

**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA REABILITAÇÃO**

**“INFLUÊNCIA DA LASERTERAPIA DE BAIXA POTÊNCIA NA REGENERAÇÃO  
DO MÚSCULO ESQUELÉTICO E NO REMODELAMENTO DA MATRIZ  
EXTRACELULAR APÓS LESÃO AGUDA”**

**AGNELO NEVES ALVES**

**São Paulo, SP**

**2012**

**AGNELO NEVES ALVES**

**“INFLUÊNCIA DA LASERTERAPIA DE BAIXA POTÊNCIA NA REGENERAÇÃO  
DO MÚSCULO ESQUELÉTICO E NO REMODELAMENTO DA MATRIZ  
EXTRACELULAR APÓS LESÃO AGUDA”**

Dissertação apresentada à Universidade  
Nove de Julho, para obtenção do título  
de Mestre em Ciências da Reabilitação.

**Orientadora:** Profa. Dra. Raquel Agnelli  
Mesquita Ferrari.

**Coorientadora:** Profa. Dra. Kristianne  
Porta Santos Fernandes.

**Coorientadora:** Profa. Dra. Cristiane  
Miranda França.

**São Paulo, SP**

**2012**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Alves, Agnelo Neves.

Influência da laserterapia de baixa potência na regeneração do músculo esquelético e no remodelamento da matriz extracelular após lesão aguda. / Agnelo Neves Alves. 2012.

66 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2012.

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

1. Laser. 2. Músculo esquelético. 3. Lesão. 4. Metaloproteinase de matriz.

I. Ferrari, Raquel Agnelli Mesquita. II. Título

CDU 615.8

São Paulo, 14 de dezembro de 2012.

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno(a): AGNELO NEVES ALVES

Título da Dissertação: "Influência da laserterapia de baixa potência na regeneração do músculo esquelético e no remodelamento da matriz extracelular após lesão aguda"

Presidente: PROFA. DRA. RAQUEL AGNELLI MESQUITA FERRARI



Membro: PROF. DR. FÁBIO DAUMAS NUNES



Membro: PROF. DR. RODOLFO DE PAULA VIEIRA



## DEDICATÓRIA

***Aos meus pais (João e Juçara) e meus irmãos (André e Angelo), pelo amor mais puro e sincero, por toda dedicação, apoio e ajuda incondicional em todos os momentos. Minha eterna gratidão e admiração.***

## AGRADECIMENTOS

*Acima de tudo, eu agradeço a **Deus**, por sua constante presença em minha vida, por iluminar cada dia da minha existência com seu infinito amor.*

*À minha namorada, **Camila**, pelo amor, apoio incondicional e companheirismo, fundamentais para a conclusão desta etapa.*

*À minha orientadora **Profa. Dra. Raquel Agnelli Mesquita Ferrari**, que sempre esteve presente em todas as etapas da minha vida acadêmica e a quem devo minha trajetória até aqui, sempre foi e será um exemplo para mim de competência, capacidade, e paciência. Agradeço pela confiança em mim depositada e dedicação em todas as etapas deste trabalho. Registro aqui toda minha admiração e agradecimento pelo convívio e conhecimento adquirido.*

*À minha coorientadora **Profa. Dra. Kristianne Porta Santos Fernandes**, pela importante ajuda quando se fez necessário, paciência e dedicação. Registro aqui toda minha admiração e agradecimento pelo conhecimento adquirido.*

*À minha coorientadora **Profa. Dra. Cristiane Miranda França**, pela sua disponibilidade e contribuição fundamental na realização e análise de resultados deste trabalho.*

*À **Profa. Dra. Daniela de Fátima Teixeira**, pela disponibilidade, colaboração e contribuição para a realização deste trabalho.*

*Ao **Prof. Dr. Fabio Daumas Nunes**, do departamento de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP) por me receber em seu laboratório e colaborar de forma fundamental na execução desse trabalho.*

*Aos **Professores** do curso de Pós-Graduação em Ciências da Reabilitação e Biofotônica da UNINOVE, pelo convívio, ensinamentos transmitidos e valiosa colaboração profissional.*

À **Dra. Lília Alves Rocha**, do laboratório de Patologia Molecular da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP), por todos os ensinamentos transmitidos e colaboração na preparação do PCR em tempo real e Imunohistoquímica.

Aos alunos de iniciação científica, **Renato Yamaguchi** e **Claudia Aparecida**, pela amizade conquistada, convivência agradável e ajuda durante a realização dos experimentos desse trabalho.

A todos os colegas do laboratório de Pesquisa da UNINOVE, **Marcio Parente, Nadhia, Felipe Messias, Carol Araruna, Eduardo, Flavia, Cristiano, Tábata, Caroline Rambo, Dora, Patrícia, Andréia, Nikele, Beatriz, Marcelo, Priscila, Martha** pelo convívio, respeito e aprendizado durante estes anos.

A todos os demais **colegas do curso de Pós-Graduação em Ciências da Reabilitação e Biofotônica da UNINOVE**, pelo saudável convívio e compartilhamento de idéias.

A todos os colegas do laboratório de Patologia Molecular da FOUSP, **Lília, Michella, Douglas, Carina, Danilo, Juvani, Fernanda, Marco Túlio** pelo convívio e presteza sempre que necessário.

Aos funcionários do laboratório de Pesquisa e Multidisciplinar da UNINOVE, em especial ao **João** e **Alexandre** pelo auxílio e colaboração.

Aos funcionários do laboratório de Patologia Molecular da FOUSP, em especial à **Dona Edna** pelo auxílio, colaboração e generosidade.

À **UNINOVE** pelo apoio e por ter me concedido a bolsa de estudo.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pela concessão da bolsa de mestrado (processo: 2011/04452-8), viabilizando não somente minha dedicação exclusiva durante o período, mas também a realização deste trabalho.

*“Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já tem a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia e, se não ousarmos fazê-las, teremos ficado para sempre á margem de nós mesmos.”*

**Fernando Pessoa**



## RESUMO

As lesões musculares representam um dos principais quadros clínicos encontrados nos centros de reabilitação. A terapia laser de baixa potência (TLBP) tem apresentado bons resultados no que diz respeito a modulação do processo inflamatório de tecido muscular em processo de reparo e prevenção de fibrose. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da TLBP sobre os aspectos morfológicos do tecido muscular, remodelamento de colágeno e a atividade da metaloproteinase de matriz 2 (MMP-2) em músculo esquelético de ratos após lesão aguda. Foram utilizados ratos Wistar, divididos em 05 grupos: (1) Controle; (2) Sham; (3) TLBP; (4) Criolesão e (5) Criolesão e TLBP. A criolesão consistiu de duas aplicações de bastão resfriado em nitrogênio líquido no músculo tibial anterior (TA). Para o tratamento diário foi utilizado o laser Arseneto de Gálio Alumínio (780nm, potência de 40 mW, área do feixe de 0.04 cm<sup>2</sup> e energia total de 3.2J). Os períodos de análise foram 1, 3 e 7 dias. Os aspectos morfológicos foram avaliados por coloração de H&E, a quantidade e distribuição das fibras colágenas pela coloração de picrosirius sob luz polarizada e atividade e identificação da MMP-2 pelas técnicas de zimografica e western blotting respectivamente. Os resultados demonstraram que a TLBP reduziu o número de células inflamatórias totais e da mionecrose após 1 dia, promoveu aumento no número de vasos sanguíneos após 3 e 7 dias além de aumentar o número de fibras musculares novas e imaturas, promoveu melhora na organização e distribuição de colágeno e aumentou a atividade da MMP-2 após 7 dias. Em conclusão a TLBP promoveu efeitos positivos sobre o reparo do músculo esquelético modulando o processo inflamatório, a atividade da MMP2 e o remodelamento das fibras colágenas neste tecido.

**Palavras-chave:** laser, músculo esquelético, lesão, metaloproteinase de matriz 2, colágeno.

## ABSTRACT

The muscle injuries represent a major clinical found in rehabilitation centers. Low-level laser therapy (LLLT) has demonstrated positive effects in modulating the inflammatory response, muscle tissue repair and the prevention of fibrosis. The aim this study was to evaluate the effects of low-level laser therapy (LLLT) on the repair of skeletal muscle in rats following acute injury through an analysis of morphological aspects, collagen fibers and the gelatinolytic activity of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) following injury. Wistar rats were divided into five groups: 1) control group; 2) sham group; 3) LLLT group; 4) non-treated injury group; and 5) injury + LLLT group. The acute injury was induced in tibialis anterior (TA) muscle by the contact with a cooled metal probe (3 mm in diameter) during 10 seconds, twice, in the same muscle area. LLLT was performed daily using an Aluminum Gallium Arsenide laser (780nm, output power of 40 mW, beam area of 0.04 cm<sup>2</sup> and total energy of 3.2J). The muscles were analyzed at one, three and seven days. The results showed that LLLT induced a reduction in inflammatory infiltrate and myonecrosis after one day, an increase in the number of blood vessels after three and seven days as well as an increase in the number of immature muscle fibers and MMP-2 gelatinase activity after seven days. In conclusion LLLT has a positive effect on the inflammatory process, MMP2 activity and collagen organization and distribution in the repair process of rat skeletal.

**Keywords:** laser, skeletal muscle, injury, matrix metalloproteinase 2, collagen.

## SUMÁRIO

<b>1. CONTEXTUALIZAÇÃO .....</b>	<b>18</b>
1.1 Fases do processo de reparo muscular.....	18
1.2 Células Satélites (CS).....	18
1.3 Remodelamento da matriz extracelular – Papel das metaloproteinases de matriz (MMPs) .....	19
1.4 Terapia laser de baixa potência (TLBP) e regeneração muscular .....	21
1.5 Justificativa. ....	22
<b>2. OBJETIVO .....</b>	<b>24</b>
2.1 Objetivo Geral.....	24
2.2 Objetivo Específico .....	24
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>25</b>
3.1 Animais .....	25
3.2 Delineamento experimental. ....	25
3.3 Procedimento de criolesão .....	26
3.4 Procedimento de irradiação laser .....	27
3.5 Eutanásia dos animais e remoção do músculo TA .....	28
3.6 Análise morfológica qualitativa .....	28
3.7 Análise morfológica quantitativa .....	29
3.8 Análise qualitativa e quantitativa das fibras colágenas.....	29
3.9 Análise da atividade gelatinolítica da MMP-2 por Zimografia .....	30
3.10 Identificação da MMP-2 por Western Blotting (WB).....	30

3.11 Análise Estatística .....	31
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>32</b>
4.1 Artigo 1 .....	32
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>57</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>58</b>
<b>7. APÊNDICE.....</b>	<b>66</b>
7.1 Comprovante de submissão do artigo para a revista <i>Lasers in</i> <i>Medical Science</i> .....	66

## LISTAS DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Demonstração do procedimento de criolesão .....	27
<b>Figura 2:</b> Imagem demonstrativa do equipamento laser e procedimento de irradiação.....	28

LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Parâmetros dosimétricos utilizados para a TLBP.....27

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ATP – Adenosina trifosfato

AsGa – Arseneto de Gálio

AsGaAl – Arseneto de Gálio Alumínio

BCIP – 5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil fosfato

BSA – Albumina de soro Bovino

CaCl<sub>2</sub> - Cloreto de cálcio

CDNA – DNA complementar

cm<sup>2</sup> – centímetro ao quadrado

CO<sub>2</sub> – Dióxido de carbono

DAB – Diaminobenzidina

DEPC – Dimetil pirocarbonato

DNA – Ácido desoxirribonucleico

dNTP – Deoxinucleotídeos trifosfatos

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

eV – Eletrón-volt

FGF – Fator de crescimento fibroblático

GAPDH – Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

HeNe – Hélio Neônio

HCL – Ácido clorídrico

HGF – Fator de crescimento hepatocitário

IGF-1 – Fator de crescimento semelhante à insulina 1

InGaAlP – Índio Gálio Alumínio Fósforo

IL1 – Interleucina 1

IL6 – Interleucina 6

IL15 – Interleucina 15

J – Joules

J/cm<sup>2</sup> – Joules por centímetro ao quadrado

LBP – Laser de baixa potência

kDa – KiloDalton

MEF2 – Fator estimulante miócito 2

mg – miligrama

mL – mililitro

mg/g – miligrama por grama



mg/mL – miligrama por mililitro

MHC – Miosina de cadeia pesada

MLC – Miosina de cadeia leve

mL/kg – mililitro por quilo

mM – milimolar

mm - milímetro

MMPs – Metaloproteinases de matriz

MMP-2 – Metaloproteinase de matriz 2

MMP-9 – Metaloproteinase de matriz 9

MRFs – Fatores regulatórios miogênicos

MRF4 – Fator regulatório miogênico 4

MyoD – Fator de determinação miogênico 1

Myf5 – Fator miogênico 5

mW – miliwatts

NaN<sub>3</sub> – Azida de sódio

NaCl – Cloreto de sódio

NBT – Azul de nitrotetrazólio

nM – nanomolar

nm – nanômetros

PCR – Reação em cadeia polimerase

RNA – Ácido ribonucleico

RNA<sub>m</sub> – Ácido ribonucleico mensageiro

rpm – Rotações por minuto

SDS - Dodecil sulfato de sódio

TGF- $\beta$  – Fator de crescimento transformador  $\beta$

TNF- $\alpha$  – Fator de necrose tumoral  $\alpha$

VEGF – Fator de crescimento vascular endotelial

W/cm<sup>2</sup> - Watts por centímetro ao quadrado

ZnCl<sub>2</sub> – Cloreto de zinco

$\mu$ L – microlitros

$\mu$ g – micrograma

$\mu$ m – micrometro

$\lambda$  – Comprimento de onda

## **1. CONTEXTUALIZAÇÃO**

As lesões musculares representam um dos principais quadros clínicos encontrados nos centros de reabilitação, e podem ocorrer por causas diretas (por exemplo, contusões e lacerações) ou por causas indiretas, tais como isquemias e disfunções neurológicas (BISCHOFF *et al.*, 1994; CHARGÉ *et al.*, 2004; SHI *et al.*, 2006). A rápida e eficiente regeneração muscular bem como a prevenção da formação excessiva de tecido cicatricial fibroso são os principais objetivos do processo de reabilitação (HUARD *et al.*, 2002).

### **1.1 Fases do processo de reparo muscular**

Após a lesão muscular, inicia-se o processo de reparo que consiste em várias fases interdependentes: degeneração e inflamação, regeneração, fibrose / formação de cicatriz, e remodelação (TIDBALL, 2005). A fase inicial deste processo é caracterizada pela migração de células inflamatórias, necrose das fibras lesionadas e fagocitose dos detritos celulares levando à ativação de células precursoras miogênicas (células tronco musculares) conhecidas como células satélites (HAWKE *et al.*, 2001; TIDBALL & VILLALTA, 2010). Após a ativação, estas células proliferam, se diferenciam em mioblastos que posteriormente se fundem às fibras lesionadas ou formam uma nova fibra muscular funcional (HAWKE *et al.*, 2001; CHARGÉ *et al.*, 2004; SHI *et al.*, 2006; DOGRA *et al.*, 2007).

### **1.2 Células satélites (CS)**

Em 1961, as células satélites (CS) foram identificadas pela primeira vez quando o exame de microscopia eletrônica do músculo esquelético demonstrou uma célula localizada entre a membrana plasmática e a membrana basal da fibra muscular (MAURO, 1961).

