

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

**ANDRÉIA MARTINELLI DE SIQUEIRA ARAUJO**

---

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA FOTOBIMODULAÇÃO SOBRE O  
REMODELAMENTO DA MATRIZ EXTRACELULAR E EXPRESSÃO DE  
CITOCINAS INFLAMATÓRIAS DURANTE O PROCESSO DE HIPERTROFIA  
COMPENSATÓRIA**

---

**SÃO PAULO**

**2018**

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

**ANDRÉIA MARTINELLI DE SIQUEIRA ARAUJO**

---

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA FOTOBIMODULAÇÃO SOBRE O  
REMODELAMENTO DA MATRIZ EXTRACELULAR E EXPRESSÃO DE  
CITOCINAS INFLAMATÓRIAS DURANTE O PROCESSO DE HIPERTROFIA  
COMPENSATÓRIA**

---

Dissertação de Mestrado  
apresentada a Universidade  
Nove de Julho para obtenção do  
título de mestre em ciências da  
reabilitação.

**Orientadora**

Profa. Dra. Raquel Agnelli Mesquita Ferrari

**SÃO PAULO**

**2018**

Araujo, Andréia Martinelli de Siqueira.

Avaliação da influência da fotobiomodulação sobre o remodelamento da matriz extracelular e expressão de citocinas inflamatórias durante o processo de hipertrofia compensatória. / Andréia Martinelli de Siqueira Araujo. 2018. 66 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2018.

Orientador (a): Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Raquel Agnelli Mesquita Ferrari.

1. Músculo esquelético. 2. Hipertrofia. 3. Terapia com luz de baixa intensidade. 4. Citocinas. 5. Fototerapia.

I. Ferrari, Raquel Agnelli Mesquita. II. Título

CDU 615.8

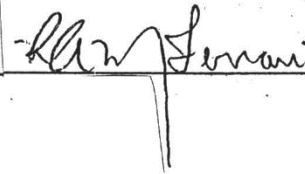
São Paulo, 19 de dezembro de 2018.

**TERMO DE APROVAÇÃO**

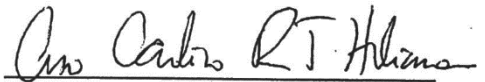
Aluno(a): Andréia Martinelli de Siqueira Araujo

Título da Dissertação: "Avaliação da Influência da Fotobiomodulação Sobre o Remodelamento da Matriz Extracelular e Expressão de Citocinas Inflamatórias Durante o Processo de Hipertrofia Compensatória".

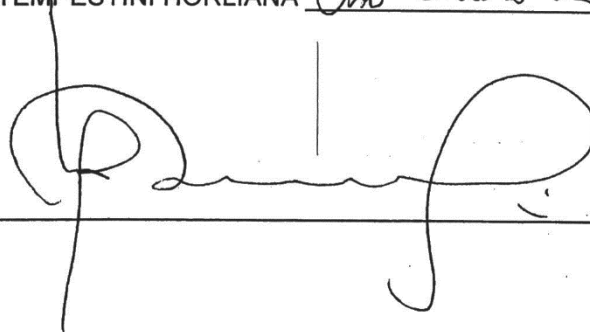
Presidente: PROFA. DRA. RAQUEL AGNELLI MESQUITA FERRARI



Membro: PROFA. DRA. ANNA CAROLINA RATTO TEMPESTINI HORLIANA



Membro: PROF. DR. CARLOS ALBERTO SILVA



## DEDICATÓRIA

**Aos meus filhos** por serem o principal motivo da minha perseverança.

**Ao meu marido** pela confiança e apoio em todo tempo.

**Aos meus Pais** por serem sempre um exemplo dos caminhos retos e justos para  
minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

**À Deus**, por acreditar que todas as coisas são feitas por Ele e para Ele e que sem Ele nada do que hoje existe jamais poderia existir.

**À Universidade Nove de Julho (UNINOVE)**, pela infraestrutura e concessão da bolsa.

**À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela bolsa concedida.

**À minha orientadora**, Profa. Dra. Raquel Agnelli Mesquita Ferrari, a quem tenho profunda admiração, agradeço por todo conhecimento transmitido nesse período, por todo apoio, paciência e confiança em todos os momentos.

**À Profa e Dra**, Stella Maris, que muito colaborou com esse trabalho estando junto, ensinando e se dedicando o tempo todo, registro aqui meus sinceros agradecimentos.

**Aos professores da pós-graduação**, por compartilharem seus conhecimentos e prestarem todo auxílio necessário.

**Aos profs e Drs**, Lucas Andreo, Agnelo Alves e Beatriz Guimarães, pois tudo que vocês me ensinaram serviram como base para eu chegar até aqui, registro meu respeito e admiração por vocês.

**Aos técnicos do laboratório de Pesquisa**, Eduardo e Gabriel por sempre serem solícitos em tudo que precisei.

**Aos amigos de Laboratório**, Renata, Dowglas, Kaline, Tainá, Tamiris, Mônica, Patricia, Marcelo, Loriane e Wallace por de alguma forma terem me ajudado ou me ensinado algo novo.

**Aos meus melhores amigos da Pós-graduação, prof. Dr. Lucas Andreo e a Mr. Solange Almeida**, confesso que aqui me faltam palavras para agradecer, obrigada por tudo, por sempre estarem ao meu lado nos dias mais difíceis, por dedicarem parte do tempo de vocês para me ajudar não importando o dia e nem a hora, pelas palavras de apoio que precisei em certos momentos, enfim agradeço a Deus por vocês existirem e fazerem parte desse momento importante em minha vida.

**Aos alunos de iniciação científica**, que sempre estavam dispostos, colaborando e aprendendo o que fosse preciso para a realização desse trabalho e com um companheirismo sem igual.

**À minha família**, mãe, pai, filhos, marido, irmãs e sobrinha por serem a minha base, por me apoiarem e por entenderem a minha ausência em certos momentos.

