.* (2017) aos sete dias <sup>76</sup>, uma vez que esta citocina também desempenha um papel importante na proliferação e diferenciação de células precursoras miogênicas <sup>85,86</sup>.

A expressão proteica de VEGF apresentou-se aumentada após 3 e 7 dias de tratamento. Esse aumento pode ter contribuído com o aumento de novos vasos sanguíneos descritos por Brito *et al.* (2017) após 7 dias de tratamento com a FBM <sup>76</sup>. Vatansever *et al.* (2012) também relataram um aumento na expressão de VEGF após 5 dias de tratamento com a FBM <sup>75</sup>, o que vai de encontro com o presente resultado.

## 7. CONCLUSÕES

Os resultados da comparação da presença de células inflamatórias nos tecidos musculares de ratos jovens e idosos demonstram que:

- Após 1 dia da lesão, a presença de neutrófilos, macrófagos M1 e macrófagos M2 é menor em ratos idosos do que em jovens, o que pode indicar um menor grau de ativação ou maior lentidão de resposta.
- Após 3 dias, o número de macrófagos M1 é semelhante entre jovens e idosos, mas os macrófagos M2 são mais escassos nos músculos dos indivíduos idosos. Neste período, enquanto em indivíduos jovens, os macrófagos M1 diminuem em proporção e o tecido passa a ser colonizado majoritariamente por macrófagos M2, em idosos, a presença de macrófagos M2 continua baixa. Este fato pode dificultar transição para a fase de reparo, perpetuando o quadro pró-inflamatório.
- Após 7 dias, os macrófagos M1 são mais numerosos nos músculos dos ratos idosos do que nos dos ratos jovens. A permanência de macrófagos M1 em níveis mais elevados neste período pode contribuir para uma inflamação prolongada, capaz de comprometer o reparo, ampliando a necrose tecidual.

Já a avaliação dos efeitos da FBM sobre as células inflamatórias e seus produtos no reparo muscular de indivíduos idosos mostraram que:

- A FBM foi capaz de diminuir a presença de neutrófilos após um dia de tratamento, aumentar o número de macrófagos M1 e M2 após três dias de tratamento e, posteriormente, diminuir o número dessas células no período de sete dias. Esta modulação torna o processo de reparo mais próximo ao que ocorre em indivíduos jovens no que concerne a presença temporal dos diferentes tipos de células inflamatórias.
- Somado a isso, a expressão gênica de *TNF- $\alpha$* , *IL-6*, *TGF- $\beta$*  e VEGF foram maiores no grupo irradiado do que no grupo não tratado no terceiro dia do período experimental e após sete dias de tratamento, apenas a expressão de *TNF- $\alpha$*  e VEGF permaneceram maior no grupo irradiado do que no grupo não tratado. O aumento temporal na expressão de citocinas e fatores de crescimento pode estar ligado não somente à presença de maior quantidade de células inflamatórias gerado pela FBM (embora estes produtos não sejam exclusivamente produzidos por elas) como à indução de maior ativação destas células.

Em resumo, existem diferenças significativas nos tipos e na quantidade das células inflamatórias que estão presentes no tecido muscular lesionado de ratos jovens e de idosos. A FBM é capaz de alterar cronologicamente a presença das células inflamatórias e de seus produtos durante o reparo muscular de ratos idosos, tornando este processo mais semelhante ao que ocorre nos jovens, aumentando sua velocidade e conseqüentemente as chances de regeneração tecidual.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Síntese de Indicadores Sociais. 2016.
- 2 - Organização Mundial da Saúde. Ageing well must be global priority', warns UN health agency in new study. **UN News**. 2015.
- 3 - Verdijk LB, Koopman R, Schaart G, Meijer K, Savelberg HH, van Loon LJ. O conteúdo de células satélites é reduzido especificamente nas fibras do músculo esquelético do tipo II nos idosos. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. 2007; (292): 151-157.
- 4 - Peake J, Della Gatta P, Cameron-Smith D. Aging and its effects on inflammation in skeletal muscle at rest and following exercise-induced muscle injury. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. 2010; 6: 1485-1495.
- 5 - Nilwik R, Snijders T, Leenders M, Groen BB, Kranenburg J, Verdijk LB, Van Loon LJ. The decline in skeletal muscle mass with aging is mainly attributed to a reduction in type II muscle fiber size. **Experimental Gerontology**. 2013; 48: 492-498.
- 6 - Wang Y, Wehling-Henricks M, Welc SS, Fisher AL, Zuo Q, Tidball JG. Aging of the immune system causes reductions in muscle stem cell populations, promotes their shift to a fibrogenic phenotype, and modulates sarcopenia. **FASEB J**. 2018.
- 7 - Milijakovic N, Lim JY, Milijakovic I, Frontera WR. Aging of skeletal muscle fibers. **Ann Rehabil Med**. 2015; 39(2): 155-162.
- 8 - Ziaaldini MM, Marzetti E, Picca A, Murlasits Z. Biochemical Pathways of Sarcopenia and Their Modulation by Physical Exercise: A Narrative Review. **Frontiers in Medicine**. 2017; 4 (167): 1-8.
- 9 - Picca A, Calvani R, Bossola M, Allocca E, Menghi A, Pesce V, Lezza MAS, Bernabei R, Landi F, Marzetti E. Update on mitochondria and muscle aging: all wrong roads lead to sarcopenia. **Biological Chemistry**. 2018; 399: 421-436.