Nos últimos anos, tem sido demonstrado conclusivamente que a CS é a fonte primária de células musculares para a regeneração muscular, possuindo o potencial de autorrenovação. Um pequeno subconjunto pode se diferenciar em outros tipos celulares como adipogênicas, fibrogênicas e osteogênicas funcionando como uma célula-tronco do músculo esquelético (ASAKURA *et al.*, 2001; CSETE *et al.*, 2001;

SHEFER *et al*, 2004; COLLINS *et al.*, 2005; DAY *et al.*, 2007; KUANG *et al.*, 2008; YABLONKA-REUVENI *et al.*, 2008; AMINI-NIK *et al.*, 2011; BRACK *et al.*, 2012).

Em um músculo esquelético maduro, as CS residem em um estado de repouso (quiescente) e expressam marcadores como Pax-7, CD34 e M-caderina, mas podem voltar a entrar no ciclo celular em resposta a uma variedade de estímulos, tais como treinamentos e lesões (ZAMMIT, *et al.*, 2006). Em resposta a uma lesão muscular, as CS retomam o ciclo celular (ativadas) e proliferam-se. Uma pequena proporção sofre autorrenovação, ou seja, regressam ao estado quiescente para reabastecer a população de CS, porém a maioria se compromete com a regeneração e subsequentemente, se diferenciam e migram para a região danificada fundindo-se na fibra muscular pré-existente ou constituem uma nova fibra muscular (HAWKE & GARRY, 2001; TEDESCO *et al.*, 2010). Nestas diferentes etapas, as CS expressam marcadores miogênicos, que controlam as fases de ativação, proliferação e diferenciação celular durante o processo de reparo muscular (CHANGÉ & RUDNICKI, 2004; SHI & GARRY, 2006).

Entre os marcadores miogênicos destacam-se os fatores regulatórios miogênicos (FRMs), que são proteínas que pertencem à família dos fatores transcricionais músculo-específicos “basic helix-loop-helix” (bHLH), da qual fazem parte a MyoD, Myf5, Miogenina e MRF4 (LASSAR *et al.*, 1994; OLSON *et al.*, 1995; HAWKE & GARRY, 2001; RELAIX *et al.*, 2006; ZAMMIT *et al.*, 2008; YEN *et al.*, 2010; TIDBALL & VILLALTA, 2010)

Os mecanismos moleculares que controlam a ativação das células satélites ainda não são totalmente compreendidos, embora alguns estudos tenham demonstrado que citocinas inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 e IL-15) e fatores de crescimentos (HGF, FGF, IGF-I, TGF- $\beta$ ) são capazes de modular a expressão dos FRMs (LANGEN *et al.*, 2004; KUANG *et al.*, 2008; TEDESCO *et al.*, 2010).

### **1.3 Remodelamento da matriz extracelular – Papel das Metaloproteinases de matriz (MMPs)**

Ao longo das fases do processo de reparo ocorre a ativação de diferentes tipos celulares, juntamente com a síntese e degradação de proteínas intracelulares e componentes de matriz extracelular (MEC) (HUARD *et al.*, 2002; CARMELI *et al.*, 2004; KJAER, 2004; MANN *et al.*, 2011). No tecido muscular normal, a MEC é

composta principalmente de colágenos dos tipos I, III, IV, além de laminina, fibronectina, tenascina e proteoglicanos, que circundam as fibras musculares e desempenha um papel importante na manutenção da estrutura e reforço da função contrátil do músculo (KJAER, 2004; MANN *et al.*, 2011; TANG *et al.*, 2011).

As metaloproteinases de matriz (MMPs) são uma família de aproximadamente 25 enzimas que podem digerir seletivamente componentes individuais da MEC em processos fisiológicos e patológicos nos diferentes tecidos dentre eles o músculo esquelético (CORNELISON, 2008; ZIMOWSKA *et al.*, 2008; CHEN & LI, 2009).

No músculo esquelético destacam-se as collagenases (MMP-1, -8, -13 e -18) que têm a capacidade de clivar colágeno do tipo intersticial I, II e III, e as gelatinases (MMP-2 e -9) que degradam colágeno do tipo desnaturado IV, VII e X em muitos tecidos (CHEN & LI, 2009). As MMP-2 e -9 (também conhecidas como gelatinase A e B, respectivamente) são dependentes de cálcio e zinco para exercerem suas atividades proteolíticas possuindo importantes papeis durante o remodelamento da MEC e regeneração muscular (BELLAYR *et al.*, 2009).

Em situações fisiológicas os níveis de MMP-2 ativas no tecido muscular esquelético são relativamente baixos e a atividade da MMP-9 está ausente, sendo que a expressão destas enzimas sofre regulação por citocinas e fatores de crescimento (CARMELI *et al.*, 2006). No entanto, o aumento da atividade de ambas MMPs, -2 e -9, têm sido demonstrado em várias condições patológicas, tais como miopatia (distrofia de duchenne) e em condições inflamatórias no músculo esquelético (KHERIF *et al.*, 1999; KIESEIER *et al.*, 2001, SCHOSER *et al.*, 2002; FUKUSHIMA *et al.*, 2007; ZIMOWSKA *et al.*, 2008).

A MMP-2 está diretamente relacionada com a regeneração de novas fibras musculares, uma vez que atua sobre a degradação do colágeno de tipo IV e outros componentes da MEC, tais como fibronectina, laminina, elastina e proteoglicanos, estas proteínas constituem a membrana basal (lâmina externa) que circundam a fibra muscular. A proteólise destes componentes da membrana basal após lesão é importante para a proliferação, diferenciação de células satélites, fusão de mioblastos e formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese) que desempenha um papel importante para o sucesso da regeneração muscular (CARMELI *et al.*, 2004; CHEN & LI, 2009; ZIMOWSKA *et al.*, 2012). Por outro lado, a MMP-9 está associada não só com a degradação da MEC durante a inflamação, mas também com a ativação das células satélites durante o início da regeneração (KHERIF *et al.*,

1999; ZIMOWSKA *et al.*, 2008). Além disso, tem sido sugerido que a redução na atividade da MMP-9 e/ou da MMP-2 pode contribuir para o acúmulo excessivo de componentes da MEC e consequentemente o desenvolvimento de fibrose muscular (BELLAYR *et al.*, 2009; ZIMOWSKA *et al.*, 2012).

A fibrose excessiva no tecido muscular representa uma barreira mecânica à migração e fusão celular, limita a perfusão vascular no local da lesão impedindo a regeneração normal após lesão deste tecido (CARMELI *et al.*, 2006; CHEN *et al.*, 2009; MANN *et al.*, 2011).

#### **1.4 Terapia Laser de baixa potência (TLBP) e regeneração muscular**

A palavra laser é uma acrônimo que corresponde "*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*", a qual significa "Amplificação da Luz por Emissão Estimulada por Radiação" (MALUF *et al.*, 2006; LINS *et al.*, 2010). A aplicação terapêutica do laser monocromático, possui baixa energia com potência relativamente baixa (inferior a 500 mW), utilizando dosagens normalmente inferiores a 35 J/cm<sup>2</sup> e consideradas baixas para efetuar qualquer aquecimento nos tecidos irradiados, sendo conhecida como terapia laser de baixa potência (TLBP) ou simplesmente laserterapia (MIKAIL, 2009). Existem diversos tipos de lasers, os mais usados encontram-se na porção óptica do espectro vermelho e infravermelho (400 a 780 nm e 780 a 1mm) sendo seus fótons de energia inferiores a 2,0 elétron-volt (eV) e, portanto, inferiores à energia da ligação das moléculas biológicas e do DNA, não havendo a quebrar de ligações químicas e desta forma, não e capazes de induzir mutação e carcinogênese (FUJIHARA, 2006, MOORE *et al.*, 2005).

De uma forma resumida, a ação da irradiação laser nos tecidos consiste na absorção da luz (fótons) pelos fotorreceptores localizados nas células, que são capazes de modular as reações bioquímicas e fotoquímicas específicas dentro da célula e estimular uma série de reações intracelulares, resultando em uma aceleração da transferência de elétrons em partes da cadeia respiratória ocorrendo assim à síntese de ATP (DORTBUDAK, 2000; STEIN *et al.*, 2005; RENNO *et al.*, 2011).

O laser de baixa potência (LBP) é considerado um recurso fotobioestimulante em tecidos, por meio de seus efeitos biológicos em diversas condições clínicas e experimentais, tais como analgésicos, anti-inflamatórios e cicatrizantes (WEISS &

ORON, 1992; BIBIKOVA & ORON, 1995; ROCHKIND *et al.*, 2001; BJORDAL *et al.*, 2003; NAKANO *et al.*, 2009; LINS *et al.*, 2010; DOURADO *et al.*, 2011).

Nos últimos anos muitos estudos têm avaliado os efeitos da irradiação laser sobre o tecido muscular, entretanto, os efeitos do TLBP na regeneração dos tecidos dependem essencialmente dos parâmetros dosimétricos adotados como o tempo de exposição, da dose, do comprimento de onda e da frequência de irradiação utilizada (KARU, 2005; BIBIKOVA & ORON, 1995).

Neste contexto, CRESSONI *et al.*, 2008 verificaram que o laser InGaAlP, no comprimento de onda 785nm com dose de 2.7J por sessão (2 e 4 sessões) foi capaz de reduzir o infiltrado inflamatório e acelerar a regeneração do tecido conjuntivo por estimular a proliferação de fibroblastos, proporcionando assim condições para melhorar a organização e o alinhamento das fibras musculares em regeneração, os animais que receberam 4 sessões de tratamento apresentaram células musculares em um estágio mais avançado de maturação.

BARBOSA *et al.*, 2009 que utilizaram o laser vermelho (685 nm, 4,2 J/cm<sup>2</sup>) sobre o músculo gastrocnêmio de camundongos submetidos a lesão por veneno de *Bothrops jararacussu* e observaram uma redução de 83,5% de mionecrose após 24 horas

SOUZA *et al.*, 2011 observaram que o laser com comprimento de onda 660 nm, (20 mW, 5 J/cm<sup>2</sup>) apresentam efeitos bioestimulantes nas fases de regeneração e fibroses durante o reparo do músculo esquelético, promovendo a angiogênese, reduzindo mionecrose e induzindo a síntese de colágeno tipos I e III no músculo TA de ratos após criolesão. Já BAPTISTA *et al.*, 2011 analisando a quantidade e distribuição das fibras colágeno IV no músculo TA de ratos, observaram que o laser (660 nm, 20 mW, 5 J/cm<sup>2</sup>) promoveu um aumento das fibras de colágeno do tipo IV sete dias após a indução da criolesão, mas não alterou a duração do processo de reparação, a completa regeneração muscular foi observada após 21 dias.

## 1.5 Justificativa

Apesar do processo de regeneração muscular ter sido amplamente estudado nas últimas décadas, existem muitas questões a serem investigadas, especialmente aquelas relacionadas aos possíveis recursos e agentes terapêuticos capazes de proporcionar um processo de reparo muscular de melhor qualidade e menor

duração. Nesse contexto, o TLBP tem alcançado destaque, porém há necessidade de evidências científicas que determinem com segurança os parâmetros dosimétricos e protocolos a serem utilizados nas diferentes fases deste processo.

Este estudo contribuirá para o melhor entendimento dos mecanismos de ação do laser  $\lambda$  780nm sobre o músculo esquelético em processo de reparo em especial sobre os aspectos morfológicos do tecido muscular, o remodelamento de colágeno e a atividade da metaloproteinase de matriz 2 (MMP-2). Além disso, este trabalho possibilitará ampliar os conhecimentos com relação à utilização da TLBP para o tratamento de clínico de lesões musculares.



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Geral:**

Este projeto tem como objetivo geral analisar os efeitos do laser de baixa potência ( $\lambda$  780nm) no músculo tibial anterior de ratos durante o processo de reparo após criolesão.

### **2.2 Específicos:**

Foram avaliados os efeitos da irradiação laser de baixa potência ( $\lambda$  780nm) no músculo tibial anterior de ratos em processo de reparo após criolesão quanto a:

- ✓ Avaliação qualitativa e quantitativa dos aspectos morfológicos relacionados ao processo inflamatório e reparo por coloração de Hematoxilina e Eosina (H&E).
- ✓ Avaliação qualitativa e quantitativa das fibras colágenas por coloração de picrosirius sob luz polarizada.
- ✓ Avaliação da atividade gelatinolítica da MMP-2 por zimografia.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia utilizada no presente estudo foi conduzida segundo as normas internacionais de ética na experimentação animal (*NATIONAL RESEARCH COUNCIL*, 1996), e foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animais da Universidade Nove de Julho (UNINOVE) (protocolo de aprovação AN0012/2012) e realizada no laboratório de pesquisa do Programa de Mestrado e Doutorado em Ciências da Reabilitação da UNINOVE.

#### 3.1 Animais:

Para a realização deste estudo foram utilizados 100 animais ratos (*Rattus norvegicus*: var. *albinus*, *Rodentia*, *Mammalia*) machos, da linhagem Wistar, com dois meses de idade e massa corporal  $200 \pm 15$  gramas, mantidos no biotério da UNINOVE. Os animais foram mantidos em caixas plásticas apropriadas, temperatura ambiente ( $22^{\circ}\text{C}$ ), umidade relativa (40%), luminosidade controlada com ciclo de 12h (claro/escuro) e com comida e água *ad libitum*.

#### 3.2 Delineamento experimental:

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 05 grupos experimentais:

**-Grupo Controle:** Os animais não foram submetidos a nenhum procedimento, havendo remoção bilateral do músculo tibial anterior (TA) (n=05);

**-Grupo Sham:** Os animais foram apenas submetidos ao procedimento de exposição do músculo TA, havendo remoção bilateral do músculo TA (n=05);

**Grupo irradiado com LBP:** Os animais receberam apenas a irradiação laser (n=30);

**Grupo Criolesão sem tratamento (L):** Os animais foram apenas criolesionados (n=30);

**Grupo Criolesão tratado com LBP:** Os animais foram criolesionados e tratados com laser (n=30);

Os animais dos grupos irradiado com LBP, criolesão sem tratamento e criolesão tratado com LBP foram eutanasiados após 1, 3 e 7 dias sendo n=10 para cada período avaliado (n=5 para análises de atividade e caracterização de MMP-2; n=5 para análises morfológicas do tecido muscular e do remodelamento do

colágeno). Os animais do grupo **irradiado com LBP** receberam a aplicação diretamente sobre a área correspondente ao local dos grupos criolesionados.

### 3.3 Procedimento de Criolesão:

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados de acordo com o descrito por MIYABARA *et al.*, 2005 e MESQUITA-FERRARI *et al.*, 2011. Os animais foram pesados e em seguida anestesiados proporcionalmente à massa corporal com administração intraperitoneal de 1 mL/kg de 1% ketamina HCL (Dopalen, Vetbrands, São Paulo, Brasil) e 2% xilazina (Anasedan, Vetbrands, São Paulo, Brasil). Para aplicação da anestesia foram utilizadas seringas da marca BD 100 Unidades com Agulha BD Ultra-Fine®, modelo insulina com a agulha Ultra-Fine® (regular), comprimento: 12,7 mm, calibre: 0,33 mm e bisel trifacetado. Posteriormente à indução anestésica, os animais foram posicionados em uma superfície plana e realizado a tricotomia da região correspondente ao músculo TA (Fig. 1).