*“Suba o primeiro degrau com fé.*

*Não é necessário que você veja toda a escada. Apenas dê o primeiro passo”.*

*.Martin Luther King*



## RESUMO

A hipertrofia compensatória ocorre devido à sobrecarga mecânica do músculo promovendo o aumento no tamanho da fibra muscular. A fotobiomodulação (FBM) tem demonstrado efeitos benéficos sobre o tecido muscular durante a hipertrofia compensatória. O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da FBM sobre os marcadores inflamatórios Interleucina-6 (IL-6) e Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- $\alpha$ ) e sobre a atividade das metaloproteinases do tipo 2 da matriz (MMP-2) durante o processo de hipertrofia por sobrecarga do músculo plantar de ratos. **Metodologia:** Foram utilizados 45 ratos wistar, pesando 250 g, divididos em 3 grupos: grupo controle, grupo hipertrofia e grupo hipertrofia com irradiação. A hipertrofia foi induzida através do modelo de ablação dos sinergistas do músculo plantar. A irradiação foi realizada com laser de baixa potência AsGaAl ( $\lambda$  780 nm; 40mW; densidade de energia 10J/cm<sup>2</sup>; 10 segundos cada ponto, 8 pontos; 3,2J). Os grupos foram avaliados após 7 e 14 dias. Ao final do protocolo os músculos plantares foram removidos e encaminhados para análise dos marcadores inflamatórios por técnica de ELISA e por PCR em tempo real e a atividade das MMP-2 por técnica de zimografia. **Resultados:** A expressão proteica demonstrou que a FBM aumentou os níveis de IL-6 no grupo hipertrofia +LBP (H+LBP) quando comparado ao grupo hipertrofia (H) e reduziu o TNF- $\alpha$  nos grupos H e H+LBP quando comparado ao grupo Controle após 7 dias. A expressão gênica demonstrou um aumento de IL-6 no grupo H+LBP quando comparado ao grupo H após 14 dias e um aumento de TNF- $\alpha$  no grupo H+LBP quando comparado ao grupo H após 7 dias. Em relação a atividade da MMP-2 houve aumento nos grupos H e H+LBP quando comparado ao grupo controle após 7 e 14 dias. **Conclusão:** A FBM no processo de hipertrofia compensatória modulou a expressão das citocinas inflamatórias IL-6 e TNF- $\alpha$ , contudo não alterou de forma significativa a atividade da MMP-2, nos períodos avaliados embora tenha demonstrado uma tendência de elevação após 14 dias.

**Palavras-Chave:** Músculo esquelético, Hipertrofia, Terapia com luz de baixa intensidade, Citocinas, Fototerapia.

## **ABSTRACT**

Compensatory hypertrophy occurs due to mechanical overload of the muscle promoting increase in muscle fiber size. Photobiomodulation (PBMT) has demonstrated beneficial effects on muscle tissue during compensatory hypertrophy. The objective of this study was to evaluate the effects of PBMT on the inflammatory markers Interleukin-6 (IL-6) and Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- $\alpha$ ) and on the activity of matrix type 2 metalloproteinases (MMP-2) during the rat plantar muscle overload hypertrophy process. **Methods:** Wistar rats, weighing 250 g, were divided into three groups: control group, hypertrophy group and irradiation hypertrophy group. Hypertrophy was induced through the ablation model of plantar muscle synergists. The irradiation was performed with AsGaAl low-level laser ( $\lambda$  780 nm; 40mW; energy density 10J/ cm<sup>2</sup>; 10 seconds each point; 8 points; 3,2J). The groups were evaluated after 7 and 14 days. At the end of the protocol, the plantar muscles were removed and sent for analysis of the inflammatory markers by Elisa and by real-time PCR technique and the activity of MMP-2 by zymography technique. **Results:** Protein expression increased IL-6 levels in the Hypertrophy + low-level laser therapy (H + LLLT) group when compared to the hypertrophy group (H), a reduction was observed in the H group when compared to the Control group and reduction of TNF- $\alpha$  in the H and H + LLLT groups when compared to the Control group after 7 days. Gene expression demonstrated an increase of IL-6 in the H + LLLT group when compared to the H group after 14 days and an increase of TNF- $\alpha$  in the H + LLLT group when compared to the H group after 7 days. MMP-2 activity increased in the H and H + LLLT groups when compared to the control group after 7 and 14 days. **Conclusion:** PBMT in the process compensatory hypertrophy modulated the expression of inflammatory cytokines IL-6 and TNF- $\alpha$ , but did not significantly alter the activity of MMP-2 in the evaluated periods although it showed a tendency to increase after 14 days.

**Key words:** Skeletal muscle, Hypertrophy, Low-intensity light therapy, Cytokines, Phototherapy.

## SUMÁRIO

<b>1. Contextualização.....</b>	<b>16</b>
1.1 Hipertrofia compensatória.....	16
1.2 Modelo de sobrecarga funcional .....	16
1.3 Função das células satélites na hipertrofia compensatória .....	17
1.4 Mediadores inflamatórios no músculo esquelético.....	18
1.5 Matriz extracelular - sua importância no tecido muscular e função das metaloproteinases da matriz .....	20
1.6 Laser de baixa potência .....	21
JUSTIFICATIVA .....	23
<b>2 OBJETIVO.....</b>	<b>24</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>25</b>
3.1. Animais.....	25
3.2. Grupos experimentais .....	25
3.3. Fluxograma da metodologia do estudo.....	27
3.4. Procedimento cirúrgico.....	28
3.5. Irradiação com Laser de Baixa Potência (LBP).....	29
3.6. Procedimento de eutanásia e coleta do material.....	31
3.7. Análise da expressão proteica de TNF- $\alpha$ IL-6 por ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) .....	31
3.8. PCR em tempo real: expressão gênica dos marcadores inflamatórios IL- 6 e TNF $\alpha$ .....	31
3.8.1. Extração e controle de qualidade de RNA total.....	31
3.8.2. Síntese do DNA Complementar (cDNA).....	32

3.8.3. PCR em tempo real quantitativo (qRT-PCR).....	33
3.9. Análise da atividade das metaloproteinases (MMP-2) por Zimografia.....	33
3.10. Análise dos resultados.....	34
<b>4. Resultados.....</b>	<b>35</b>
4.1. Artigo 1 Avaliação da influência da fotobiomodulação sobre o remodelamento da matriz extracelular e expressão de citocinas inflamatórias durante o processo de hipertrofia compensatória.....	35
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>52</b>
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>57</b>
<b>7. Referências bibliográficas.....</b>	<b>58</b>
<b>8. Anexos.....</b>	<b>66</b>
8.1 Certificado CEUA.....	66

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Parâmetros utilizados para irradiação com LBP .....	30
<b>Tabela 2 :</b> Sequência de primers utilizados para análise de níveis de mRNA por PCR em tempo real.....	33

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Fluxograma da metodologia do estudo.....	27
<b>Figura 2:</b> Procedimento cirúrgico de ablação dos músculos sinergistas (gastrocnêmio e sóleo) do músculo plantar.....	28
<b>Figura3:</b> Equipamento utilizado para irradiação .....	29
<b>Figura 4:</b> Procedimentos de irradiação na região do músculo plantar.....	30
<b>Figura 5:</b> Resultado da expressão proteica da IL-6 após 7 e 14 dias em músculos plantares que receberam ou não irradiação com LBP durante o processo de hipertrofia compensatória.....	47
<b>Figura 6:</b> Resultado da expressão proteica de TNF- $\alpha$ após 7 e 14 dias em músculos plantares que receberam ou não irradiação com LBP durante o processo de hipertrofia compensatória.....	48
<b>Figura 7:</b> Resultado da expressão dos níveis de mRNA de IL-6 após 7 e 14 dias em músculos plantares que receberam ou não irradiação com LBP durante o processo de hipertrofia compensatória.....	49
<b>Figura 8:</b> Resultado da expressão dos níveis de mRNA de TNF- $\alpha$ após 7 e 14 dias em músculos plantares que receberam ou não irradiação com LBP durante o processo de hipertrofia compensatória.....	50
<b>Figura 9:</b> Resultado da atividade gelatinolítica da MMP-2 por zimografia após 7 e 14 dias em músculos plantares que receberam ou não irradiação com LBP durante o processo de hipertrofia compensatória.....	51