- 10 - Montero-Fernandez N, Serra-Rexach JA. Role of exercise on sarcopenia in the elderly. **Eur J Phys Rehabil Med.** 2013; 1: 131-143.
- 11 - Gheno R, Cepparo JM, Rosca CE, Cotton A. Musculoskeletal disorders in the elderly. **J Clin Imaging Sci.** 2012; 2 (3): 1-8.
- 12 - Tidball JG. Inflammatory processes in muscle injury and repair. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** 2005; (2): 345-353.
- 13 - Tidball JG, Villalta SA. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** 2010; 298(5): 1173-1187.
- 14 - Rigamonti E, Zordan P, Sciorati C, Rovere-Querini P, Brunelli S. Macrophage Plasticity in Skeletal Muscle Repair. **BioMed Research International,** 2014; 1-9.
- 15 - Carlson BM, Faulkner JA. Muscle transplantation between young and old rats: age of host determines recovery. **Am J Physiol.** 1989; (256): 1262-1266.
- 16 - Marsh DR, Hinds LR, Lester WS, Reinking BE, Booth FW. The force frequency relationship is altered in regenerating and senescent rat skeletal. **Muscle Nerve.** 1998; (21): 1265-1274.
- 17 - Shefer G, Van de Mark DP, Richardson JB, Yablonka-Reuveni Z. Satellite-cell pool size does matter: defining the myogenic potency of aging skeletal muscle. **Dev Biol.** 2006; (1): 50-66.
- 18 - Hammers DW, Merritt EK, Matheny RW Jr, Adamo ML, Walters TJ, Estep JS, Farrar RP. Functional deficits and insulin-like growth factor-I gene expression following tourniquet-induced injury of skeletal muscle in young and old rats. **J Appl Physiol.** 2008; (4):1274-1281.
- 19 - Ciciliot S, Schiaffino S. Regeneration of mammalian skeletal muscle. Basic mechanisms and clinical implications. **Curr Pharm Des.** 2010; 16(8): 906-914.

- 20 - García-Prat L, Sousa-Victor P, Muñoz-Cánoves P. Function dysregulation of stem cells during aging: a focus on skeletal muscle stem cells. **FESB J.** 2013; (17): 4051:4062.
- 21 - Shaw AC, Goldstein DR, Montgomery RR. Age-dependent dysregulation of innate immunity. **Nat Rev Immunol.** 2013; (12): 875-887.
- 22 - Merritt EK, Stec MJ, Thalacker-Mercer A, Windham ST, Cross JM, Shelley DP, Tuggle SC, Kosek DJ, Kim J, Bamman MM. Heightened muscle inflammation susceptibility may impair regenerative capacity in aging humans. **J Appl Physiol.** 2013; (115): 937–948.
- 23 - Domingues-Faria C, Vasson MP, Mendes NG, Boirie Y, Walrand S. Skeletal muscle regeneration and impact of aging and nutrition. **Ageing Research Reviews.** 2016; (26): 22-36.
- 24 - Butterfield TA, Best TM, Merrick MA. The dual roles of neutrophils and macrophages in inflammation: a critical balance between tissue damage and repair. **J Athl Train.** 2006; (41): 457–465.
- 25 - Bosurgi L, Manfredi AA, Querinini PR. Macrophages in injured skeletal muscle: a perpetuum mobile causing and limiting fibrosis, prompting or restricting resolution and regeneration. **Frontiers in Immunology.** 2011; (2): 62.
- 26 - Saclier m, Cuvellier s, Magnan m, Mounier r, Chazaud B. Monocyte/macrophage interactions with myogenic precursor cells during skeletal muscle regeneration. **FEBS Journal.** 2013; (280):4118–4130.
- 27 - Tidball JG. Regulation of muscle growth and regeneration by the immune system. **Nature Reviews Immunology.** 2017; 17: 165-78.