O músculo TA esquerdo (TAE) foi exposto cirurgicamente e submetido ao procedimento de criolesão, que consistiu na aplicação de um bastão metálico de extremidade plana (3 mm de diâmetro) que foi previamente resfriado em nitrogênio líquido, diretamente na superfície do músculo TA exposto e mantido nessa posição por 10 segundos (Fig.1). Após o descongelamento da área, o procedimento foi repetido na mesma área por mais 10 segundos. Após esse procedimento foi realizada a sutura utilizando-se fio de poliamida (5,0) (Fig. 1) e os animais foram mantidos em caixas plásticas com temperatura ambiente de (37°C) até ficarem conscientes para prevenir a hipotermia.

O modelo de lesão muscular por meio de criolesão foi o escolhido para este estudo devido ao fato deste, ser um modelo no qual se consegue executar uma lesão na superfície ventral do músculo, com características semelhantes, de forma limpa, causando menor variabilidade na severidade da lesão (OLIVEIRA *et al.*, 2007; BAPTISTA *et al.*, 2011).



**Figura 1:** Demonstração do procedimento de criolesão.

### 3.4 Procedimento de irradiação laser:

O dispositivo laser utilizado foi o Twin Laser® (MM Optics, São Carlos – SP, Brasil) (Fig. 2) e os parâmetros utilizados estão descritos na tabela 1.

**Tabela 1.** Parâmetros dosimétricos utilizados para a TLBP.

<b><i>Meio ativo</i></b>	<b><i>AsGaAl</i></b>
<i>Comprimento de onda:</i>	<b><i>780 nm</i></b>
<i>Frequência do laser:</i>	<b><i>Contínuo</i></b>
<i>Potência de saída:</i>	<b><i>40 mW</i></b>
<i>Densidade de Potência:</i>	<b><i>1 W/cm<sup>2</sup></i></b>
<i>Área do feixe:</i>	<b><i>0.04 cm<sup>2</sup></i></b>
<i>Densidade de energia:</i>	<b><i>10 J/cm<sup>2</sup></i></b>
<i>Energia por ponto:</i>	<b><i>0.4 J</i></b>
<i>Energia por tratamento:</i>	<b><i>3.2 J</i></b>
<i>Tempo de irradiação por ponto:</i>	<b><i>10 s</i></b>
<i>Tempo de irradiação por tratamento:</i>	<b><i>80 s</i></b>
<i>Pontos irradiados:</i>	<b><i>8</i></b>

Para a irradiação laser, os animais foram contidos manualmente e foi utilizado a técnica pontual diretamente sobre a pele que recobre o músculo TAE, na região da incisão e ao redor da área da lesão, abrangendo aproximadamente 8 pontos. Para

evitar refração do feixe do laser foi utilizado para aplicação o ângulo de 90°C entre o emissor e a pele do animal (Fig. 2).

O tratamento foi iniciado 2h após o procedimento de criolesão sendo 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 “LaserCheck power meter” (MM Optics, São Carlos – SP, Brasil).



**Figura 2:** Imagem demonstrativa do equipamento laser e procedimento de irradiação.

### 3.5 Eutanásia dos animais e remoção dos músculos

Após o período experimental de cada grupo, os animais foram eutanasiados utilizando a câmara de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Em seguida, os animais foram pesados e os músculos TA foram retirados e pesados. Para análise de zimografia as amostras foram imediatamente armazenadas em freezer a -80°C. Para a análise morfológica as amostras foram armazenadas em formol tamponado 10 % em PBS 1X (pH 7,4).

### 3.6 Análise morfológica qualitativa

Para o processamento histológico os músculos foram fixados durante 24 horas em formol tamponado a 10% (pH 8,0). Em seguida os músculos foram hemisseccionados na região central da área lesionada. Os tecidos então foram desidratados em soluções com concentração crescente de álcool etílico (70%, 80%, 90%) num período de 90 minutos cada, passados três vezes em álcool absoluto e três vezes em Xilol (Reagen). A impregnação e inclusão em parafina (paraplast, Sigma, USA) foram efetuadas em duas incubações durante 1 hora a 60°C. Os

músculos foram clivados e incluídos transversalmente com as porções centrais do fragmento posicionadas mais externamente no bloco. Foram feitos em média 03 cortes de 10 µm de espessura no micrótomo (Leica RM2125, Nussloch, Alemanha). Os cortes foram colocados em lâminas de microscopia desengorduradas e previamente filmadas com solução de glicerol-albumina (0,5%), mantidos em estufa a 37°C durante 12 horas e submetidos às colorações histológicas de hematoxilina e eosina (H&E).

Os cortes histológicos foram avaliados por microscopia de luz (microscópio Axioplan 2 Zeiss, Alemanha). A análise qualitativa dos cortes histológicos corados com H&E incluiu uma descrição das fases da reparação de tecidos, envolvendo a presença e tipo de infiltrado inflamatório, edema, necrose e fibras musculares imaturas e vasos sanguíneos.

### **3.7 Análise morfológica quantitativa**

Para análise quantitativa, cinco áreas (aumento de 400X), sendo (margem esquerda, meio e margem direita) correspondentes a 50% da área total da lesão foram fotografadas com auxílio de microscópio de luz convencional (Zeiss Axioplan 2, Alemanha). As imagens foram analisadas por um patologista experiente sem o conhecimento prévio dos grupos experimentais, usando o plugin Count Cells do software Image J (National Institute of Health - NIH, EUA). Foram contabilizadas as células inflamatórias totais, a mionecrose, os vasos sanguíneos e as fibras musculares imaturas (novas), por área. Pelo menos três lâminas de cada animal foram examinadas e os dados foram submetidos à análise estatística.

### **3.8 Análise qualitativa e quantitativa das fibras colágenas**

Cortes adicionais foram corados com Picrosirius Red (Sigma, St. Louis, MO, EUA), seguindo o método descrito por (JUNQUEIRA *et al.*, 1982) e foram examinados com auxílio de microscópio de luz polarizada Pol-Interferencial Photomicroscope (Modelo 61282, Carl Zeiss, Alemanha). As imagens também foram analisadas pelo programa Image J (National Institute of Health - NIH, EUA), no qual a área relativa ocupada pelas fibras colágenas foi calculada em relação à área total do corte, conforme descrito por (HADI *et al.*, 2011).

### 3.9 Análise da atividade gelatinolítica da MMP-2 por zimografia

O extrato tecidual do músculo TA foi testado quanto à presença de atividade proteolítica, conforme descrito por CLEUTJENS *et al.*, 1995. As amostras musculares de aproximadamente 50 mg foram lavadas duas vezes em solução salina e então foram homogeneizadas em 2ml de tampão de extração (10 mM de ácido cacodílico, pH 5,0, 150 mM de NaCl, 1  $\mu$ M de  $ZnCl_2$ , 20 mM de  $CaCl_2$ , 1.5 mM de  $NaN_3$ , e 0.01% de Triton X-100) com contínua homogeneização no gelo por um período de aproximadamente 05 minutos. O conteúdo proteico total foi estimado usando o reagente Bradford (BioRad Laboratories, Hercules, CA, EUA) de acordo com o método descrito por BRADFORD, 1976.

Para o ensaio enzimático 100  $\mu$ g de proteínas foram resolvidas por eletroforese em gel de poliacrilamida (10%) com 1 mg/mL de gelatina bovina (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA). Após a eletroforese, o gel foi lavado 2 vezes durante 30 minutos em solução 2,5 % de Triton X-100 para remoção do SDS e foi incubado no tampão de substrato (50 mM de Tris-HCl, pH 8,0, 5 mM de  $CaCl_2$ , 10 mM de  $ZnCl_2$  e 0,02 % de  $NaN_3$ ), a 37°C, durante aproximadamente 20 horas. Após este tempo, o gel foi corado com Coomassie Blue por 30 minutos, descorado com ácido acético: metanol: água (1: 4: 5) para visualização das bandas de atividade. Para documentação, o gel foi escaneado e analisado. Foi utilizado o software Image J (NIH) para a quantificação das bandas de atividade proteolítica do gel por densitometria (quantidade em pixels). Em seguida esses valores foram convertidos em unidades arbitrárias a partir do valor obtido no grupo controle.

#### 3.9.1 Identificação da MMP-2 por Western Blotting (WB):

Para isso, 100  $\mu$ g de proteínas de cada extrato muscular foram misturados em tampão de amostra redutor 4X concentrado (2% de SDS, 125 mM de Tris-HCl pH 8,0, 10% de glicerol, 0,001% de azul de bromofenol, 2% de  $\beta$ -mercaptoetanol), aquecidas a 95°C por 10 minutos e separadas por eletroforese em géis de poliacrilamida-SDS a 10%. Em seguida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Invitrogen) em tampão contendo 1,2 mM de Tris-HCl pH 8,0, 9,6 mM de glicina e 20% de metanol por um período aproximadamente de 120 minutos. Logo após, todas as membranas foram coradas com Ponceau S (Sigma-

Aldrich, St Louis, EUA) para confirmar a eficácia da transferência. Em seguida foi realizado o bloqueio com 5% de leite desnatado, e a incubação por 16 horas (overnight) a 4°C com o anticorpo primário anti-MMP-2 (Santa Cruz, California, USA; sc-13595), diluído 1:1000 em TBST 1X (50 mM Tris.HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20). Após a incubação, a membrana foi lavada e incubada com anticorpo secundário anti-IgG rato conjugado com fosfatase alcalina (Santa Cruz, Califórnia, EUA), diluído 1:5000 em TBST 1X. Por fim, foi realizada a detecção utilizando os substratos BCIP e NBT (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) e a membrana foi fotografada para documentação.

### **3.9.2 Análise Estatística**

Os dados foram analisados através do software Bioestat 5.0 (PA, Brasil). A distribuição da normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Os dados com distribuição paramétrica foram submetidos ao teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey para comparação entre os grupos. Os níveis de confiança foram ajustados para 95% ( $p < 0.05$ ).



## 4. RESULTADOS

### 4.1- Artigo 1: Submetido para a revista *Lasers in Medical Science*.

***Laser de baixa potência modula o processo de fibrose no músculo tibial anterior de ratos em processo de reparo.***

Alves AN<sup>1</sup>, Fernandes KPS<sup>2</sup>, Melo CAV<sup>3</sup>, Yamaguchi RY<sup>3</sup>, França CM<sup>4</sup>, Teixeira DF<sup>4</sup>, Bussadori SK<sup>6</sup>, Nunes FD<sup>5</sup>, Mesquita-Ferrari RA<sup>2</sup>

1 Mestrando em Ciências da Reabilitação, Universidade Nove de Julho – UNINOVE, São Paulo – SP, Brasil

2 Professor titular, Ciências da Reabilitação e Biofotônica, Universidade Nove de Julho – UNINOVE, São Paulo – SP, Brasil

3 Alunos de graduação, Universidade Nove de Julho – UNINOVE, São Paulo – SP, Brasil

4 Professor titular, Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde, Universidade Nove de Julho – UNINOVE, São Paulo – SP, Brasil

5 Professor titular, Departamento de Patologia Bucal, Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, Brasil

6 Professor titular, Ciências da Reabilitação e Biofotônica, Universidade Nove de Julho – UNINOVE, São Paulo – SP, Brasil

#### **Autor para correspondência:**

Raquel Agnelli Mesquita-Ferrari

Departamento de Pós Graduação, Mestrado em Ciências da Reabilitação;

Universidade Nove de Julho – UNINOVE

Rua Vergueiro, 349, o, 612, Água Branca, CEP 05001-100

São Paulo – SP, Brasil

Telefone/fax: 55-11-3665-9325.

**Título para as páginas:** Terapia laser de baixa potência e reparo muscular.

## Resumo

As lesões musculares representam um dos principais quadros clínicos encontrados nos centros de reabilitação. A terapia laser de baixa potência (TLBP) tem apresentado bons resultados no que diz respeito a modulação do processo inflamatório de tecido muscular em processo de reparo e prevenção de fibrose. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da TLBP sobre os aspectos morfológicos do tecido muscular, remodelamento de colágeno e a atividade da metaloproteinase de matriz 2 (MMP-2) em músculo esquelético de ratos após lesão aguda. Foram utilizados ratos Wistar, divididos em 05 grupos: (1) Controle; (2) Sham; (3) TLBP; (4) Criolesão e (5) Criolesão e TLBP. A criolesão consistiu de duas aplicações de bastão resfriado em nitrogênio líquido no músculo tibial anterior (TA). Para o tratamento diário foi utilizado o laser Arseneto de Gálio Alumínio (780nm, potência de 40 mW, área do feixe de 0.04 cm<sup>2</sup> e energia total de 3.2J). Os períodos de análise foram 1, 3 e 7 dias. Os aspectos morfológicos foram avaliados por coloração de H&E, a quantidade e distribuição das fibras colágenas pela coloração de picrosirius sob luz polarizada e atividade e identificação da MMP-2 pelas técnicas de zimografica e western blotting respectivamente. Os resultados demonstraram que a TLBP reduziu o número de células inflamatórias totais e da mionecrose após 1 dia, promoveu aumento no número de vasos sanguíneos após 3 e 7 dias além de aumentar o número de fibras musculares novas e imaturas, promoveu melhora na organização e distribuição de colágeno e aumentou a atividade da MMP-2 após 7 dias. Em conclusão a TLBP promoveu efeitos positivos sobre o reparo do músculo esquelético modulando o processo inflamatório, a atividade da MMP2 e o remodelamento das fibras colágenas neste tecido.

**Palavras-chave:** laser, músculo esquelético, lesão, metaloproteinase de matriz 2, colágeno.

## Introdução

As lesões musculares representam um dos principais quadros clínicos encontrados nos centros de reabilitação, e podem ocorrer por causas diretas (por exemplo, contusões e lacerações) ou causas indiretas, tais como isquemias e disfunções neurológicas [1-3]. A rápida e eficiente regeneração muscular bem como a prevenção da formação de tecido fibrótico de forma excessiva são os principais objetivos do processo de reabilitação [4].

Após a lesão muscular, inicia-se o processo de reparação que consiste em várias fases interdependentes: degeneração e inflamação, regeneração, fibrose / formação de cicatriz, e remodelação [5]. A fase inicial deste processo é caracterizada pela migração de células inflamatórias, necrose das fibras lesionadas e fagocitose dos detritos celulares levando à ativação de células precursoras miogênicas (células tronco) conhecidas como células satélites [6, 7]. Após a ativação, estas células proliferam, se diferenciam em mioblastos que posteriormente se fundem às fibras lesionadas ou formam uma nova fibra muscular funcional [2, 3, 6, 8].

Ao longo destas fases, ocorre ativação de diferentes tipos celulares, juntamente com a síntese e degradação de proteínas intracelulares e componentes de matriz extracelular (MEC) [4, 9-11]. No tecido muscular normal, a MEC é composta principalmente de colágenos dos tipos I, III, IV, além de laminina, fibronectina, tenascina e proteoglicanos, que circundam as fibras musculares e desempenha um papel importante na manutenção da estrutura e reforço da função contrátil do músculo [9, 11, 12].

Um quadro de fibrose associado à limitação funcional pode desenvolver-se como consequência da deposição excessiva de MEC, colocando-se como barreira mecânica à migração e fusão celular, e limitando a perfusão vascular no local da lesão impedindo a regeneração normal após lesão do tecido [9, 13, 14].