## LISTA DE ABREVIATURAS

ASGAAL	Arseneto de gálio e alumínio
AST	Área de secção transversa
ATP	Adenosina trifosfato
cDNA	DNA complementar
CS	Células satélite
DEPC	Dimetil pirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilendiamino treta-acético
ELISA	Enzyme linked immuno sorbent assay
FBM	Fotobiomodulação
HC	Hipertrofia compensatória
IL-6	Interleucina 6
LBP	Laser de baixa potência
MEC	Matriz extracelular
MMPs	Metaloproteinases da matriz
MMP-2	Metaloproteinases da matriz do tipo 2
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RNA	Ácido ribonucleico
TGF- $\beta$	Fator de transformação de crescimento- $\beta$
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral- $\alpha$
LLLT	Low Level Laser Therapy

## 1. CONTEXTUALIZAÇÃO

O tecido muscular esquelético compõem cerca de 40% á 45% do peso corporal total<sup>(1)</sup>. Este tecido apresenta grande capacidade adaptativa (plasticidade) é composto por fibras musculares e células satélites (CS) rodeadas por matriz extracelular (MEC)<sup>(2)</sup>, o músculo esquelético é capaz de alterar suas características para atender às suas diversas demandas funcionais<sup>(3,4,5)</sup>.

A adaptação neste tecido pode ocorrer por conta de uma sobrecarga mecânica aguda imposta as fibras musculares, favorecendo o aumento da síntese proteica, promovendo assim o aumento da área transversal da fibra muscular, bem como, da massa muscular<sup>(4,6,7)</sup>.

O aumento do tamanho da fibra, ou seja, a hipertrofia, é necessária para permitir que o músculo atenda a demanda exigida para a geração de força<sup>(6)</sup>. Associado ao crescimento da fibra, ocorrem outras alterações no tecido muscular, como o remodelamento da matriz e o aumento do fluxo sanguíneo que são necessários para garantir a funcionalidade do músculo<sup>(4)</sup>.

### 1.1 HIPERTROFIA COMPENSATÓRIA

A literatura descreve algumas formas possíveis para alterar a demanda funcional de um músculo, dentre as quais estão: a sobrecarga por meio de exercícios e treinamento<sup>8</sup>, o alongamento e a mobilização<sup>(9,10)</sup> e a hipertrofia compensatória (HC), A técnica de HC, consiste na retirada cirúrgica dos músculos sinergistas<sup>(11-14)</sup>. Neste estudo, utilizamos o modelo de HC, por ser um modelo que induz a um rápido aumento de massa muscular em um curto espaço de tempo, que resultam em alterações celulares e moleculares significativas <sup>(4,11,15,16)</sup>.

### 1.2 MODELO DE SOBRECARGA FUNCIONAL

O modelo de hipertrofia compensatória através da sobrecarga funcional, está bem descrito na literatura e portanto, é utilizado por diversos autores por permitir uma efetiva resposta hipertrófica e adaptativa do tecido muscular em poucos dias. A indução da HC, consiste na ablação dos músculos sinergistas através de procedimento cirúrgico, direcionando assim um excesso de carga mecânica sobre um



outro músculo que deverá se adaptar a essa sobrecarga<sup>(7,11,17)</sup>.

Os músculos comumente utilizados no modelo de hipertrofia compensatória em ratos são os músculos sóleo e plantar, para isso retira-se o músculo gastrocnêmio em todas as suas porções (lateral e medial), sobrecarregando assim o músculo sóleo, ou retira-se os músculos gastrocnêmio e sóleo sobrecarregando-se o músculo plantar<sup>(4,14,18,19)</sup>.

O músculo esquelético apresenta fibras de dois tipos: as fibras rápidas que incluem os tipos IIa, IIb, IIx/IIc e as fibras lentas que compreendem o tipo I<sup>(18,20)</sup>, neste estudo, utilizamos o músculo plantar para gerar a sobrecarga funcional, a justificativa embasada na literatura para a utilização do músculo plantar, consiste no fato de que suas fibras são predominantemente compostas por fibras IID, além de tipo I:  $8 \pm 2\%$ ; tipo IIa:  $19 \pm 3\%$  e tipo IIb/D:  $74 \pm 4\%$  e por sua rápida adaptação<sup>(11,20)</sup>. Este músculo apresenta pouca quantidade de mitocôndrias uma vez que utiliza a via glicolítica, obtendo assim uma rápida resposta. A ablação dos sinergistas do músculo plantar promove uma sobrecarga de características crônica o que geram respostas hipertróficas com adaptação rápida envolvendo massa muscular, síntese de proteínas, sinalização e ativação de enzimas<sup>(14,15)</sup>.

Um ponto importante a ser considerado no momento da cirurgia, é preservar a condição neurovascular do músculo, uma vez que um dano a essa região implica na perda da função motora muscular, bem como, no desenvolvimento da hipertrofia do músculo que sofrerá a sobrecarga<sup>(12)</sup>.

### **1.3 FUNÇÃO DAS CELULAS SATÉLITES NA HIPERTROFIA COMPENSATÓRIA**

Durante a hipertrofia compensatória ocorre a ativação das células satélites (CS), estas, são células precursoras miogênicas indiferenciadas que permanecem em estado quiescentes, entre a lâmina basal e o sarcolema das fibras musculares<sup>(2,21,22)</sup><sup>23</sup>. Quando ativadas após algum tipo de dano tecidual, uma pequena parte retorna ao estado quiescente para restabelecer a população de CS, processo conhecido como auto renovação<sup>(24-25)</sup>, enquanto uma outra parte migra para o local da lesão diferenciando-se em novas miofibras ou ainda unindo-se as miofibras pré-existentes<sup>(23,26)</sup>.

Para que ocorra a hipertrofia é necessário que as miofibras incorporem novos mionúcleos as fibras já existentes, o que permite a fibra muscular aumentar o seu tamanho, caracterizando assim a hipertrofia<sup>(23,26)</sup>. Além disso, a sobrecarga aguda no músculo faz com a área de secção transversa (AST) da fibra aumente seu tamanho, conseqüentemente aumentando a massa muscular<sup>(18)</sup> e a quantidade de mionúcleos<sup>(27)</sup>.