- 28 - Brigitte M, Schilte C.; Plonquet A, Baba-Amer Y, Henri A, Charlier C, Tajbakhsh S, Albert M, Gherardi RK, Chrétien F. Muscle resident macrophages control the immune cell reaction in a mouse model of notexin-induced myoinjury. **Arthritis Rheum.** 2010; (1):268-279.
- 29 - Novak ML, Koh TJ. Macrophage phenotypes during tissue repair. **J Leukoc Biol.** 2013; 93: 875-81.
- 30 - Rodriguez D, Charlotte JM, Christopher MO. Matrix metalloproteinases: What do they not do? New substrates and biological roles identified by murine models and proteomics. **Biochimica et Biophysica Acta.** 2010; (1): 39-54.
- 31 - Hadler-Olsen E, Fadnes B, Sylte L, Uhlin-Hansen L, Winberg JO. Regulation of matrix metalloproteinase activity in health and disease. **FESB J.** 2011; (1): 28-45.
- 32 - Kim J, Lee J. Matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase responds to muscle damage after eccentric exercise. **J Exerc Rehabil.** 2016; (14): 260-265.
- 33 - Mesquita-Ferrari RA, Martins MD, Silva JA, Silva TD, Piovesan RF, Pavesi VC, Bussadori SK, Fernandes KPS. Effects of low-level laser therapy on expression of TNF-alpha and TGF-beta in skeletal muscle during the repair process. **Lasers Med Sci.** 2011; 26 (3): 335-340.
- 34 - Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity and disease. **Cold Spring Harb Perspect Biol.** 2014.
- 35 - Alves NA, Ribeiro BG, Fernandes KPS, Souza NHC, Rocha LA, Nunes FD, Bussadori SK, Mesquita-Ferrari RA. Comparative effects of low-level laser therapy pre- and post-injury on mRNA expression of MyoD, myogenin, and IL-6 during the skeletal muscle repair. **Lasers in Medical Science.** 2016; 31: 679-685.
- 36 - Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications. **Semin Oncol.** 2002; (29): 10-14.

- 37 - Deasy BM, Feduska JM, Payne TR, Li Y, Ambrosio F, Huard J. Effect of VEGF on the Regenerative Capacity of Muscle Stem Cells in Dystrophic Skeletal Muscle. **Mor Ther.** 2009; (10): 1788-1798.
- 38 - Frey SP, Jansen H, Raschke MJ, Meffert RH, Ochman S. VEGF Improves Skeletal Muscle Regeneration After Acute Trauma and Reconstruction of the Limb in a Rabbit Model. **Clin Orthop Relat Res.** 2012; (12): 3607-3614.
- 39 - Ginderachter JA, Movahedi K, Ghassabeh GH, Meerschaut S, Beschim A, Raes G, Baetselier PD. Classical and alternative activation of mononuclear phagocytes: Picking the best of both worlds for tumor promotion. **Immunobiology.** 2006; (211):487-501.
- 40 - Sanjabi S, Zenewicz LA, Kamanaka M, Flavell RA. Anti-inflammatory and pro-inflammatory roles of TGF-beta, IL-10, and IL-22 in immunity and autoimmunity. **Curr Opin Pharmacol.** 2009; (9):447–453.
- 41 - Delaney K, Kasprzycka P, Ciemerych MA, Zimowska M. The role of TGF- $\beta$ 1 during skeletal muscle regeneration. **Cell Biol Int.** 2017; (7): 706-715.
- 42 - Wang Y, Wehling-Henricks M, Samengo G, Tidball JG. Increases of M2a macrophages and fibrosis in aging muscle are influenced by bone marrow aging and negatively regulated by muscle-derived nitric oxide. **Ageing Cell.** 2015; 14: 678-88.
- 43 - Vasson MP, Farges MC, Gonçalves-Mendes N, Talvas J, Ribalta J, Winklhofer-Roob B, Rock E, Rossary A. Does aging affect the immune status? A comparative analysis in 300 healthy volunteers from France, Austria and Spain. **Immun Ageing.** 2013; 10(1): 38.
- 44 - Stahl EC, Brown BN. Cell therapy strategies to combat immunosenescence. **Organogenesis.** 2015; 11 (4): 159-172.
- 45 - Schaap LA, Pluijm SM, Deeg DJ, Harris TB, Kritchevsky SB, Newman AB, Colbert LH, Pahor M, Rubin SM, Tyllavsky FA, Visser M; Health ABC Study. Higher inflammatory marker levels in older persons: associations with 5-year change in muscle mass and muscle strength. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci.** 2009; (11):