O remodelamento da MEC é realizado principalmente por uma família de metaloproteinases de matriz (MMP) que são dependentes de zinco e cálcio, capazes de degradar uma ou várias proteínas da MEC [13, 15]. A MMP-2 desempenha um papel importante durante a formação de novas fibras, promovendo a degradação do colágeno IV da membrana basal e outros componentes da MEC [13]. A degradação destes componentes da membrana basal após lesão é importante para facilitar a

migração, proliferação, fusão de mioblastos e a formação de novos vasos sanguíneos [10, 13, 16, 17]. O desenvolvimento de novos vasos sanguíneos (angiogênese) desempenha um papel importante para o sucesso da regeneração muscular [18].

O laser de baixa potência (LBP) tem demonstrado efeitos positivos na modulação da resposta inflamatória, especialmente no que diz respeito à regeneração muscular após diferentes tipos de lesão [19-21], reparação do tecido muscular e na prevenção da fibrose muscular [22-26]. No entanto, os mecanismos responsáveis por estes achados estão ainda sob investigação. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos do LBP no reparo do músculo esquelético de ratos após lesão sobre os aspectos morfológicos incluindo a quantificação do infiltrado inflamatório, da mionecrose, dos vasos sanguíneos e das fibras musculares imaturas além da quantificação de colágeno e a atividade gelatinolítica da MMP-2.

## **Materiais e métodos**

Os experimentos foram realizados em conformidade com as diretrizes do Conselho Nacional para o Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Nove de Julho (UNINOVE) (aprovação AN012/2012).

Foram utilizados ratos Wistar machos, com doze semanas de idade e massa corporal de  $200 \pm 9.11$  g, mantidos no biotério da UNINOVE em caixas plásticas apropriadas, temperatura ambiente de 22°C, umidade relativa de 40%, luminosidade controlada com ciclo de 12h (claro/escuro) e comida e água *ad libitum*.

Durante o período experimental os animais foram divididos em 05 grupos experimentais: (1) Grupo controle (n=10); (2) Grupo sham, isto é, apenas submetidos ao procedimento de exposição do músculo tibial anterior (TA) (n=10); (3) Grupo irradiado (n=30); (4) Grupo lesionado sem tratamento (n=30) e (5) Grupo lesionado e tratado com LBP (n=30). O grupo controle foi eutanasiado no primeiro dia após o início do experimento. Os grupos 3, 4 e 5 foram analisados nos períodos de 1, 3 e 7 dias após a indução da lesão.

## **Procedimento de Criolesão**

Os procedimentos cirúrgicos foram previamente descritos [22, 23, 27]. Sucintamente, os animais foram anestesiados com administração intraperitoneal de

1 mL/kg de 1% ketamina e 2% xilazina. O músculo TA direito foi exposto cirurgicamente e submetido ao procedimento de criolesão, que consistiu na aplicação de um bastão metálico de extremidade plana (3 mm de diâmetro) que foi previamente resfriado em nitrogênio líquido, diretamente na superfície do músculo TA exposto e mantido nessa posição por 10 segundos. Após o descongelamento da área, o procedimento foi repetido na mesma área por mais 10 segundos. Após esse procedimento foi realizada a sutura utilizando-se fio de poliamida (5,0) e os animais foram mantidos em caixas plásticas com temperatura ambiente de 37°C até ficarem conscientes para prevenir a hipotermia.

### **Terapia laser de baixa potência**

O dispositivo laser utilizado foi o Twin Laser® (MM Optics, São Carlos – SP, Brasil) com meio ativo de Arseneto de Gálio e Alumínio (AsGaAl) com os seguintes parâmetros: Comprimento de onda 780 nm, potência de saída 40 mW, densidade de potência 1 W/cm<sup>2</sup>, área do feixe 0.04 cm<sup>2</sup>, densidade de energia 10 J/cm<sup>2</sup> e tempo de irradiação por ponto 10s.

O feixe de laser foi coberto por um filme protetor transparente e foi aplicado em contato com a superfície da pele na região da incisão e ao redor da área da criolesionada. Para evitar refração do feixe do laser foi utilizado para aplicação o ângulo de 90°C entre o emissor e a pele do animal. A irradiação foi aplicada em oito pontos equidistantes dentro da área. A energia por ponto foi de 0.4 J, totalizando 3.2 J por tratamento. Um medidor de potência Laser Check (MM Optics, São Carlos, Brasil)) foi utilizado para determinar a potência do equipamento. Os experimentos foram realizados com os procedimentos padronizados com base em estudos anteriores realizados por nosso grupo de pesquisa [22, 23]. A irradiação laser foi iniciada 2 h após a indução da lesão e realizado diariamente, com um intervalo de 24 horas entre cada sessão, dando um total de uma, duas e seis sessões para os músculos avaliados após um, três e sete dias, respectivamente.

Após o período experimental de cada grupo, os animais foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, os animais foram pesados e os músculos TA foram retirados e pesados. A relação entre o peso muscular e peso corporal foi calculado. Em seguida esses músculos foram armazenados em formol tamponado 10% para análise histológica e as amostras destinadas para análise da atividade gelatinolítica foram armazenadas em freezer – 80 °C.

### **Análise morfológica**

Amostras dos músculos foram coletadas, fixadas em formol tamponado 10%, incluídas em parafina e espécimes foram cortados transversalmente com 10 µm de espessura por meio de um micrótomo (Leica RM2125, Nussloch, Alemanha). Foi utilizada a coloração com hematoxilina-eosina (HE) para exame histológico de rotina realizada sob microscopia de luz convencional (Zeiss Axioplan 2, Alemanha) por dois examinadores calibrados. A análise qualitativa dos cortes histológicos corados com HE incluiu uma descrição das fases da reparação de tecidos, envolvendo a presença e tipo de infiltrado inflamatório, edema, necrose e fibras musculares imaturas e vasos sanguíneos.

Para análise quantitativa, cinco áreas correspondentes a região da lesão foram fotografadas com auxílio de microscópio de luz convencional (Zeiss Axioplan 2, Alemanha). As imagens foram analisadas por um patologista experiente sem o conhecimento prévio dos grupos experimentais, usando o plugin Count Cells do software Image J (National Institute of Health - NIH, EUA). Foram contabilizadas as células inflamatórias totais, a mionecrose, os vasos sanguíneos e as fibras musculares imaturas (novas), por área. Pelo menos três lâminas de cada animal foram examinadas e os dados foram submetidos à análise estatística.

### **Análise de colágeno**

Cortes adicionais foram corados com Picrosirius Red (Sigma, St. Louis, MO, EUA), seguindo o método descrito por Junqueira *et al.* [28] e foram examinados com auxílio de microscópio de luz polarizada Pol-Interferencial Photomicroscope (Modelo 61282, Carl Zeiss, Alemanha). As imagens também foram analisadas pelo programa Image J (NIH, EUA), no qual a área relativa ocupada pelo colágeno foi calculada em relação à área total do corte, conforme descrito por Hadi *et al.* [27].

### **Zimografia**

O extrato tecidual do músculo TA foi testado quanto à presença de atividade gelatinolítica, conforme descrito por Cleutjens [30]. As amostras musculares de aproximadamente 50 mg foram lavadas duas vezes em solução salina e então foram

homogeneizadas em 2ml de tampão de extração (10 mM de ácido cacodílico, pH 5,0, 150 mM de NaCl, 1  $\mu$ M de  $ZnCl_2$ , 20 mM de  $CaCl_2$ , 1.5 mM de  $NaN_3$ , e 0.01% de Triton X-100) com contínua homogeneização no gelo por um período de 10 minutos. O conteúdo protéico total foi estimado usando o reagente Bradford (BioRad Laboratories, Hercules, CA, EUA) de acordo com o método descrito por Bradford [31].

Para o ensaio enzimático 100  $\mu$ g de proteínas foram resolvidas por eletroforese em gel de poliacrilamida (10%) com 1 mg/ml de gelatina. Após a corrida, o gel foi lavado duas vezes durante 30 minutos em solução 2,5 % de Triton X-100 para remoção do SDS e foi incubado no tampão do substrato (50 mM de Tris-HCl, pH 8,0, 5 mM de  $CaCl_2$ , 10 mM de  $ZnCl_2$  e 0,02 % de  $NaN_3$ ), a 37°C, durante aproximadamente 20 horas. Após este tempo, o gel foi corado com Coomassie Blue por 60 minutos, descorado com ácido acético: metanol: água (1: 4: 5) para visualização das bandas de atividade. Para documentação, três géis foram escaneados e analisados. Foi utilizado o programa “Image J” (NIH, EUA) para a quantificação das bandas de atividade proteolítica dos géis por densitometria (quantidade em pixels). Em seguida esses valores foram convertidos em unidades arbitrárias a partir do valor obtido no grupo controle.

## **Western Blotting**

O extrato muscular também foi utilizado para identificação da MMP-2 por Western Blotting. Para isso, 100  $\mu$ g de proteínas foram inicialmente resolvidas por SDS-PAGE (10%) e transferidas para uma membrana de nitrocelulose. Em seguida foi realizado o bloqueio com 2,5% de leite desnatado, e incubação com o anticorpo primário anti-MMP-2 (Santa Cruz, Califórnia, EUA; sc-13595) por 3h em temperatura ambiente. A membrana foi lavada e incubada com anticorpo secundário anti- IgG rato conjugado com fosfatase alcalina (Santa Cruz, Califórnia, EUA; sc-2047). Por fim, foi realizada a detecção utilizando os substratos BCIP e NBT (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA; B5655) e a membrana foi fotografada para documentação.

## Análise estatística

Os dados foram analisados através do software Bioestat 5.0 (PA, Brasil). A distribuição da normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Os dados com distribuição paramétrica foram submetidos ao teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey para comparação entre os grupos. Os níveis de confiança foram ajustados para 95% ( $p < 0.05$ ).

## Resultados

### Peso corporal, peso do músculo TA e relação entre o peso muscular e corporal

Os resultados permitiram verificar que não houve diferença significativa ( $p \geq 0,05$ ) do peso corporal (PC) em todos os grupos experimentais avaliados (tabela 1). Em relação ao peso do músculo TA (PM) os resultados demonstraram um aumento significativo nos grupos criolesionados com e sem tratamento laser ( $p < 0,01$ ) após um dia da lesão comparados aos grupos controle, sham e aos demais grupos em todos os períodos avaliados (tabela 1). Os resultados da relação entre o peso muscular e o corporal (PM/PC) demonstraram um aumento significativo nos grupos criolesionados sem e com tratamento laser ( $p < 0,01$ ) após um dia da lesão em relação aos demais grupos (tabela 1).

**Tabela 1.** Peso corporal, peso muscular e relação entre o peso muscular e corporal.

	1 DIA					3 DIAS			7 DIAS		
	Controle	Sham	LBP	Lesão	Lesão + LBP	LBP	Lesão	Lesão + LBP	LBP	Lesão	Lesão + LBP
PC (g)	200±4,6	199±6,7	201±5,3	196±6,4	197±7,7	201±4,3	200±3,6	203±8,5	202±4,7	200±4,1	200±7,3
PM (mg)	456±5,6	459±7	461±4,8	524±5,3*	526±7,5*	455±8,8	452±5,6	451±3,8	462±4,7	458±6,4	457±8,9
PM/PC (mg/g)	2,29±0,2	2,31±0,1	2,3±0,1	2,68±0,2*	2,68±0,1*	2,27±0,1	2,26±0,1	2,22±0,2	2,29±0,1	2,29±0,1	2,29±0,2

Os dados estão expressos como média e desvio padrão (ANOVA/Tukey). \*  $p \leq 0,01$  comparados aos grupos controle e sham e aos demais grupos avaliados. Peso corporal (PC); Peso muscular (PM); relação entre o peso muscular e corporal (PM/PC).

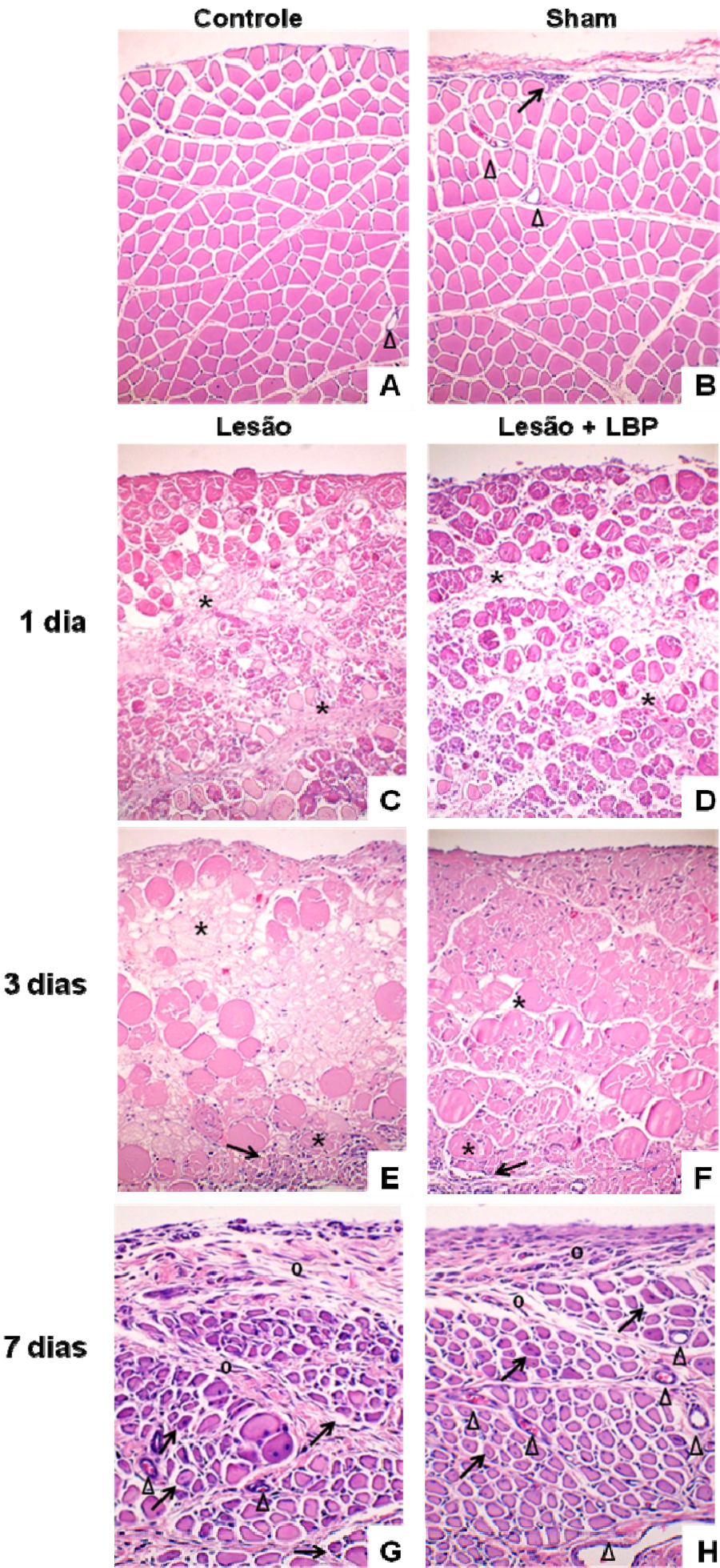


## **Análise morfológica qualitativa**

Na análise morfológica verificou-se que os músculos do grupo controle apresentaram aspecto histológico normal com presença de fibras com núcleos periféricos, sem sinais de lesão ou processo inflamatório (Fig. 1A). Esses resultados foram semelhantes aos observados no grupo LBP em todos os períodos experimentais.