O domínio mionuclear consiste em uma determinada área de citoplasma controlada por um único mionúcleo<sup>(28,29)</sup>, a quantidade de mionúcleos pode estar relacionada com a síntese proteica e com a incorporação de novos mionúcleos doados por outras células satélites<sup>(29)</sup>.

As CS são ativadas frente a um estímulo de sobrecarga por exercício ou ainda por dano muscular<sup>(23)</sup>. Quando ativadas, as CS saem do seu estado quiescente e dão seqüência aos seguintes eventos: proliferação, diferenciação, migração e fusão com uma fibra adulta ou formação de uma nova fibra.<sup>(15,16,23,26)</sup>

A hipertrofia do músculo esquelético pode ocorrer através dos seguintes mecanismos: por ativação das CS em respostas a um estímulo agudo, como no caso da ablação sinérgica de determinados músculos ou através de realização de exercícios excêntricos de alta intensidade. É importante lembrar que estas são situações que favorecem o surgimento de lesões musculares<sup>(20)</sup>.

#### **1.4 MEDIADORES INFLAMATÓRIOS NO MÚSCULO ESQUELÉTICO**

O músculo esquelético é um órgão capaz de liberar e expressar citocinas<sup>(30,31)</sup>. As citocinas compõem um grupo de polipeptídeos ou proteínas com ação imunorreguladora<sup>(32)</sup>, produzidas por vários tipos de células, bem como, por células do sistema imunológico, elas incluem as interleucinas, os fatores estimuladores de crescimento, o fator de necrose tumoral, os fatores de crescimento, entre outros<sup>(33)</sup>. Quando liberadas, essas citocinas medeiam a comunicação entre as células de forma local ou sistêmica<sup>(33)</sup> e podem ser liberadas por diversas células através de diversos estímulos<sup>(33)</sup>. Por isso as citocinas são consideradas pleiotrópicas por influenciar vários tipos de células com diferentes efeitos de acordo com o tecido alvo<sup>(33)</sup>. Diante de uma lesão tecidual, ocorre uma inflamação local do tecido, com presença de citocinas que facilitarão o influxo das células de defesa como os neutrófilos, os linfócitos e os monócitos para o músculo<sup>(32)</sup>.

Quando liberadas pelas fibras do músculo esquelético, esses mediadores inflamatórios são denominados de miocinas<sup>(31)</sup>. As miocinas podem exercer efeitos parácrinos (locais) ou endócrinos (sistêmicos)<sup>(31,34)</sup> e podem aumentar em quantidade durante um trauma, como também podem diminuir após a remissão do trauma<sup>(35)</sup>.

Durante o processo de hipertrofia muscular, há presença de marcadores inflamatórios, como por exemplo a interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ )<sup>(36)</sup>. Broholm C et al. (2008)<sup>(37)</sup>, relataram em seu estudo que o processo de contração muscular desempenha um papel de regulação das miocinas, a exemplo disto podemos destacar o papel da interleucina-6 (IL6)<sup>(38)</sup>, a IL-6 é a primeira miocina que é produzida e liberada pela musculatura esquelética em resposta à contração muscular, sua ação ocorre tanto no tecido muscular como também em outros órgãos quando transportadas pela corrente sanguínea<sup>(34,37)</sup>. Especificamente no músculo esquelético, a IL-6 pode agir como sensor de energia favorecendo a captação de glicose pelo músculo<sup>(34)</sup>. A IL-6 é também responsável pela ativação das células satélites, aumentando sua proliferação, formando assim novas fibras denominadas mioblastos, promovendo aumento da massa muscular e consequente hipertrofia do músculo a partir da sinalização das células satélites<sup>(34)</sup>.

Quando em níveis elevados, ou seja, logo após um estímulo, a IL-6 desempenha uma importante função na proliferação das células musculares, já em níveis baixos, após cessar os estímulos, a IL-6 participa da diferenciação das células satélites então proliferadas<sup>(34)</sup>. Assim certos estímulos imposto ao tecido muscular como o exercício, ou um estímulo advindo de uma sobrecarga funcional como ocorre na hipertrofia compensatória, podem desencadear a produção de IL-6 no tecido muscular, aumentando a quantidade de mionúcleos e promovendo um ambiente propício para o estímulo da síntese proteica<sup>(34)</sup>.

A concentração de IL-6 no músculo esquelético, tem demonstrado relação ao estímulo para a liberação de outras citocinas com efeito anti-inflamatório, como a (IL-1ra) e a (IL10)<sup>(32)</sup>, portanto, a IL-6 pode ainda apresentar efeitos regulatórios ou moduladores da inflamação sobre o tecido muscular<sup>(32)</sup>.

Um estudo com camundongos deficientes de IL-6, demonstrou que não ocorreu hipertrofia das miofibras, após a sobrecarga do músculo plantar por ablação do tendão do gastrocnêmio, uma vez que não verificou-se um aumento significativo na AST das fibras musculares desses animais quando comparado à camundongos sem alteração

genética de IL-6, demonstrando a importância dessa citocina na hipertrofia por sobrecarga<sup>(39)</sup>.

Outra citocina importante para músculo esquelético é o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). Esta citocina encontra-se presente em casos de inflamação aguda, portanto é considerado um mediador precoce da inflamação<sup>(40)</sup>. Apresenta-se também em processos infecciosos e em muitas doenças em diversas partes do corpo humano<sup>(40,41)</sup>. No que se diz respeito ao tecido muscular, o TNF- $\alpha$  relaciona-se diretamente com situações de lesão tecidual<sup>(42)</sup>.

O TNF- $\alpha$  é produzido pelo sistema imunológico e apresenta característica pró inflamatória<sup>(43)</sup>, é liberado por monócitos, neutrófilos e macrófagos<sup>(5)</sup>, sendo assim, pode contribuir para o processo de reparo muscular, através do influxo dessas células que realizarão a fagocitose e remoção do tecido danificado, melhorando assim as condições de reparo do tecido muscular e diminuindo a inflamação<sup>(32,44)</sup>. Contudo, seu aumento, associa-se também a efeitos deletérios às células como ausência de proteção, diminuição do volume de massa muscular e apoptose celular<sup>(44)</sup>, portanto é importante considerar sua quantidade no tecido muscular em diferentes situações como por exemplo na HC. Além disso esta citocina é capaz de favorecer a cascata de outras citocinas<sup>(43)</sup>, como por exemplo a IL-6 por meio da ativação do fator nuclear Kappa B (NF-KB), influenciando no processo de diferenciação das células musculares<sup>(45)</sup>. Um outro aspecto importante dessa citocina é mediar a fase proliferativa da miogenese<sup>(46)</sup>.