1183-1189.

46 - Franceschi C, Campisi J. Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. **J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.** 2014; 69: 4-9.

47 - Chatta GS, Price TH, Stratton JR, Dale DC. Aging and marrow neutrophil reserves. **J Am Geriatr Soc.** 1994; 42(1): 77-81.

48 - Niwa Y, Kasama T, Miyachi Y, Kanoh T. Neutrophil chemotaxis, phagocytosis and parameters of reactive oxygen species in human aging: cross sectional and longitudinal studies. **Life Sci.** 1998; 44(22): 1655-1664.

49 - Wensch C, Patruta S, Daxbock F, Krause R, Horl W. Effect of age on human neutrophil function. **J Leukoc Biol.** 2000; 67(1): 40-45.

50 - Ghaly A, Marsh DR. Aging-associated oxidative stress modulates the acute inflammatory response in skeletal muscle after contusion injury. **Exp Gerontol.** 2010; 45: 381-88.

51 - Sloboda DD, Brown LA, Brooks SV. Myeloid cell responses to contraction-induced injury differ in muscles of young and old mic. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci.** 2018.

52 - Gomez CR, Plackett TP, Kovacs EJ. Aging and estrogen: modulation of inflammatory responses after injury. **Exp Gerontol.** 2007; (42): 451–456.

53 - Van Duin D, Mohanty S, Thomas V, Ginter S, Montgomery RR, Fikrig E, Allore HG, Medzhitov R, Shaw AC. Age-associated defect in human TLR-1/2 function. **J Immunol.** 2007; 178(2): 970-975.

54 - Nyugen J, Agrawal S, Gollapudi S, Gupta S. Impaired functions of peripheral blood monocyte subpopulations in aged humans. **J Clin Immunol.** 2010; 30(6): 806-813.

55 - Hearps AC, Martin GE, Angelovich TA, Cheng WJ, Maisa A, Landay AL, Jaworowski A, Crowe SM. Aging is associated with chronic innate immune activation

and dysregulation of monocyte phenotype and function. **Aging Cell**. 2012; (5): 867–875.

56 - Przybyla B, Gurley C, Harvey JF, Bearden E, Kortebein P, Evans WJ, Sullivan DH, Peterson CA, Dennis RA. Aging alters macrophage properties in human skeletal muscle both at rest and in response to acute resistance exercise. **Exp Gerontol**. 2006; 41(3): 320-327.

57 - Della Gatta PA, Garnham AP, Peake JM, Cameron-Smith D. Effect of exercise training on skeletal muscle cytokine expression in the elderly. **Brain Behav Immun**. 2014; (39): 80-86.

58 - Koh TJ, Peterson JM, Pizza FX, Brooks SV. Passive stretches protect skeletal muscle of adult and old mice from lengthening contraction-induced injury. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**. 2003; 58: 592-97.

59 - Hamada K, Vannier E, Satchek JM, Witsell AL, Roubenoff R. Senescence of human skeletal muscle impairs the local inflammatory cytokine response to acute eccentric exercise. **Faseb J**. 2005; 19: 264-66.

60 - Van der Poel C, Gosselin LE, Schertzer JD, Ryall JG, Swiderski K, Wondemaghen M, Lynch GS. Ageing prolongs inflammatory marker expression in regenerating rat skeletal muscles after injury. **J Inflamm**. 2011; 8 (41): 1 -9.

61 - Plowden J, Renshaw-Hoelscher M, Engleman C, Katz J, Sambhara S. Innate immunity in aging: impact on macrophage function. **Aging Cell**. 2004; 3: 161-67.