O grupo sham mostrou discreto infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear na região superficial do músculo exposto cirurgicamente (Fig.1B). Os grupos lesionados sem tratamento laser após 1 e 3 dias demonstraram edema entre as fibras musculares, moderado infiltrado inflamatório com presença de neutrófilos e linfócitos dispersos por entre as fibras. Estas por sua vez, apresentavam-se em grande parte necróticas (mionecrose) (Fig. 1C e E). Nestes mesmos períodos o grupo criolesionado e submetido a laserterapia mostrou uma redução no infiltrado inflamatório associado à redução da mionecrose (Fig. 1D e F).

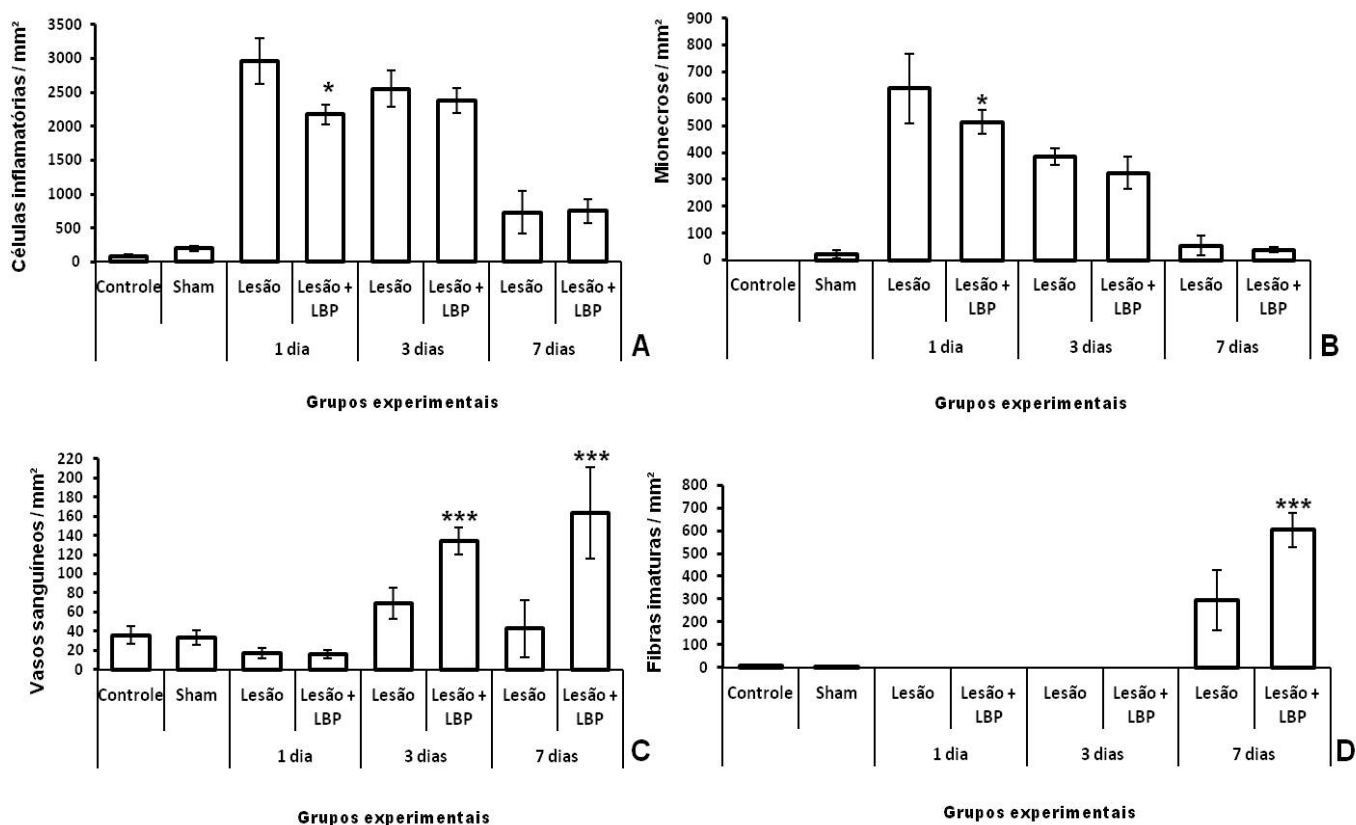
Aos 7 dias, ambos grupos criolesionados (submetidos ou não a laserterapia) mostraram redução no processo inflamatório, escassa mionecrose e surgimento de várias fibras musculares novas e imaturas (Fig, 1G e 1H), todavia, o grupo que recebeu a laserterapia apresentou fibras musculares com maior grau de maturação, observada pela posição dos núcleos e formato poligonal das células, bem como menos edema e mionecrose.



**Figura 1:** Fotomicrografias dos cortes histológicos de músculos corados por hematoxilina & eosina (aumento original, 100x). (A) Músculo controle exibindo morfologia normal. (B) Músculo sham mostrando infiltrado inflamatório discreto no perimísio (seta). (C) Criolesionado após 1 dia. (D) Criolesionado submetida à laserterapia após 1 dia, ambas mostrando edema (\*), e mionecrose. (E) Criolesionado após 3 dias com edema (\*), mionecrose e infiltrado inflamatório adjacente (seta). (F) Criolesionado submetida à laserterapia após 3 dias, com edema (\*), mionecrose e infiltração leucocitária (seta). (G) Criolesionado após 7 dias mostrando fibras colágenas (círculo), fibras imaturas (seta). (H) Criolesionado submetida à laserterapia após 7 dias. Nota-se a presença de menor quantidade de fibras colágenas (círculo); Fibras imaturas (seta);  $\Delta$  mostrando vasos sanguíneos.

### **Análise morfológica quantitativa**

A análise quantitativa permitiu verificar que o grupo criolesionado submetido a laserterapia apresentou uma redução significativa no número total de células inflamatórias e mionecrose após um dia ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao grupo criolesionado sem tratamento no mesmo período (Fig. 2A e B). Além disso, observou-se que o grupo criolesionado submetido à laserterapia demonstrou um aumento significativo no número de vasos sanguíneos após 3 e 7 dias ( $p < 0,01$ ) (Fig. 2C) associado com aumento no número de fibras musculares imaturas (novas) após 7 dias ( $p < 0,01$ ) (Fig. 2D). Já o grupo laser sem lesão apresentou aspectos semelhantes ao grupo controle nos três períodos avaliados (dados não mostrados).



**Figura 2:** Efeitos da laserterapia sobre o número total de células inflamatórias (A); número de mionecrose (B); número de vasos sanguíneos (C) e número de fibras imaturas (D). Os valores estão expressos em média e desvio padrão (ANOVA/Tukey). \* $p < 0,05$  comparado com o grupo criolesionado sem tratamento. \*\*\* $p < 0,01$  comparado com o grupo criolesionado sem tratamento.

### Análise qualitativa e quantitativa das fibras colágenas

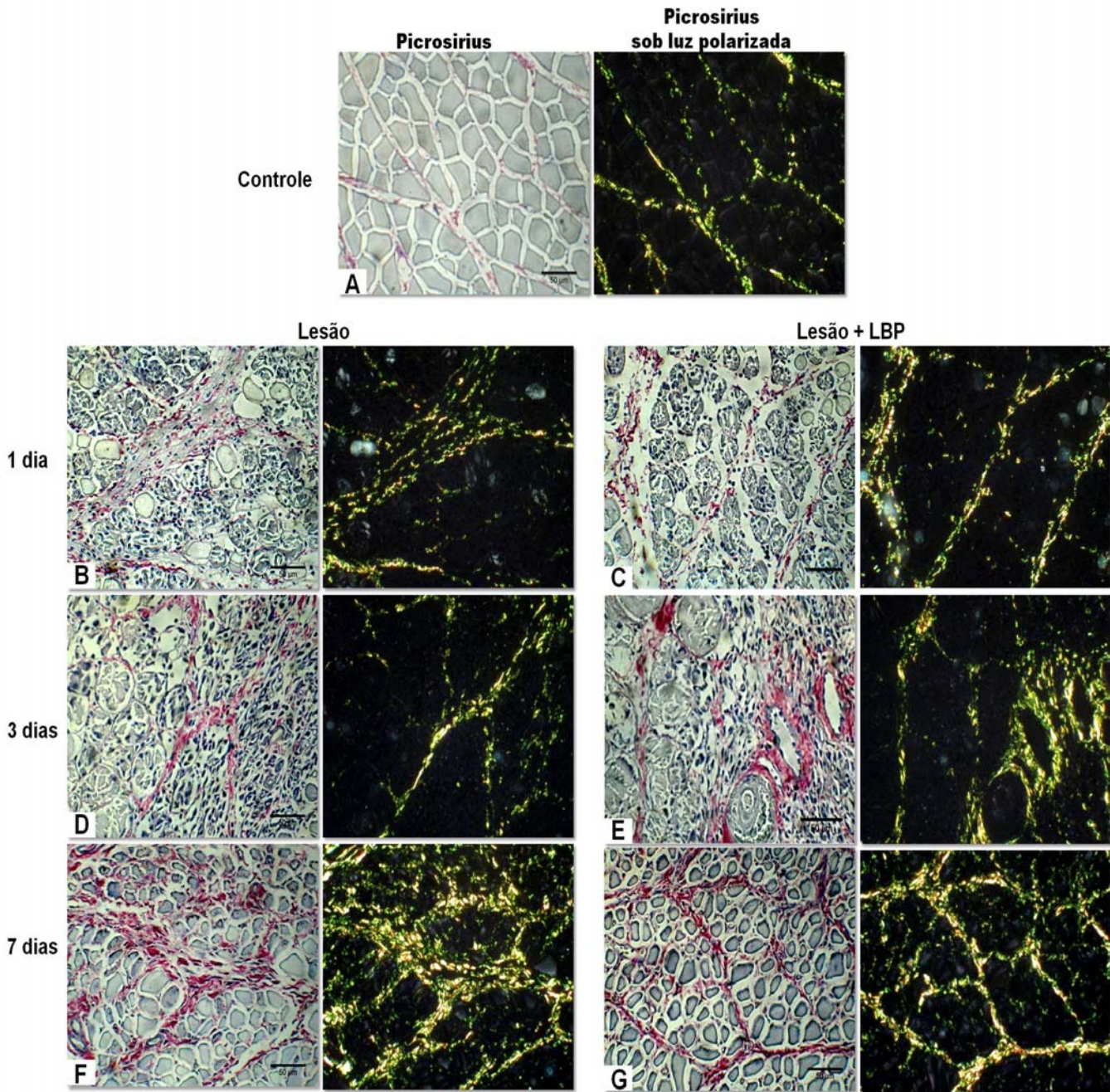
O grupo controle apresentou arquitetura tecidual normal com padrões de trama colágena organizada na região de endomísio e perimísio (Fig. 3A). Os grupos sham e laser apresentaram organização do colágeno semelhante ao grupo controle em todos os períodos avaliados (dados não mostrados). Após 1 e 3 dias, a distribuição do colágeno foi semelhante nos grupos com e sem laserterapia, com fibras dispersas no local infiltrado por células inflamatórias e no espaço celular das fibras de necrosadas (Fig. 3B, C, D e E).

Aos 7 dias, as fibras de colágeno começaram a apresentar maior organização em feixes. No grupo criolesionado foi observada distribuição difusa e desorganizada

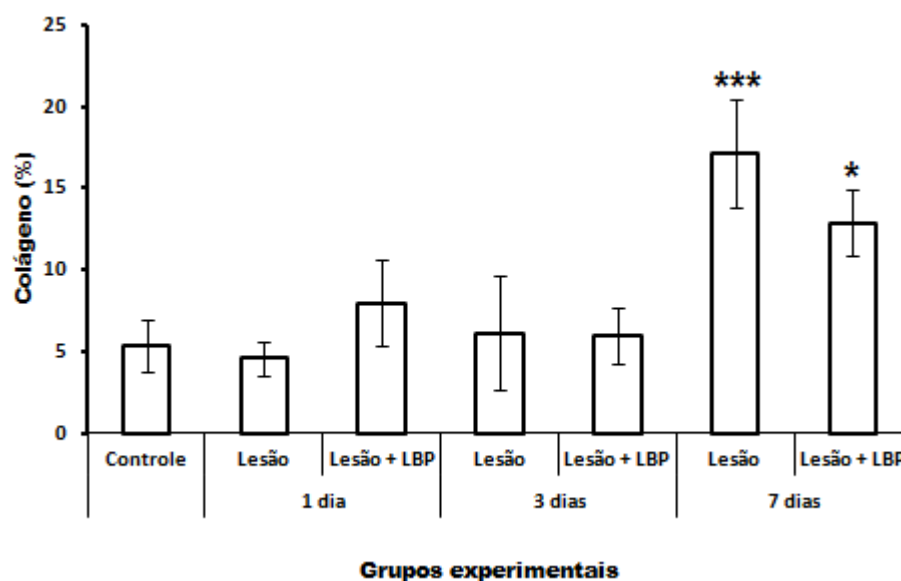
do colágeno predominantemente nas regiões de endomísio e perimísio (Fig. 3F). Já o grupo submetido à laserterapia apresentou maior organização dos feixes de colágeno dispostos de forma compacta, principalmente na região do perimísio (Fig. 3G).

A quantificação do colágeno por imagens analisadas sob luz polarizada demonstrou que não houve diferença entre os grupos avaliados após 1 e 3 dias ( $p \geq 0,05$ ). Contudo, observou-se um aumento significativo na concentração de colágeno no grupo criolesionado sem tratamento ( $p < 0,01$ ) e no grupo criolesionado submetido a laserterapia ( $p < 0,05$ ) após 7 dias em comparação com os demais grupos experimentais. No entanto, não foi observada diferença na concentração de fibras colágenas entre o grupo criolesionado submetido à laserterapia ( $12,88 \pm 2,04$  %) quando comparado ao grupo criolesionado que não recebeu tratamento ( $17,15 \pm 3,33$  %) após 7 dias ( $p \geq 0,05$ ) (Fig. 4).





**Figura 3:** Fotomicrografias dos cortes histológicos de músculos corados por picrosirius com e sem luz polarizada (aumento original, 400x). Figuras ilustrativas das imagens usadas na quantificação da porcentagem de fibras colágenas por área utilizando a microscopia de luz polarização. (A) Músculo controle exibindo morfologia normal. (B) Criolesionado após 1 dia. (C) Criolesionado submetida à laserterapia após 1 dia. (D) Criolesionado após 3 dias. (E) Criolesionado submetida à laserterapia após 3 dias. (F) Criolesionado após 7 dias. (G) Criolesionado submetida à laserterapia após 7 dias, com uma melhor organização do colágeno no endomísio em comparação ao grupo não tratado, após 7 dias.



**Figura 4:** Quantificação da área de fibras de colágenas no TA em porcentagem com relação à área total do músculo. Os valores estão expressos como média e desvio padrão (ANOVA / Tukey). Os valores estão expressos como média e desvio padrão (ANOVA/Tukey). \*\*\* $p < 0,01$  quando comparado com aos demais grupos. \*  $p < 0,05$  quando comparado aos demais grupos experimentais.