## **1.5 MATRIZ EXTRACELULAR - SUA IMPORTÂNCIA NO TECIDO MUSCULAR E FUNÇÃO DAS METALOPROTEINASES DA MATRÍZ**

A matriz extracelular (MEC), é compreendida como uma estrutura dinâmica que confere suporte, proteção e estabilidade ao tecido muscular<sup>47</sup>. A MEC é composta por colágenos tipo I, III e IV, fibronectina, elastina, proteoglicanos e laminina<sup>(48)</sup>. A degradação dos componentes da MEC, ocorrem através de enzimas denominadas metaloproteinases da matriz (MMPs), sendo estas, enzimas dependentes de cálcio e zinco que participam diretamente no processo de remodelamento da matriz<sup>(48,49)</sup>.

O remodelamento por meio da degradação dos componentes excessivos MEC, é de fundamental importância, uma vez que o excesso desses componentes como por exemplo o colágeno, que apesar de ser o principal componente da matriz com

importante papel no desempenho da função muscular, quando em excesso pode comprometer o desempenho e as características do tecido muscular devido a formação de tecido cicatricial (fibrose), expondo assim o músculo a um aumento ao risco de lesão e/ou perda de função<sup>(49)</sup>.

As principais MMPs presentes no músculo esquelético são as MMP-2 e as MMP-9, responsáveis por degradarem os colágenos tipos: IV, VII e X. Especificamente a MMP-2, participa da regeneração do músculo, degradando os componentes da lâmina basal e dessa forma, contribuindo para a migração, proliferação e diferenciação das CS<sup>(49,50)</sup>.

As MMP-2 degradam e modulam a deposição do colágeno tipo IV, favorecendo uma melhor organização desse colágeno no tecido e contribuindo com a formação de novas fibras<sup>(51)</sup>.

O colágeno do tipo IV, pode ser encontrado em grande quantidade na membrana basal, contribuindo para o remodelamento e arranjo tecido muscular e parece estar envolvido com a transmissão da força do músculo para o tendão durante a hipertrofia muscular<sup>(52)</sup>, sendo este um importante aspecto a ser considerado, já que durante a hipertrofia compensatória ocorre intenso remodelamento da MEC. para atender as modificações decorrentes deste processo, contudo os mecanismos e vias de suporte que a MEC oferece durante a hipertrofia ainda não estão totalmente claros.

## **1.6 LASER DE BAIXA POTÊNCIA**

O laser de baixa potência (LBP), tem sido utilizado como um recurso terapêutico nos tratamentos de diversas alterações musculoesquelética, devido a sua capacidade de apresentar uma resposta positiva na modulação dessas alterações conforme já descrito na literatura<sup>(4,49,53)</sup>.

O LBP apresenta um efeito fotobiomodulador sobre os tecidos em diferentes condições, favorecendo a proliferação celular<sup>(54)</sup> e a neoangiogenese<sup>(49)</sup>. Esses efeitos biológicos, dependem dos parâmetros empregados, como comprimento de onda ( $\lambda$ ), intensidade da potência ( $W/cm^2$ ), a energia (J), a densidade de energia ( $J/cm^2$ ), e o tempo do tratamento<sup>(49)</sup>. Outro aspecto importante a ser considerado, é o tipo de tecido, uma vez que este, pode influenciar na absorção da luz pelos cromóforos presentes nas células. O efeito da irradiação do laser nos tecidos, ocorre através da absorção da luz, pelos fotorreceptores presentes nas células, estes podem modular

as reações bioquímicas e fotoquímicas nas células, promovendo assim diversas reações intracelulares que resultará na transferência de elétrons da cadeia respiratória, induzindo a síntese de adenosina trifosfato (ATP)<sup>(55)</sup>. Essas transferências de elétrons ocorrem nos cromóforos localizados dentro da mitocôndria, esse processo é definido como cadeia mitocondrial respiratória.

Dentre os efeitos positivos do LBP, encontram-se a modulação da resposta inflamatória, da mionecrose, da síntese e produção de colágeno<sup>(49,51,56)</sup> e do remodelamento da MEC<sup>(51)</sup>, além de apresentar efeitos positivos sobre os fatores de crescimento<sup>(57)</sup> e sobre a angiogênese<sup>(55)</sup>. Em relação a modulação da resposta inflamatória Alves et al. (2014)<sup>(54)</sup>, demonstraram que o uso do LBP no tecido muscular de ratos após a indução da lesão através de criolesão, diminuiu o processo inflamatório e a mionecrose e favoreceu de forma positiva a angiogênese, a atividade da MMP-2 e a organização e deposição do colágeno. Souza et al. (2011)<sup>(56)</sup>, verificaram um aumento na quantidade de fibras de colágeno tipo I e III após 7 dias, observou também um aumento da angiogênese e redução de mionecrose. No estudo de Ribeiro et al. (2015)<sup>(49)</sup>, ao utilizar o LBP com comprimento de onda de 780nm, verificaram que houve redução do infiltrado inflamatório após 3 dias, bem como da mionecrose após 1 e 3 dias, nesse mesmo estudo, evidenciou-se também um aumento no número de vasos sanguíneos após 3 e 7 dias, aumento das fibras imaturas após 7 dias, além de redução e organização do colágeno após 7 dias. Mesquita-Ferrari et al. (2011)<sup>(57)</sup> ao aplicar o LBP durante o processo de reparo muscular, verificaram uma modulação na expressão das citocinas TNF- $\alpha$  após 1 e 7 dias e TGF- $\beta$  após 7 dias, ambas as citocinas, apresentaram redução em sua expressão no período avaliado.

Apesar de diversos estudos descritos na literatura mencionarem muitos efeitos positivos do LBP sobre o tecido muscular durante a fase de reparo desse tecido, pouco há descrito sobre seus efeitos durante a hipertrofia compensatória. No estudo de Terena et al. (2015)<sup>(7)</sup>, ao analisar o efeito do LBP 780nm sobre os aspectos morfológicos do tecido muscular durante o processo de hipertrofia compensatória por sobrecarga, verificaram um aumento na área de secção transversa das fibras musculares após 14 dias. Em um outro estudo, Terena et al. (2018)<sup>(4)</sup>, demonstraram que durante a hipertrofia do músculo plantar de ratos induzida por ablação de seus sinergistas (gastrocnêmio e sóleo), houve: (1) aumento da área de secção transversa no grupo irradiado, (2) aumento no número de mionúcleos após 14 dias, (3) um

aumento do colágeno no grupo irradiado após 7 dias e uma diminuição após 14 dias. Observaram ainda maior organização das fibras colágenas nos tendões após 7 e 14 dias ao compará-las com as fibras do grupo que não recebeu irradiação com LBP.