62 - Shaw AC, Joshi S, Greenwood H, Panda A, Lord JM. Aging of the innate immune system. **Curr Opin Immunol**. 2010; 22: 507-13.

63 - Dimitrijević M, Stanojević S, Blagojević V, Curuvija I, Vuinovic I, Petrovic R, Arsenovic-Ranin N, Vujic V, Lepasovic G. Aging affects the responsiveness of rat peritoneal macrophages to GM-CSF and IL-4. **Biogerontology**. 2016; 2: 359-71.

64 - Lopes-Martins RA, Marcos RL, Leonardo PS, Prianti AC, Jr., Muscara MN, Aimbire F, Frigo L, Iversen VV, Bjordal JM. Effect of low-level laser (Ga-Al-As 655

nm) on skeletal muscle fatigue induced by electrical stimulation in rats. **J Appl Physiol.** 2006; (1): 283-238.

65 - De Almeida P, Lopes-Martins RA, Tomazoni SS, Silva Jr JA, de Tarso Camillo de Carvalho P, Bjordal JM, Leal Junior EC. Low-level laser therapy improves skeletal muscle performance, decreases skeletal muscle damage and modulates mRNA expression of COX-1 and COX-2 in a dose-dependent manner. **Photochem Photobiol.** 2011; (5): 1159-1163.

66 - Baptista J, Martins MD, Pavesi VC, Bussadori SK, Fernandes KPS, Pinto Junior DDOS, Mesquita-Ferrari RA. Influence of laser photobiomodulation on collagen IV during skeletal muscle tissue remodeling after injury in rats. **Photomed Laser Surg.** 2011; 1: 11-17.

67 - Fernandes KPS, Alves AN, Nunes FD, Souza, NHC, Silva AJ, Bussadori SK, Mesquita-Ferrari RA. Effect of photobiomodulation on expression of IL-1 $\beta$  in skeletal muscle following acute injury. **Lasers in Medical Science.** 2013; (28): 1043-1046.

68 - Alves NA, Fernandes KPS, Deana AM, Bussadori SK, Mesquita-Ferrari RA. Effects of Low-Level Laser Therapy on Skeletal Muscle Repair: a systematic review. **Am. J. Phys. Med. Rehabil.** 2014; 93: 1073-1085.

69 - Ribeiro BG, Alves AN, Dos Santos, LAD, Cantero TM, Fernandes KPS, Dias DS, Bernardes N, De Angelis K, Mesquita-Ferrari RA. Red and Infrared Low-Level Laser Therapy Prior to Injury with or without Administration after Injury Modulate Oxidative Stress during the Muscle Repair Process. **Plos One.** 2016; (11): 1-13.

70 - Hamblin MR. Mechanisms and applications of the anti-inflammatory effects of photobiomodulation. **AIMS Biophys.** 2017; 4: 337-361.

71 - Barbosa AM, Villaverde AB, Sousa LG, Munin E, Fernandez CM, Cogo JC, Zamuner SR. Effect of low-level laser therapy in the myonecrosis induced by Bothrops jararacussu snake venom. **Photomed Laser Surg.** 2009; (4): 591-597.

72 - Terena SML, Fernandes KPS ; Bussadori SK, Alves AN, Mesquita-Ferrari RA. Effects of low level laser in the morphology of the skeletal muscle fiber during

compensatory hypertrophy in plantar muscle of rats. **Biophotonics South America**. 2015; 953121.

73 - Souza NHC, Mesquita-Ferrari RA, Rodrigues MFSD, Silva DFT, Ribeiro BG, Alves AN, Garcia MP, Nunes FD, Silva Junior EM, França CM, Bussadori SK, Fernandes KPS. Photobiomodulation and different macrophages phenotypes during muscle tissue repair. **J Cell Mol Med**. 2018; 00: 1-13.

74 - Pertille A, Macedo AB, Oliveira CP. Evaluation of muscle regeneration in aged animals after treatment with low-level laser therapy. **Rev Bras Fisioter**. 2012; 16 (6): 495-501.

75 - Vatansever F, Rodrigues NC, Assis LL, Peviani SS, Durigan JL, Moreira FM, Hamblin MR, Parizoto NA. Low intensity laser therapy accelerates muscle regeneration in aged rats. **Photonics Lasers Med**. 2012; 4: 287-297.