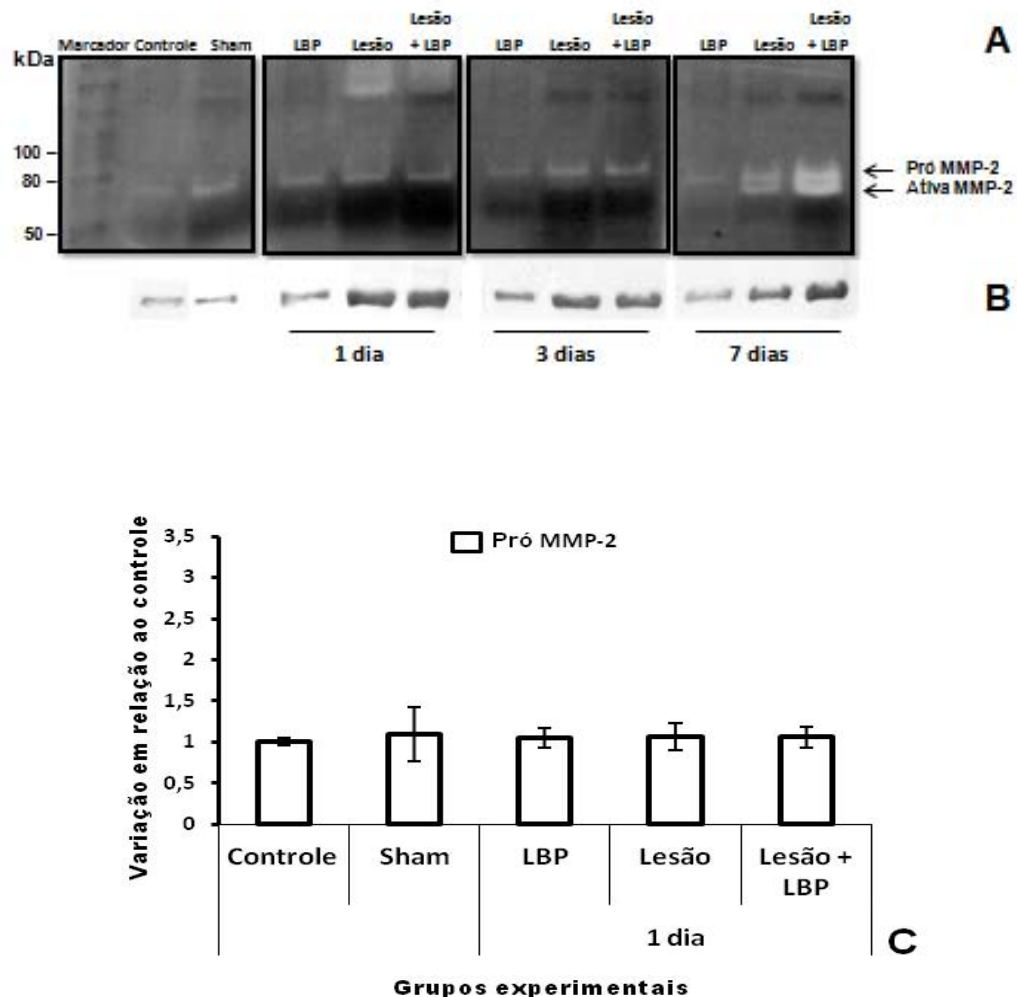
### Análise da atividade gelatinolítica da MMP-2

A atividade de MMP-2 foi detectada no extrato do músculo TA como duas bandas líticas de aproximadamente 72 kDa (Pró MMP-2) e 64 kDa (Ativa MMP-2) (Fig. 5A) e identificada pela técnica de Western Blotting (Fig.5B).

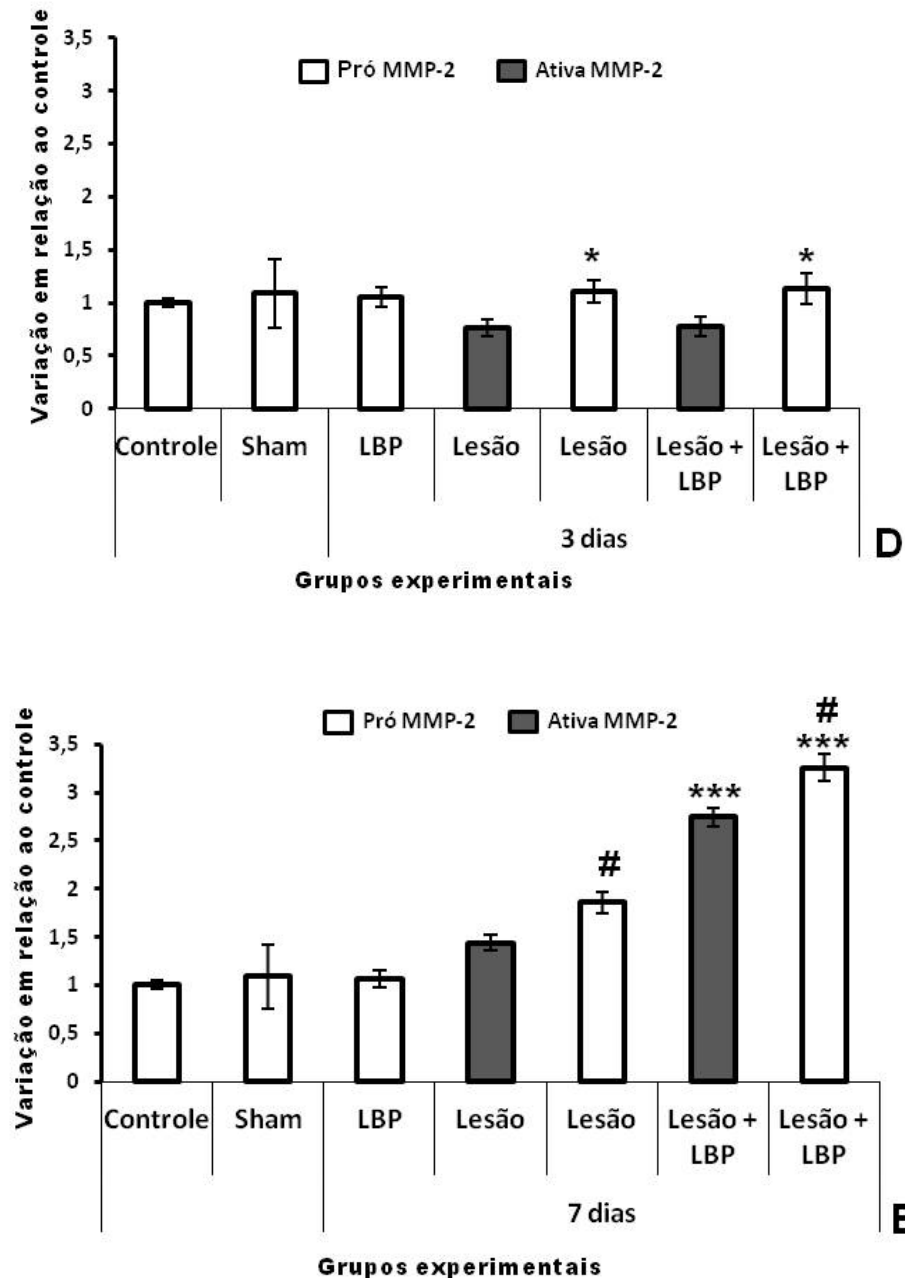
Os resultados permitiram verificar que não houve diferença significativa na atividade da MMP-2 Pró entre os grupos controle e “sham” ( $p \geq 0,05$ ). Além disso, verificou-se que após um dia apenas uma banda lítica da MMP-2 (Pró) foi detectada e não apresentou diferença significativa ( $p \geq 0,05$ ) entres os diferentes grupos do mesmo período (Fig.5C).

Interessantemente, após 3 dias observou-se a presença de duas bandas líticas da MMP-2 nos grupos criolesionados com e sem tratamento (Pró e Ativa). Houve aumento de 13% ( $p < 0,05$ ) na atividade da banda lítica Pró no grupo

criolesionado sem tratamento e 11% ( $p < 0,05$ ) no grupo criolesionado submetido à laserterapia em comparação ao grupo controle. Com relação à banda lítica ativa da MMP-2 não foi encontrada diferença significativa entre os grupos criolesionados sem e com tratamento laser ( $p \geq 0,05$ ) (Fig. 5D). Contudo, após 7 dias observou-se que a laserterapia induziu um aumento de 75% ( $p < 0,01$ ) na atividade da banda lítica Pró e 91 % ( $p < 0,01$ ) na banda lítica ativa em comparação ao grupo criolesionado que não recebeu tratamento (Fig. 5E). Observou-se também um aumento significativo na atividade da banda lítica Pró nos grupos criolesionados com e sem tratamento laser ( $p < 0,01$ ) em comparação aos grupos controle, sham e laser do mesmo período experimental (Fig. 5E).







**Figura 5:** Imagem ilustrativa da atividade gelatinolítica presente no músculo TA de ratos avaliado por zimografia. (A) Atividade da MMP-2, Pró e ativa (~72 e 64 kDa, respectivamente) foi detectada como faixas claras sobre o fundo escuro. Cada faixa corresponde a um grupo experimental, onde a mesma quantidade de proteína (100 µg) foi resolvida em um gel SDS de poliácridamida (10%) contendo gelatina. (B) Identificação da MMP-2 por Western Blotting. Os dados estão expressos como média e desvio padrão (ANOVA/Tukey). (C) Gráfico representativo das bandas líticas presentes quantificadas por densitometria presente nos grupos controle, sham e grupos avaliados após 1 dia. (D) Gráfico representativo das bandas líticas

presentes nos grupos controle, sham e grupos avaliados após 3 dias. (E) Gráfico representativo das bandas líticas presentes nos grupos controle, sham e grupos avaliados após 7 dias. \* $p < 0,05$  comparados ao grupo controle; \*\*\* $p < 0,01$  comparados ao grupo criolesionado sem tratamento; #  $p < 0,01$  comparados aos grupos controle, sham e LBP.

## Discussão

As vantagens terapêuticas da laserterapia sobre a modulação do processo inflamatório [22, 32] e sobre a regeneração do músculo esquelético foi avaliada em diversos estudos [20, 24, 26]. No entanto, os mecanismos deste efeito ainda não foram completamente identificados.

Os resultados apresentados no presente estudo, demonstraram que a laserterapia promoveu uma redução no infiltrado inflamatório e na mionecrose após 1 dia, aumento no número de vasos sanguíneos após 3 e 7 dias, associado com aumento do número de fibras musculares novas e imaturas, além do aumento da atividade gelatinolítica da MMP-2 após 7 dias. Além disso, os animais do grupo criolesionado e submetido à laserterapia mostraram uma maior organização na distribuição das fibras colágenas principalmente na região do endomísio e perimísio após 7 dias.

Esses resultados estão em concordância com os achados descritos anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa. Souza *et al.* [24] observaram que a laserterapia (660nm, 20 mW, 5 J/cm<sup>2</sup>) apresentam efeitos bioestimulantes nas fases de regeneração e fibroses durante o reparo do músculo esquelético, promovendo a angiogênese, reduzindo mionecrose e induzindo a síntese de colágeno tipos I e III no músculo TA de ratos após criolesão. Além disso, Baptista *et al.* [23] analisando a quantidade e distribuição do colágeno IV no músculo TA de ratos durante o processo de reparo após criolesão e concluíram que a laserterapia (660nm, 20 mW, 5 J/cm<sup>2</sup>) promoveu um aumento das fibras de colágeno do tipo IV sete dias após a indução da criolesão, mas não alterou a duração do processo de reparação, a completa regeneração muscular foi observada após 21 dias.

No presente estudo observamos que os animais que receberam o tratamento laser e foram analisados após 7 dias apresentaram uma melhor organização e deposição das fibras colágenas entre as fibras musculares. Essa organização das

fibras colágenas no tecido muscular pode ter ocorrido principalmente pelo aumento da atividade gelatinolítica da MMP-2 encontrado também após 7 dias sendo que esta desempenha um papel importante durante a formação de novas fibras, promovendo a degradação do colágeno IV da membrana basal e outros componentes da MEC [13].

Após uma lesão, existe uma atividade coordenada entre a degradação e síntese dos componentes da MEC especialmente do colágeno [9, 13, 17, 33]. A degradação destes componentes após lesão é importante para facilitar a migração, proliferação, fusão de mioblastos e a formação de novos vasos sanguíneos [10, 13, 16, 17]. Interessantemente, observamos na análise morfológica quantitativa um aumento de vasos sanguíneos após 3 e 7 dias e de fibras imaturas (nova), que pode estar relacionado com o aumento da atividade gelatinolítica da MMP-2. Os efeitos da laserterapia sobre a síntese de colágeno e pró-colágeno foram demonstrados na literatura [23, 24, 26, 34-37]. No entanto, ainda existem controvérsias sobre o efeito da irradiação laser no metabolismo do colágeno. Alguns autores têm demonstrado que a irradiação laser aumenta a síntese de colágeno [23, 24, 36], enquanto outros autores relatam uma diminuição na síntese de colágeno após irradiação [26, 35, 37]. Em nosso estudo observamos uma redução na quantidade de colágeno com uma melhor organização no grupo criolesionado submetido à laserterapia após 7 dias, porém este não foi estatisticamente significativo.

No músculo esquelético, o colágeno desempenha um papel fundamental na manutenção da integridade funcional das fibras e para a transmissão adequada da força durante a contração muscular. O colágeno tipo I, que é mais comumente encontrado no tecido conjuntivo denso, é necessário para a estabilização da arquitetura do tecido, enquanto o colágeno tipo III, que é mais comumente encontrado no tecido conjuntivo frouxo, tem uma função importante na elasticidade do tecido [38-40]. Assim, uma melhor organização e distribuição do colágeno interferem diretamente nos aspectos funcionais deste tecido.

Os efeitos da laserterapia sobre a expressão de fatores de crescimento que modulam a síntese e degradação da MEC, bem como sobre o processo de regeneração muscular já foi demonstrado por nosso grupo de pesquisa [22]. No estudo em questão foi utilizado o mesmo modelo experimental de lesão sendo observado que a TLBP (660nm, 20 mW, 5 J/cm<sup>2</sup>) provocou uma redução na expressão de TNF- $\alpha$  após 1 e 7 dias e de TGF- $\beta$  após 7 dias. O TGF- $\beta$  é

relacionado à formação de tecido cicatricial durante a regeneração muscular, além de regular a produção de enzimas que degradam a MEC, tais como as collagenases e gelatinases e a síntese de enzimas que inibem a degradação da MEC, tais como inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMPs) e inibidor do ativador do plasminogênio (PAI) -1 [9]. Estes dados estariam de acordo com os achados presentes, uma vez que foi encontrada uma redução na quantidade e uma melhor organização do colágeno após 7 dias, associado com um aumento na atividade de MMP-2. Em adição, Assis *et al.* [26] observaram que o laser infravermelho (808 nm, 30 mW, 180 J/cm<sup>2</sup>) promoveu uma redução na expressão de TGF- $\beta$ 1 e na quantidade de colágeno do tipo I após 4 dias da criolesão em músculo de camundongo.

No presente estudo, a fase aguda da reparação muscular também foi analisada com base nos aspectos histopatológicos dos diferentes grupos experimentais. A análise quantitativa demonstrou que a laserterapia promoveu a redução no número de células inflamatórias totais e de mionecrose após 1 dia. Esses resultados corroboram com os achados de Barbosa *et al.* [41] que utilizaram o laser vermelho (685 nm, 4,2 J/cm<sup>2</sup>) sobre o músculo gastrocnêmio de camundongos submetidos a lesão por veneno de *Bothrops jararacussu* e observaram uma redução de 83,5% de mionecrose após 24 horas bem como aos de Cressoni *et al.* [19] os quais verificaram que o laser (785 nm, energia total de 2.7J) foi capaz de reduzir o número de leucócitos polimorfonucleares e mononucleares, acelerar a regeneração dos tecidos pela estimulação da maturação de células musculares e a proliferação de fibroblastos, proporcionando assim condições para melhorar a organização e o alinhamento das fibras musculares em regeneração.