Sabendo-se que o LBP apresenta efeitos fotobiomoduladores no músculo esquelético durante o processo de hipertrofia compensatória, analisar a interação desse recurso sobre os marcadores inflamatórios IL-6 e TNF- $\alpha$  assim como também sobre a atividade das MMP-2, durante o processo de hipertrofia compensatória, nos permite melhorar o entendimento dos mecanismos do LBP sobre o tecido muscular quando exposto a uma situação de sobrecarga.

### **JUSTIFICATIVA**

Clinicamente, o LBP é utilizado como um excelente recurso terapêutico diante de diversos danos musculares, por promover um bom efeito reparador sobre o tecido muscular<sup>(48,49,51,58)</sup>. A hipertrofia compensatória é causada por lesões nervosas parciais e/ou por desequilíbrios que diminuem a ação dos músculos sinergistas, aumentando a sobrecarga em outros músculos que deverão se adaptar<sup>(7)</sup>.

Apesar de alguns estudos<sup>(4,7)</sup> demonstrar efeitos positivos do LBP durante o processo de hipertrofia compensatória do músculo esquelético, não há relatos na literatura sobre o efeito direto do LBP, sobre a modulação dos marcadores inflamatórios nem sobre a MMP-2 durante processo de hipertrofia por sobrecarga.

Portanto a compreensão de como o LBP pode interferir sobre os marcadores inflamatórios e sobre as MMP-2 no processo de HC, nos permite ampliar o entendimento de ação desse recurso terapêutico, possibilitando estabelecer novos protocolos de tratamento que resultem em melhoria funcional durante a hipertrofia muscular compensatória por sobrecarga.

Como hipótese, o LBP poderá interferir na hipertrofia por sobrecarga, modulando a expressão proteica de mediadores inflamatórios, e a ação das MMP-2 no tecido muscular durante esse processo, promovendo assim uma melhor resposta do tecido muscular, no que se diz respeito aos mecanismos envolvidos na hipertrofia por sobrecarga muscular.

## 2. OBJETIVO

- **Geral:** Avaliar os efeitos do LBP (780 nm) sobre a expressão de mediadores inflamatórios e de metaloproteinase da matriz durante o processo de hipertrofia por sobrecarga no músculo plantar de ratos.
- **Específicos:** Avaliar os efeitos do LBP (780 nm) sobre as citocinas IL-6 e TNF- $\alpha$  durante o processo de hipertrofia por sobrecarga. Avaliar os efeitos do laser de baixa potência sobre a atividade da MMP-2 no músculo plantar durante a hipertrofia por sobrecarga.



### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Nove de Julho - UNINOVE (AN0013/2017) e os experimentos foram realizados em conformidade com as diretrizes do Conselho Nacional para o Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

#### 3.1. Animais

Foram utilizados 45 ratos Wistar, machos, com idade de 2 meses e peso médio de 250g, 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*.

#### 3.2. Grupos experimentais

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 3 grupos experimentais.

Exceto os animais do grupo I (Controle), os outros 40 animais fizeram parte tanto do grupo II (Hipertrofia), como do grupo III (Hipertrofia + LBP) respectivamente, pois a cirurgia foi realizada bilateralmente, possibilitando que um mesmo animal fizesse parte tanto do grupo II (pata direita sem irradiação), como do grupo III (pata esquerda com irradiação). A decisão em realizar a cirurgia bilateralmente, está embasada no resultado de um estudo de revisão sistemática realizado e publicado por nosso grupo de pesquisa (Terena et al.2017)<sup>(11)</sup>.

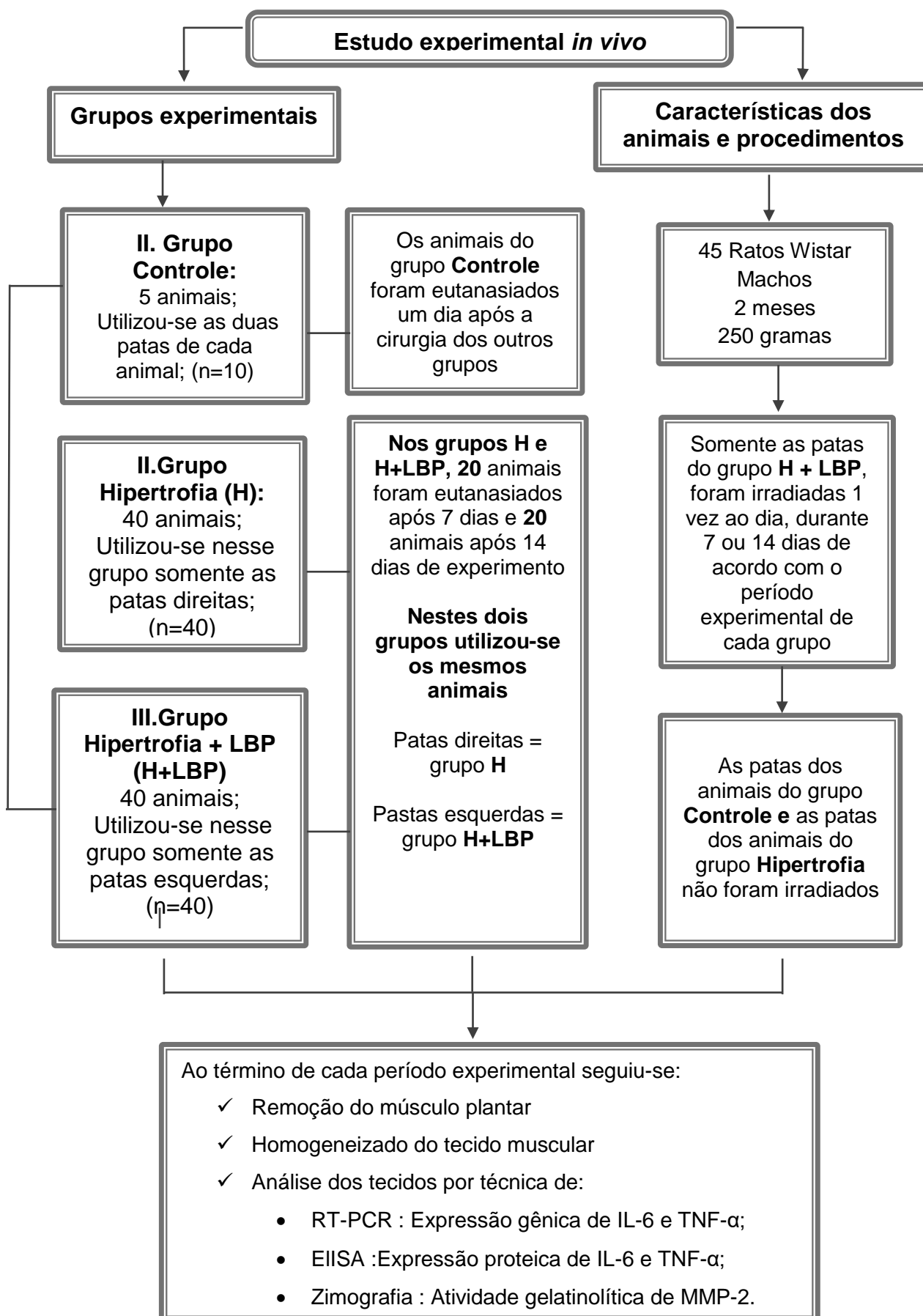
- I. **Grupo Controle:** Os animais não foram submetidos a nenhum procedimento cirúrgico nem a irradiação com LBP. Os animais foram eutanasiados 1 dia após a cirurgia dos outros grupos. Os dois músculos plantares direito e esquerdo de cada animal foram removidos (n=10/ 5 animais);
- II. **Grupo Hipertrofia (H):** Os animais foram submetidos à ablação dos músculos sinergistas do músculo plantar (patas direitas). Não foram irradiados com LBP