76 - Brito A, Alves NA, Ribeiro BG, Barbosa DVDE, Magalhães EMR, Fernandes KPS, Bussadori SK, Goulardins JB, Mesquita-Ferrari. Effect of photobiomodulation on connective tissue remodeling and regeneration of skeletal muscle in elderly rats. **Lasers Med Sci**. 2018; 33 (3): 513-521.

77 - Fernandes KPS, Souza NH, Mesquita-Ferraris RA, Silva DF, Rocha LA, Alves NA, Sousa DB, Bussadori SK, Hamblin MR, Nunes FD. Photobiomodulation with 660-nm and 780-nm laser on activated J774 macrophage-like cells: Effect on M1 inflammatory markers. **J Photochem Photobiol B**. 2015; 153: 344-351.

78 - Miyabara EH, Aoki MS, Soares AG, Moriscot AS. Expression of tropism- related genes in regenerating skeletal muscle of rats treated with cyclosporin-A. **Cell Tissue Res**. 2005; (319): 479-89.

79 - Alves AN, Fernandes KPS, Silva CAA, Deana AM, França CM, Bussadori SK, Nunes SK, Mesquita-Ferrari RA. Effects of nandrolone decanoate on activity of matrix metalloproteinase 2 in tibialis anterior muscle during the repair process. **Clin Exp Med Lett**. 2012; 53(2): 75-79.

- 80 - Silva Junior EM, Mesquita-Ferrari RA, França CM, Andreo L, Bussadori SK, Fernandes KPS. Modulating effect of low intensity pulsed ultrasound on the phenotype of inflammatory cells. **Biomed Pharmacother.** 2017; 96: 1147-1153.
- 81 - Ribeiro BG, Alves AN, Santos LAD, Fernandes KPS, Cantero TM, Gomes MT, França CM, Silva, DFT, Bussadori SK, Mesquita-Ferrari RA. The effect of low-level laser therapy (LLLT) applied prior to muscle injury. **Lasers in Surgery and Medicine.** 2015; (47): 571-578.
- 82 - Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. **Methods.** 2011; 25: 402-408.
- 83 - Laumonier T, Menetrey J. Muscle injuries and strategies for improving their repair. **J Exp Orthop.** 2016; 3: 1-9.
- 84 – Rőszer T. Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. *Mediators Inflamm.* 2015:816460.
- 85 - Langen RCJ, Van Der Velden JLJ, Schols AMWJ, Kelders MC, Wouters EF, Janssen-Heininger YM. Tumor necrosis factor-alpha inhibits myogenic differentiation through MyoD protein destabilization. **FASEB J.** 2004; 18: 227–37.
- 86 - Kollias HD, McDermott JC. Transforming growth factor- and myostatin signaling in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 2008; 104: 579–87.

## 9. ANEXOS

ACCEPTED MANUSCRIPT

### The effects of photobiomodulation on inflammatory infiltrate during muscle repair in advanced-age rats

Evaldo Moreira da Silva, Junior, PhD, Raquel Agnelli Mesquita-Ferrari, PhD, Maria Fernanda Setúbel Destro Rodrigues, PhD, Eric Moreno Ramos Megalhães, BPT, Sandra Kelil Bussadori, PhD, Adriana de Brito, PhD, Felipe de Moura Messias, MS, Nadhia Helena Costa Souza, PhD, Agnelo Neves Alves, PhD, Kristianne Porto Santos Fernandes, PhD 

*The Journals of Gerontology: Series A*, g1z076, <https://doi.org/10.1093/gerona/g1z076>

Published: 20 March 2019 [Article history](#) ▼

 Cite  Permissions  Share ▼

#### Abstract

Photobiomodulation (PBM) enhances muscle repair in aged animals, but its effect on the modulation of the phenotype of immune cells has not yet been determined. Rats (20-month-old) were submitted to cryoinjury of the tibialis anterior muscle and were treated with PBM. After 1, 3 and 7 days, the muscles were submitted to immunohistochemical analysis for the determination of neutrophils and macrophage phenotypes. The muscles treated with PBM exhibited a smaller number of neutrophils after one day of treatment and a greater number of both M1 and M2 macrophages after three days of treatment. The irradiated tissues exhibited a smaller amount of both macrophage phenotypes after seven days of treatment. PBM produced temporal alterations in the phenotype of the inflammatory cells during muscle repair process in advanced-age animals, indicating that these mechanisms may contribute to the beneficial effects of this therapy in the treatment of muscle injuries.