Após 3 e 7 dias também foi observado aumento no número de vasos sanguíneos nos grupos tratados com laser. A angiogênese é uma parte importante da regeneração muscular, uma vez que restabelece a circulação no local da lesão, limitando assim a necrose isquêmica facilitando a regeneração [24]. Após 7 dias, foi observado um aumento de fibras musculares novas com maior grau de maturação no grupo criolesionado e submetido à laserterapia. Contudo, em trabalho prévio realizado por nosso grupo de pesquisa (24) não foi constatada diferença estatística após 7 dias no grupo tratado, porém os parâmetros utilizados e energia total foram diferentes (660 nm; potência de saída 20 mW, com energia de 1,6 J).

Em resumo, os resultados do presente estudo demonstram que a laserterapia pode ter um efeito positivo sobre o reparo do músculo esquelético por meio da modulação do processo inflamatório, da atividade da MMP2 e da organização e distribuição do colágeno neste tecido muscular.

### **Agradecimentos**

Os autores gostariam de agradecer a UNINOVE, CNPq e a FAPESP (2011/17638-2; 2011/04452-8) pelo suporte financeiro.

### **Referências**

- 1- Bischoff R, Heintz C (1994) Enhancement of skeletal muscle regeneration. *Dev Dyn* 201:41-54.
- 2- Chargé SB, Rudnick MA (2004) Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev* 84:209-38.
- 3- Shi X, Garry DJ (2006) Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. *Genes Dev* 20:1692-708.
- 4- Huard J, Li Y, Fu FH (2002) Muscle injuries and repair: current trends in research. *J Bone Joint Surg Am* 84:822-32.
- 5- Tidball, JG (2005) Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288:345-53.
- 6- Tidball JG, Vallalta SA (2010) Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 298:1173-87.
- 7- Hawke TJ, Garry DJ (2001) Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol* 91:534-51.

- 8- Dogra C, Hall SL, Wedhas N, Linkhart TA, Kumar A (2007) Fibroblast growth factor inducible-14 (Fn14) is required for the expression of myogenic regulatory factors and differentiation of myoblasts into myotubes: Evidence for TWEAK-independent functions of Fn14 during myogenesis. *J Biol Chem* 282:15000-10.
  
- 9- Mann CJ, Perdiguero E, Kharraz Y, Aguilar S, Pessina P, Serrano AL *et al* (2011) Review: Aberrant repair and fibrosis development in skeletal muscle. *Skeletal Muscle* 1:21.
  
- 10- Carmeli E, Moas M, Reznick AZ, Coleman R (2004) Matrix metalloproteinases and skeletal muscle: a brief review. *Muscle Nerve* 29:191-97.
  
- 11- Kjaer M (2004) Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. *Physiol Rev* 84:649-98.
  
- 12- Tang M, Zhou F, Zhang W, Guo Z, Shang Y, Lu H *et al* (2011) The role of thrombospondin-1-mediated TGF- $\beta$ 1 on collagen type III synthesis induced by high glucose. *Mol Cell Biochem* 346:49-56.
  
- 13- Chen X, Li Y (2009) Role of matrix metalloproteinases in skeletal muscle: Migration, differentiation, regeneration and fibrosis. *Cell Adhesion & Migration* 3:337-41.
  
- 14- Carmeli E, Haimovitch TG, Nemcovsky CE (2006) Expression of matrix metalloproteinase 2 and heat shock protein-72 in immobilized muscle in rats. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 6:96-102.
  
- 15- Barnes BR, Szelenyi ER, Warren GL, Urso ML (2009) Alterations in mRNA and protein levels of metalloproteinases-2, -9, and -14 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 responses to traumatic skeletal muscle injury. *Am J Physiol Cell Physiol* 297:1501-8.
  
- 16- Chang C, Werb Z (2001) The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis, and metastasis. *Trends Cell Biol* 11:37-43.

- 17- Zemowaska M, Krzysztof HO, Swierzynska M, Streminska M, Ciemerych MA (2012) Decrease of MMP-9 Activity Improves Soleus Muscle Regeneration. *Tissue Eng Part A* 18:1-11.
  
- 18- Deveci D, Marshall JM, Egginton S (2002) Chronic hypoxia induces prolonged angiogenesis in skeletal muscles of rat. *Exp Physiol* 87:287-91.
  
- 19- Cressoni MD, Dib Giusti HH, Casarotto RA, Anaruma CA (2008) The Effects of a 785-nm AlGaInP Laser on the Regeneration of Rat Anterior Tibialis Muscle After Surgically-Induced Injury. *Photomed Laser Surg* 26:461-66.
  
- 20- Silva LH, Silva MT, Gutierrez RM, Conte TC, Toledo CA, Aoki MS, Lievano RE, Miyabara EH (2012) GaAs 904-nm laser irradiation improves myofiber mass recovery during regeneration of skeletal muscle previously damaged by crotoxin. *Lasers Med Sci* 27:993-1000.
  
- 21- Nakano J, Kataoka H, Sakamoto J, Origuchi T, Okita M, Yoshimura T (2009) Low-level laser irradiation promotes the recovery of atrophied gastrocnemius skeletal muscle in rats. *Exp Physiol* 94:1005-15.
  
- 22- Mesquita-Ferrari RA, Martins MD, Silva JA Jr, da Silva TD, Piovesan RF, Pavesi VC *et al* (2011) Effects of low-level laser therapy on expression of TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$  in skeletal muscle during the repair process. *Lasers Med Sci* 26:335-40.
  
- 23- Baptista J, Martins M, Pavesi V, Bussadori S, Fernandes KPS, Mesquita-Ferrari RA (2010) Influence of laser photobiomodulation on collagen IV during skeletal muscle tissue remodeling following injury in rats. *Photomed Laser Surg* 29:12-7.
  
- 24- Souza TO, Mesquita DA, Ferrari RA, Dos Santos Pinto D Jr, Correa L, Bussadori SK, Fernandes KP, Martins MD (2011) Phototherapy with low-level laser affects the remodeling of types I and III collagen in skeletal muscle repair. *Lasers Med Sci* 26:803-14.

- 25- Medrado AP, Pugliese LS, Reis SRA, Andrade ZA (2003) Influence of low level laser therapy on wound healing and its biological action upon myofibroblasts. *Lasers Surg Med* 32:239-44.
- 26- Assis L, Moretti AL, Abrahão TB, De Souza HP, Hamblin MR, Parizotto NA (2012) Low-level laser therapy (808 nm) contributes to muscle regeneration and prevents fibrosis in rat tibialis anterior muscle after cryolesion. *Lasers Med Sci* [Epub ahead of print].
- 27- Miyabara EH, Aoki MS, Soares AG, Moriscot AS (2005) Expression of tropism-related genes in regenerating skeletal muscle of rats treated with cyclosporin-A. *Cell Tissue Res* 319:479-89.
- 28- Junqueira LC, Montes GS, Sanchez EM (1982) The influence of tissue section thickness on the study of collagen by the Picrosirius-polarization method. *Histochemistry* 74:153-6.
- 29- Hadi AM, Mouchaers KT, Schaliij I, Grunberg K, Meijer GA, Vonk-Noordegraaf A *et al* (2011) Rapid quantification of myocardial fibrosis: a new macro-based automated analysis. *Cell Oncol (Dordr)* 34:343-54.
- 30- Cleutjens JP, Kandala JC, Guarda E, Guntaka RV, Weber KT (1995) Regulation of collagen degradation in the rat myocardium after infarction. *J Mol Cell Cardiol* 27:1281-92.
- 31- Bradford MM (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* 72:248-54.
- 32- Albertini R, Villaverde AB, Aimbire F, Bjordal J, Brugnera A, Mittmann J *et al* (2008) Cytokine mRNA Expression Is Decreased in the Subplantar Muscle of Rat Paw Subjected to Carrageenan-Induced Inflammation after low-level laser therapy. *Photomed Laser Surg* 26:19-24.



- 33- Bellayr IH, Mu X, Li Y (2009) Biochemical insights into the role of matrix metalloproteinases in regeneration: challenges and recent developments. *Future Med Chem* 1:1095-111.
- 34- Yamamoto Y, Kono T, Kotani H, Kasai S, Mito M (1996) Effect of low-power laser irradiation on procollagen synthesis in human fibroblasts. *J Clin Laser Med Surg* 14:129-32.
- 35- Pereira AN, Eduardo CP, Matson E, Marques MM (2002) Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. *Lasers Surg Med* 31:263-7.
- 36- Reddy GK, Stehno-Bittel L, Enwemeka CS (1998) Laser photostimulation of collagen production in healing rabbit Achilles tendons. *Lasers Surg Med* 22:281-7.
- 37- Marques MM, Pereira AN, Fujihara NA, Nogueira FN, Eduardo CP (2004) Effect of low-power laser irradiation on protein synthesis and ultrastructure of human gingival fibroblasts. *Lasers Surg Med* 34:260-5.
- 38- Chiquet M, Matthison M, Koch M, Tannheimer M, Chiquet-Ehrismann R (1996) Regulation of extracellular matrix synthesis by mechanical stress. *Biochem Cell Biol* 74:737-44.
- 39- Han XY, Wang W, Komulainen J, Koskinen SO, Kovanen V, Vihko V *et al* (1999) Increased mRNAs for procollagens and key regulating enzymes in rat muscle following downhill running. *Pflugers Arch* 437:857-64.
- 40- Myllyla R, Myllyla VV, Tolonen U, Kivirikko KI (1982) Changes in collagen metabolism in diseased muscle. I. Biochemical studies. *Arch Neurol* 39:752-55.
- 41- Barbosa AM, Villaverde AB, Sousa LG, Munin E, Fernandez CM, Cogo JC *et al* (2009) Effect of low-level laser therapy in the myonecrosis induced by *Bothrops jararacussu* snake venom. *Photomed Laser Surg* 27:591-7.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo avaliou os efeitos da laserterapia de baixa potência sobre a regeneração do músculo esquelético e no remodelamento da matriz extracelular após lesão aguda. O tratamento com o laser de baixa potência foi capaz de promover uma redução no número de células inflamatórias totais e de mionecrose, aumento de vasos sanguíneos e fibras imaturas, além de promover uma maior organização das fibras colágenas e aumentar a atividade da MMP-2.

Como o reparo muscular envolve uma fina regulação entre as fases e fatores envolvidos bem como a modulação destes, o estudo de outros aspectos frente a TLBP envolvendo a expressão de citocinas inflamatórias e fatores de crescimento, determinação do fenótipo da fibra muscular neoformada, expressão de outras MMPs, avaliação diferencial dos tipos de colágeno entre outros torna-se essencial para o entendimento deste complexo processo.

Neste contexto, estes dados são importantes para que estudos posteriores ofereçam melhor entendimento dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na ação do laser de baixa potência durante o processo de reparo muscular.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMINI-NIK, S.; GLANCY, D.; BOIMER, C.; WHETSTONE, H.; KELLER, C.; ALMAN, B.A. Pax7 expressing cells contribute to dermal wound repair, regulating scar size through a  $\beta$ -catenin mediated process. **Stem Cells**. v.29, n. 9,p.1371-9, 2011.

ASAKURA, A.; KOMAKI, M.; RUDNICKI, M. A. Muscle satellite cells are multipotential stem cells that exhibit myogenic, osteogenic, and adipogenic differentiation. **Differentiation**. v.68, n. 4-5, p.245-53, 2001.

BAPTISTA, J.; MARTINS, M.D.; PAVESI, V.C.S.; BUSSADORI, S.K.; FERNANDES, K.P.S.; JUNIOR, D.S.P.; MESQUI-FERRARI, R.A. Influence of Laser Photobiomodulation on Collagen IV During Skeletal Muscle Tissue Remodeling After Injury in Rats. **Photomed Laser Surg**. v. 29, n. 1, p. 11-17, 2011.

BARBOSA, A.M.; VILLAVERDE, A.B.; SOUSA, L.G.; MUNIN, E.; FERNANDEZ, C.M.; COGO, J.C.; ZAMUNER, S.R. Effect of low-level laser therapy in the myonecrosis induced by Bothrops jararacussu snake venom. **Photomed Laser Surg**. n, 27. v, 4. p, 591-7, 2009.

BELLAYR, I.H.; MU, X.; L, Y. Biochemical insights into the role of matrix metalloproteinases in regeneration: challenges and recent developments. **Future Med Chem**. v. 1, n. 6, p. 1095-111, 2009.

BIBIKOVA, A., ORON, U. Regeneration in denervated toad (*Bufo viridis*) gastrocnemius muscle and the promotion of the process by low energy laser irradiation. **Anat Rec**. v. 241, n. 1, p. 123-8, 1995.

BISCHOFF, R.; HEINTZ, C. Enhancement of skeletal muscle regeneration. **Dev Dyn**. v, 201. n, 1. p, 41-54, 1994.

BJORDAL, J.M.; COUPPÉ, C.; CHOW, R.T.; TUNÉR, J.; LJUNGGREN, E.A. A systematic review of low level laser therapy with location-specific doses for pain from joint disorders. **Aust J Physiother**. v. 49, n. 2, p. 107-16, 2003.

BRACK, A.S.; RANDO, T.A. Tissue-Specific Stem Cells: Lessons from the Skeletal Muscle Satellite Cell. **Cell Stem Cell**. v. 10, p. 504-14, 2012.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**. v.72, p. 248-54, 1976.

CARMELI, E., HAIMOVITCH, T.G., NEMCOVSKY, C.E. Expression of matrix metalloproteinase 2 and heat shock protein-72 in immobilized muscle in rats. **J Musculoskelet Neuronal Interact**. v. 6, n. 1, p. 96-102, 2006.

CARMELI, E.; MOAS, M.; REZNICK, A.Z.; COLEMAN, R. Matrix metalloproteinases and skeletal muscle: a brief review. **Muscle Nerve**. v, 29. n, 2. p, 191-7, 2004.

CHARGÈ, S.B.P., RUDNICKI, M.A. Cellular and molecular regeneration of muscle regeneration. **Physiol Rev**. v. 84, p. 209-38, 2004.

CHEN, X., LI, Y. Role of matrix metalloproteinases in skeletal muscle: Migration, differentiation, regeneration and fibrosis. **Cell Adh Migr**. v. 3, n. 4, p. 337-41, 2009.

CLEUTJENS, J.P.; KANDALA, J.C.; GUARDA, E.; GUNTAKA, R.V.; WEBER, K.T. Regulation of collagen degradation in the rat myocardial after infarction. **J Mol Cell Cardiol**. v. 27, p. 1281-92, 1995.

COLLINS, C.A.; OLSEN, I.; ZAMMIT, P.S.; HESLOP, L.; PETRIE, A.; PARTRIDGE, T.A.; MORGAN, J.E. Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche. **Cell**. v. 122, n. 2, p. 289-301, 2005.

CORNELISON, D.D. Context matters: in vivo and in vitro influences on muscle satellite cell activity. **J Cell Biochem**. v. 105, n. 3, p. 663-9, 2008.

CRESSONI, M.D.; DIB GIUSTI, H.H.; CASAROTTO, R.A, ANARUMA, C.A. The Effects of a 785-nm AlGaInP Laser on the Regeneration of Rat Anterior Tibialis

Muscle After Surgically-Induced Injury. **Photomed Laser Surg.** v, 26. n, 5. p, 461-66, 2008.