e foram eutanasiados após 7 e 14 dias, sendo 20 amostras retiradas após 7 dias de experimento e 20 amostras retiradas após 14 dias (n=40/ 40 animais);

**III. Grupo Hipertrofia + Laser de Baixa Potência (H+LBP):** Os animais foram submetidos à ablação dos sinergistas do músculo plantar e neste grupo foi realizada a irradiação com LBP na região do músculo plantar (patas esquerdas). Os animais foram eutanasiados após 7 e 14 dias, sendo 20 amostras retiradas após 7 dias e 20 amostras retiradas após 14 dias (n=40/ 40 animais).

Após a eutanásia as amostras musculares foram destinadas a análise dos mediadores inflamatórios IL-6 e TNF- $\alpha$  e para análise da atividade das MMP-2.

### 3.3. Fluxograma da metodologia do estudo

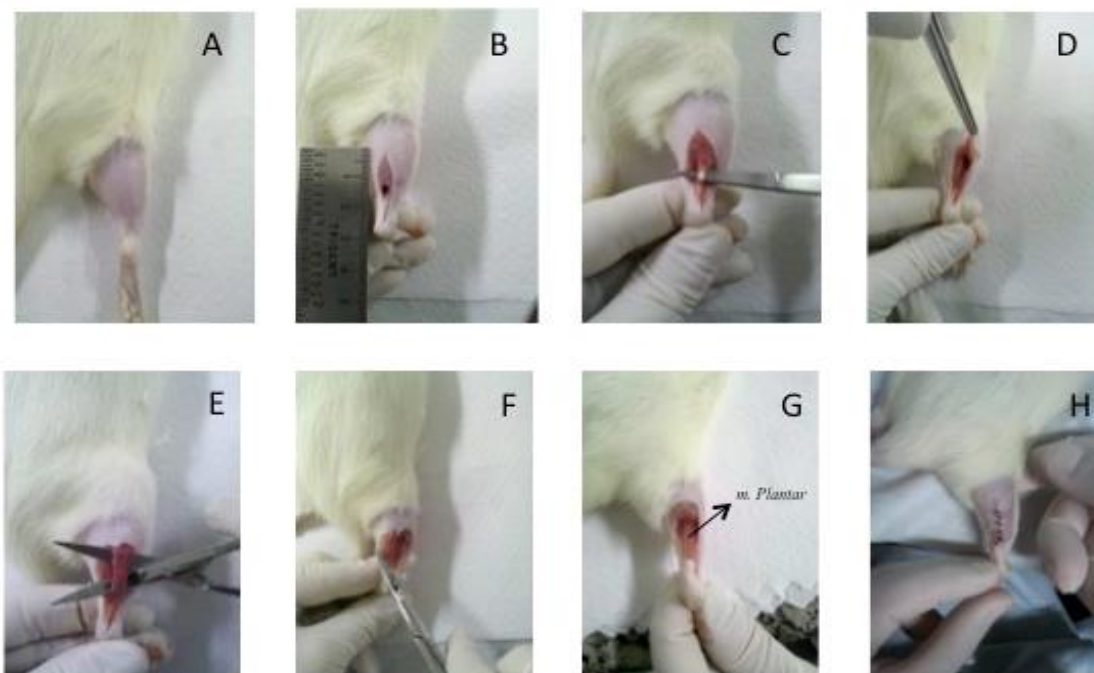


### 3.4. Procedimento cirúrgico

O modelo da hipertrofia utilizado, consiste na remoção cirúrgica dos músculos sinergistas do músculo plantar, bilateralmente, impondo uma sobrecarga de trabalho funcional sobre esse músculo. Esta técnica cirúrgica foi usada inicialmente por Gutmann & Schiaffino & Hnazlikova em 1971<sup>(59)</sup> e posteriormente utilizada por Terada et al. 2012<sup>(15)</sup>, Gordon et al. 2012<sup>(60)</sup>, também foi descrita e utilizada por Terena et al. 2017<sup>(11)</sup>.

Os animais foram pesados e anestesiados com injeção intraperitoneal a base de Ketamina 10% (0,2/100g do animal) e Xilazina 2% (0,1/100g do animal). Para aplicação da anestesia foram utilizadas seringas de modelo insulina. Em seguida foi realizada a tricotomia seguida da incisão longitudinal na região dorsal da pata traseira de  $\pm$  2cm e exposição do músculo gastrocnêmio. Esses tendões foram isolados e seccionados para permitir a remoção parcial do músculo. O mesmo procedimento foi realizado para o músculo sóleo, com cuidado para não causar lesões em nervos e vasos sanguíneos. O músculo plantar situado abaixo dos músculos removidos foi preservado e sofreu a sobrecarga funcional (figura 2).

Após o procedimento cirúrgico, foi realizada a sutura das áreas incisadas utilizando-se fio de poliamida e os animais foram mantidos em gaiolas.



**Figura 2:** Procedimento cirúrgico de ablação dos sinergistas para a hipertrofia do músculo plantar. **(A)** tricotomia da região posterior da pata traseira; **(B)** incisão de 2 cm; **(C)** exposição e secção do tendão do m. gastrocnêmio lateral; **(D)** retirada parcial

do ventre muscular do m. gastrocnêmio lateral; **(E)** m. sóleo – retirada total; **(F)** retirada parcial do ventre muscular do m. gastrocnêmio medial; **(G)** m. plantar já isolado; **(H)** realização de sutura. (Terena et al.2017).