**Keywords:** Photobiomodulation, muscles, inflammation, advanced-age, senescence

**Topic:** aging, phenotype, inflammatory cells, inflammation, macrophages, neutrophils, rats, muscle injuries, elderly, infiltrates, tibialis anterior muscle, pharmacy benefits managers, muscle repair

**Issue Section:** Research Report

**Protocolo de Pesquisa referente ao Projeto n° An0002/2014**

Título do Projeto: Avaliação do efeito do laser de baixa potência no processo de reparo muscular em animais senis.

Orientador: Raquel Agnelli Mesquita Ferrari

Alunos: Adriana de Brito/Felipe de Moura Messias

**Objetivos:**

Geral - avaliar os efeitos do laser de baixa potência (LBP) sobre a expressão gênica de citocinas inflamatórias em nível tecidual e celular durante a regeneração do músculo esquelético de ratos idosos.

Específicos - situar o papel do LBP: (1) morfologia do tecido muscular; (2) remodelamento da matriz extracelular por meio da atividade de MMP2 e deposição e distribuição do colágeno; (3) fenótipo de macrófagos localizados no sítio da lesão do tecido muscular; (4) síntese de citocinas e fatores de crescimento por macrófagos peritoneais.

**Método:** Será realizado em roedores, submetidos à terapia LBP e necrose muscular esquelética induzida por congelamento extremo.

**Animais (procedência, raça, linhagem, número de animais, peso, sexo):** Ratos Wistar Rattus norvegicus albinus; machos; peso corporal de aproximadamente 400 g; tamanho amostral de 66 animais; oriundos do biotério central da Uninove.

Os animais serão distribuídos aleatoriamente em 05 grupos experimentais:

- Grupo 1 Controle: Os animais não serão submetidos a nenhum procedimento, havendo remoção do músculo tibial anterior (TA) (n= 6);

- Grupo 2 Sham: Os animais serão apenas submetidos ao procedimento de exposição do músculo TA esquerdo (TAE) (n= 6);

- Grupo 3 Criolesão sem tratamento: Os animais serão apenas criolesionados no músculo TA direito (TAD) e estes não receberão tratamento (n=24);

- Grupo 4 Criolesão tratado com LBP: Os animais serão criolesionados no músculo TAD e tratados com LBP (n=24);

- Grupo 5 irradiado com LBP: Os animais receberão apenas a irradiação laser no músculo TAD (n=6).

Os animais dos grupos irradiado com LBP, criolesão sem tratamento e criolesão tratado com LBP serão eutanasiados após 1, 3, 5 e 7 dias, sendo 24 amostras de cada grupo experimental destinadas a análise de expressão gênica por PCR em tempo real e determinação do fenótipo de macrófagos por histoquímica. Os animais do grupo irradiado com LBP receberão a aplicação diretamente sobre a área correspondente ao local dos grupos criolesionados.

**Condições de alojamento e nutrição:** acondicionados em gaiolas plásticas, com temperatura ambiente de 22°C, umidade relativa do ar de 40% e ciclo claro/escuro de 12 horas. Os animais terão acesso irrestrito a água e ração.

**Medidas para evitar estresse e/ou dor nos animais:** Cada animal será submetido à anestesia pré-operatória composta de mistura de Cetamina e Xilazina. Cloridrato de tramadol (50 mg/kg por gavagem de 12/12 horas durante 48 horas)

**Procedimento Anestésico e/ou Analgésico (incluir dose e vias de administração):** Administração i.p. de mistura de Cetamina (80mg/kg massa do animal) e Xilazina (10mg/kg de massa do animal).

**Eutanásia:** Superdosagem de anestésico Cetamina (240mg/kg massa do animal) e Xilazina (30mg/kg de massa do animal).

**Pertinência e valor científico do estudo proposto:** O estudo possui pertinência científica e metodológica, que permitirá caracterizar o papel da LBP no reparo tecidual e modulação inflamatória da musculatura estriada esquelética.

Apresentado a este Comitê para análise ética, foi considerado:

**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

Comentário:

- Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEUA-UNINOVE, o relatório final sobre a pesquisa (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei Nº 11.794 -8 de outubro de 2008).

São Paulo, 17 de março de 2014.



**Prof. Dra. Kátia De Angelis**  
Coordenadora do Comitê de Ética no Uso de Animais  
Universidade Nove de Julho