CSETE, M., WALIKONIS, J., SLAWNY, N., WEI, Y., KORSNES, S., DOYLE, J.C., WOLD, B. Oxygen-mediated regulation of skeletal muscle satellite cell proliferation and adipogenesis in culture. **J Cell Physiol.** v. 189, n. 2, p. 189-96, 2001.

DAY, K.; SHEFER, G.; RICHARDSON, J.B.; ENIKOLOPOV, G.; YABLONKA-REUVENI, Z. Nestin-GFP reporter expression defines the quiescent state of skeletal muscle satellite cells. **Dev Biol.** v. 304, n. 1, p. 246-59, 2007.

DOGRA, C.; HALL, S.L.; WEDHAS, N.; LINKHART, T.A.; KUMAR, A. Fibroblast growth factor inducible-14 (Fn14) is required for the expression of myogenic regulatory factors and differentiation of myoblasts into myotubes: evidence for TWEAK-independent functions of Fn14 during myogenesis. **J Biol Chem.** v. 282, p. 1-16, 2007.

DORTBUDAK, O. Biostimulation of bone marrow cells with a diode soft laser Clin. **Oral Implants Res.** v.16, p. 540–545, 2000.

DOURADO, D. M.; FÁVERO, S.; MATIAS, R.; CARVALHO, P.T.C.; CRUZ-HÖFLING. Low-level Laser Therapy Promotes Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 Expression in Endothelial and Nonendothelial Cells of Mice Gastrocnemius Exposed to Snake Venom. **Photochem Photobiol.** v. 87, n. 2, p. 418-26, 2011.

FUJIHARA, N.A.; HIRAKI, K.R.; MARQUES, M.M. Irradiation at 780 nm increases proliferation rate of osteoblasts independently of dexamethasone presence. **Lasers Surg Med.** v. 38, n. 4, p. 332-36, 2006.

FUKUSHIMA, K.; NAKAMURA, A.; UEDA, H.; Yuasa, K.; YOSHIDA, K.; TAKEDA, S.; IKEDA, S. Activation and localization of matrix metalloproteinase-2 and -9 in the skeletal muscle of the muscular dystrophy dog (CXMDJ). **BMC Musculoskelet Disord.** v. 28, p. 8-54, 2007.

HADI, A.M.; MOUCHAERS, K.T.; SCHALIJ, I.; GRUNBERG, K.; MEIJER, G.A.; VONK-NOORDEGRAAF, A.; VAN DER LAARSE, W.J.; BELIËN, J.A. Rapid quantification of myocardial fibrosis: a new macro-based automated analysis. **Cell Oncol (Dordr)**. v, 34. n, 4. p, 343-54, 2011.

HAWKE, T.J.; GARRY, D.J. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. **J Appl Physiol**. v. 91, p. 534-51, 2001.

HUARD, J.; LI, Y.; FU, F.H. Muscle injuries and repair: current trends in research. **J Bone Joint Surg Am**. v, 84A. n, 5. p, 822-32, 2002.

JUNQUEIRA, L.C.; MONTES, G.S.; SANCHEZ, E.M. The influence of tissue section thickness on the study of collagen by the Picrosirius-polarization method. **Histochemistry**. v, 74. n, 1. p, 153-6, 1982.

KARU, T.I.; PYATIBRAT, L.V.; KOLYAKOV, S.F.; AFANASYEVA, N.I. Absorption measurements of a cell monolayer relevant to phototherapy: reduction of cytochrome c oxidase under near IR radiation. **J Photochem Photobiol B**. v, 81. n, 2. p, 98-106, 2005.

KHERIF, S.; LAFUMA, C.; DEHAUPAS, M.; LACHKAR, S.; FOURNIER, J.G.; VERDDIERE-SAHUQUE, M.; FARDEAU, M.; ALAMEDDINE, H.S. Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in regenerating skeletal muscle: a study in experimentally injured and mdx muscles. **Dev Biol**. v. 205, n. 1, p. 158-70, 1999.

KIESEIER, B.C.; SCHNEIDER, C.; CLEMENTS, J.M.; GEARING, A.J.H.; GOLD, R.; TOYKA, K.V.; HARTUNG, H.P. Expression of specific matrix metalloproteinases in inflammatory myopathies. **Brain**. v. 124, n. 2, p. 341-51, 2001.

KJAER, M. Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. **Physiol Rev**. v, 84. n, 2. p, 649-98, 2004.

KUANG, S.; GILLESPIE, M.A.; RUDNICKI, M.A. Niche regulation of muscle satellite cell self-renewal and differentiation. **Cell Stem Cell**. v. 2, p. 22-31, 2008.

LANGEN, R.C.; SCHOLS, A.M.; KELDERS, .C.; WOUTERS, E.F.; JANSSEN-HEININGER, Y.M. Tumor necrosis factor-alpha inhibits myogenic differentiation through MyoD protein destabilization. **FASEB J.** v. 18, p. 227-37, 2004.

LASSAR, A.B.; SKAPEK, S.X.; NOVITCH, B. Regulatory mechanisms that coordinate skeletal muscle differentiation and cell cycle withdrawal. **Curr Opin Cell Biol.** v. 6, p. 788–794, 1994.

LINS, R.D.A.U.; DANTAS, M.E.; LUCENA, K.C.R.; CATÃO, M.H.C.V.; GRANVILLE-GARCIA, A.F.; CARVALHO, N.L.G. Efeitos bioestimulantes do laser de baixa potência no processo de reparo. **An Bras Dermatol.** v. 85, n. 6, p. 849-855, 2010.

MALUF, A.P.; UGHINI, G.C.; MALUF, R.P.; PAGNONCELLI, R.M. Utilização de laser terapêutico em exodontia de terceiros molares inferiores. **RGO.** v. 54, p. 182-4, 2006.

MANN, C.J.; PERDIGUERO, E.; KHARRAZ, Y.; AGUILAR, S.; PESSINA, P.; SERRANO, A.L.; MUÑOZ-CÁNOVES, P. Review: Aberrant repair and fibrosis development in skeletal muscle. **Skeletal Muscle.** p. 1-21, 2011.

MAURO, A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. **J Biophys Biochem Cytol.** v. 9, p. 493-95, 1961.

MESQUITA-FERRARI, R.A.; MARTINS, M.D.; SILVA, J.A.Jr.; DA SILVA, T.D.; PIOVESAN, R.F.; PAVESI, V.C.; BUSSADORI, S.K.; FERNANDES, K.P.S. Effects of low-level laser therapy on expression of TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$  in skeletal muscle during the repair process. **Lasers Med Sci.** v. 26, n. 3, p. 335-40, 2011.

MIKAIL, S. LASER terapêutico. In: MIKAIL, S.; PEDRO, C.R. Fisioterapia veterinária. 2.ed. São Paulo: Editora Manole. 2009; p. 81-90.

MIYABARA, E.H.; AOKI, M.S.; SOARES, A.G.; MORISCOT, A.S. Expression of tropism-related genes in regenerating skeletal muscle of rats treated with cyclosporin-A. **Cell Tissue Res.** v. 319, n. 3, p. 479-89, 2005.

MOORE, P.; RIDGWAY, T.D.; HIGBEE, R.G.; HOWARD, E.W.; LUCROY, M.D. Effect of wavelength on low-intensity laser irradiation-stimulated cell proliferation in vitro. **Lasers Surg Med.** v. 36, p. 8-12, 2005.

NAKANO, J.; KATAOKA, H.; SAKAMOTO, J.; ORIGUCHI, T.; OKITA, M; YOSHIMURA, T. Low-level laser irradiation promotes the recovery of atrophied gastrocnemius skeletal muscle in rats. **Exp Physiol.** v. 94, n. 9, p. 1005-15, 2009.

OLIVEIRA, N.M.L.; GAVA, A.D.; SALVINI, T.F. Crioterapia na lesão muscular: uma análise morfométrica. **Rev bras fisioter.** v. 11, n. 5, p. 2, 2007.

OLSON, E.N.; PERRY, M.; SCHULZ, R.A. Regulation of muscle differentiation by the MEF2 family of MADS box transcription factors. **Dev Biol.** v. 172, p. 2–14, 1995.

RELAIX, F.; MONTARRAS, D.; ZAFFRAN, S.; GAYRAUND-MOREL, B.; ROCANCOURT, D.; TAJBAKHS, S.; MANSOURI, A.; CUMANO, A.; BUCKINGHAM, M. Pax3 and pax7 have distinct and overlapping functions in adult muscle progenitor cells. **J Cell Biol.** v. 172, n. 1, p. 91-102, 2006.

RENNÓ, A.C.; TOMA, R.L.; FEITOSA, S.M.; FERNANDES, K.; BOSSINI, P.S.; DE OLIVEIRA, P.; *et al.* Comparative effects of low-intensity pulsed ultrasound and low-level laser therapy on injured skeletal muscle. **Photomed Laser Surg.** v. 29, n. 1, p. 5-10, 2011.

ROCHKIND, S.; NISSAN, M.; ALON, M.; SHAMIR, M.; SALAME, K. Effects of laser irradiation on the spinal cord for the regeneration of crushed peripheral nerve in rats. **Lasers Surg Med.** v. 28, n. 3, p. 216-9, 2001.

SCHOSER, B.G.; BLOTTNER, D.; STUERENBURG, H.J. Matrix metalloproteinases in inflammatory myopathies: enhanced immunoreactivity near atrophic myofibers. **Acta Neurol Scand.** v. 105, n. 4, p. 309-13, 2002.



SHEFER, G.; WLEKLINS-LEE, M.; YABLONKA-REUVENI, Z. Skeletal muscle satellite cells can spontaneously enter an alternative mesenchymal pathway. **J Cell Sci.** v. 117, n. 22, p. 5393-404, 2004.

SHI, X.; GARRY, D.J. Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. **Genes & Dev.** v. 20, p. 1692-708, 2006.

SOUZA, T.O.; MESQUITA, D.A.; FERRARI, R.A.; DOS SANTOS PINTO D JR.; CORREA, L.; BUSSADORI, S.K.; FERNANDES, K.P.; MARTINS, M.D. Phototherapy with low-level laser affects the remodeling of types I and III collagen in skeletal muscle repair. **Lasers Med Sci.** v. 26, n. 6, p. 803-14, 2011.

STEIN, A.; BENAYAHU, D.; MALTZ, L.; ORON, U. Low level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. **Photomed. Laser Surg.** v. 23, p. 161–166, 2005.

TANG, M.; ZHOU, F.; ZHANG, W.; GUO, Z.; SHANG, Y.; LU, H.; CHEN, Y.; ZHONG, M. The role of thrombospondin-1-mediated TGF- $\beta$ 1 on collagen type III synthesis induced by high glucose. **Mol Cell Biochem.** v. 346, n. 1-2, p. 49-56, 2011.

TEDESCO, F.S.; DELLAVALLE, A.; DIAZ-MANERA, J.; MESSINA, G.; COSSU, G. Repairing skeletal muscle: regenerative potential of skeletal muscle stem cells. **J Clin Invest.** v. 120, n. 1, p. 11-9, 2010.

TIDBALL, J.G. Inflammatory processes in muscle injury and repair. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** v. 288, p. 345-53, 2005.

TIDBALL, J.G.; VLLALTO, S.A. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** v. 298, p. 1173-87, 2010.

WEISS, N.; ORON, U. Enhancement of muscle regeneration in the rat gastrocnemius muscle by low energy laser irradiation. **Anat Embryol.** v. 186, p. 467–503, 1992.

YABLONKA-REUVENI, Z.; DAY, K.; VINE, A.; SHEFER, G. Defining the transcriptional signature of skeletal muscle stem cells. **J Anim Sci.** v. 86, p. 207-16, 2008.

YEN, Y.P.; TSAI, K.S.; CHEN, Y.W.; HUANG, C.F.; YANG, R.S.; LIU, S.H. Arsenic inhibits myogenic differentiation and muscle regeneration. **Environ Health Perspect.** v. 118, n. 7, p. 949-56, 2010.

ZAMMIT P.S.; PARTRIDGE, T.A.; YABLONKA-REUVENI, Z. The skeletal muscle satellite cell: the stem cell that came in from the cold. **J Histochem Cytochem.** v. 54, n. 11, p. 1177-91, 2006.

ZAMMIT, P.S. All muscle satellite cells are equal, but are some more equal than others? **J Cell Sci.** v. 121, p. 2975-82, 2008.

ZEMOWASKA, M.; BRZOSKA, E.; SWIERCZYNSKA, M.; STREMINSKA, M.; MORACZEWSKI, J. Distinct patterns of MMP-9 and MMP-2 activity in slow and fast twitch skeletal muscle regeneration in vivo. **Int J Dev Biol.** v. 52, p. 307-14, 2008.

ZEMOWASKA, M.; KRZYSZTOF, H.O.; SWIERCZYNSKA, M.; STREMINSKA, M.; CIEMERYCH, M.A. Decrease of MMP-9 Activity Improves Soleus Muscle Regeneration. **Tissue Eng Part A.** v. 18, n. 11-12, p. 1-11, 2012.

## 7. APÊNDICES

### 7.1- Comprovante de submissão de artigo para a revista Lasers in Medical Science.

#### Lasers in Medical Science

#### Modulating effect of low level laser therapy on fibrosis in the repair process of the tibialis anterior muscle in rats --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Modulating effect of low level laser therapy on fibrosis in the repair process of the tibialis anterior muscle in rats
Article Type:	Original Article
Keywords:	muscle repair; collagen; low level laser therapy; metalloproteinase 2
Corresponding Author:	Raquel Agnelli Mesquita-Ferrari, Ph.D São Paulo, BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Agnelo Neves Alves
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Agnelo Neves Alves Kristianne Porta Santos Fernandes Claudia Aparecida Viana Melo Renato Yoshimi Yamaguchi Cristiane Miranda França Daniela Fátima Teixeira Sandra Kalil Bussadori Fabio Daumas Nunes Raquel Agnelli Mesquita-Ferrari, Ph.D
Order of Authors Secondary Information:	
Abstract:	The major objectives of the rehabilitation process following such injuries are the fast, efficient regeneration of muscle tissue and the prevention of fibrotic scar tissue. Low-level laser therapy (LLLT) has demonstrated positive effects in modulating the inflammatory response, muscle tissue repair and the prevention of fibrosis. This study verifies the effect of LLLT on the on morphological aspects of muscle tissue, collagen remodeling and activity of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) in rat skeletal muscle following acute injury. Wistar rats were divided into 5 groups: 1) control group (n=10) ; 2) sham group (n=10); 3) LLLT group (n=10); 4) non-treated injury group (n=10) and 5) injury + LLLT group (n=10). Cryoinjury was performed on the belly of the tibialis anterior (TA) muscle. LLLT was performed daily using an AlGaAs laser (780 nm; beam spot of 0.04 cm <sup>2</sup> , output power of 40 mW, power density of 1W/cm <sup>2</sup> , energy density of 10 J/cm <sup>2</sup> during 10 seconds). The animals were analyzed at one, three and seven days and the animals euthanized, the TA muscles removed and weighed. The morphological aspects were evaluated by H & E staining, the amount and distribution of collagen fibers by picrosirius staining and characterization and activity of MMP-2 by zimography and western blotting techniques, respectively. The results showed that LLLT induced a reduction in inflammatory infiltrate and myonecrosis after one day, an increase in the number of blood vessels after three and seven days as well as an increase in the number of immature muscle fibers and MMP-2 gelatinase activity after seven days. In conclusion LLLT has a positive effect on the inflammatory process,