### 3.5. Irradiação com Laser de Baixa Potência (LBP)

Imediatamente após a cirurgia, e em todos os dias do experimento ( 7 ou 14 dias) de acordo com o período experimental, os animais foram irradiados com LBP com os seguintes parâmetros: ( $\lambda = 780 \text{ nm}$ , com potência de saída de 40 mW e área do feixe de  $0,04 \text{ cm}^2$  (TwinLaser, MMOptics, São Carlos, Brasil), dose de  $10\text{J}/\text{cm}^2$  por ponto, por 10 segundos cada ponto, energia total: 3,2J), conforme descrito na literatura<sup>(4,49,51, 57)</sup>. A irradiação foi unilateral (pata esquerda)<sup>(11)</sup>,

O equipamento e os parâmetros da irradiação utilizados estão na Figura 3 e tabela 1.



**Figura 3:** Equipamento utilizado para irradiação (terena et al. 2017)

**Tabela 1:** Parâmetros programados durante a irradiação

Meio ativo	Arseneto de Gálio e Alumínio (AsGaAl)
Comprimento de onda	780 nm
Frequência do laser	Contínuo
Área do feixe	0,04 cm <sup>2</sup>
Potência média	40 mW
Densidade de potência	1 W/cm <sup>2</sup>
Densidade de energia	10 J/cm <sup>2</sup>
Energia por ponto	0.4 J
Total de pontos	8 pontos
Tempo por ponto	10 segundos
Tempo total	80 segundos
Energia total	3.2 J

Para o procedimento de irradiação os animais foram contidos manualmente, e a aplicação foi feita por técnica pontual, diretamente sobre a pele que recobre o músculo plantar, na região da incisão e ao redor da área, sendo oito pontos de irradiação<sup>(51,61)</sup>. Para evitar refração do feixe o laser foi aplicado em um ângulo de 90° entre o emissor e a pele do animal (Figura 4). A potência de emissão da luz do laser foi aferida utilizando o “Laser Check power meter” (MM Optics – São Carlos – SP – Brasil).



**Figura 4:** Procedimento de irradiação com LBP sobre a pele que recobre o músculo plantar. (8 pontos). (Terena et al. 2017)

### **3.6. Procedimento de eutanásia e coleta do material**

Após o período experimental de cada grupo (7 e 14 dias) os animais foram eutanasiados por overdose de anestésicos (2x a dose aplicada) na região intraperitoneal. Os músculos plantares foram retirados, pesados em balança de precisão e utilizados para as análises dos mediadores inflamatórios IL-6 e TNF- $\alpha$  utilizando-se Kits de Elisa e seguindo a orientação do fabricante (R&D Systems). Para análise da expressão gênica, foi extraído o RNA total do músculo plantar e obtido o cDNA para a realização do PCR em tempo real utilizando primer específico para cada gene. Os músculos também foram utilizados para a análise da atividade de MMP-2 por técnica de zimografia.

### **3.7. Análise da expressão proteica de TNF- $\alpha$ e IL-6 por ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)**

Os músculos plantares foram removidos e macerados em nitrogênio líquido, em seguida foram homogeneizados com tampão de extração RIPA e fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) 0.1 mM. O extrato tecidual foi centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos a 4 °C, e o sobrenadante armazenado a -80°C até o momento da análise. A quantificação de proteínas existentes nas amostras foi realizada em NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), com comprimento de onda de 260 e 280 nm. Os níveis de IL-6 e TNF- $\alpha$  no extrato do músculo plantar dos animais foram avaliadas através do ensaio imunoenzimático ELISA, seguindo recomendações do kit comercial (R&D System, Minneapolis, EUA).

### **3.8. PCR em tempo real: expressão gênica dos marcadores inflamatórios IL-6 e TNF- $\alpha$**

#### **3.8.1. Extração e controle de qualidade de RNA total**

Para este procedimento foi utilizado entre 80-100 mg do tecido muscular, macerado em nitrogênio líquido. O tecido foi homogeneizado em 1 mL do reagente Trizol (Invitrogen, São Paulo, Brasil), para iniciar o isolamento do RNA total, seguindo as orientações do fabricante. Após a lise celular, foi adicionado as amostras 300  $\mu$ L de clorofórmio gelado, incubado em temperatura ambiente por 3 minutos e centrifugadas a 10.200 rpm durante 15 minutos a 4°C, para separação das diferentes

frações (DNA, RNA e proteína) e a fase aquosa superior contendo o RNA total foi transferida para um novo microtubo. Em seguida, foi adicionado 750µL de álcool isopropílico gelado, incubado em temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugado a 10.200 rpm durante 10 minutos a 4°C, para precipitação do RNA total. O sobrenadante foi descartado e 1 mL de álcool 75% gelado foi adicionado no precipitado de RNA total e centrifugado a 8.400 rpm durante 05 minutos a 4°C, após essa etapa o álcool foi descartado e o RNA total ressuspenso em 20 µL água livre de RNase tratada com 0,01% de DEPC (Dimetil pirocarbonato). A concentração do RNA total e pureza foi determinada em NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) com comprimento de onda 260 e 280 nm, após as amostras foram armazenadas a -80°C. Para análise da integridade do RNA total, 1 µg de RNA foi analisado por meio de eletroforese em gel de agarose 1% não desnaturante, corado com brometo de etídeo.

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

O RNA total foi submetido à reação de transcrição reversa utilizando-se o High Capacity cDNA Reverse Transcriptions Kit (Applied Biosystems) para a obtenção do cDNA. Em um tubo de 0,5 ml foram adicionados 1 µg de RNA total, 1 µl de DNase I, 1 µl de 10X buffer DNase do DNase I amplification grade kit (Invitrogen) e água livre de RNase tratada com 0,01% de DEPC para obter um volume total de 10 µl. Os reagentes foram misturados apropriadamente e incubados em temperatura ambiente por 15 minutos e, em seguida, adicionado 1 µl de 25 mM de EDTA e aquecidas em termociclador (Termociclador Mastercycler Gradient, Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha) por 10 minutos a 65° para inibir atividade da DNase. O mix foi adicionado a cada tubo, misturando adequadamente e, depois, incubado em termociclador (Termociclador Mastercycler Gradient, Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha) por 10 minutos a 65°C para inibir a atividade de DNase. Então, foi preparado um mix para cada reação contendo 2 µl de 10X RT buffer, 0,8 µl de 25X dNTP Mix (100 mM), 2 µl de 10X RT Random Primers, 1 µl de RNase Out (Invitrogen), 1 µl de MultiScribe™ Reverse Transcriptase e água livre de RNase para obter volume final de 10 µl. O mix foi adicionado a cada tubo, misturando adequadamente e depois incubado em termociclador (Termociclador Mastercycler Gradient, Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha) e submetido a 25°C por 10 minutos seguidos de 120 minutos a 37°C e 85°C por 5 minutos.



### 3.8.3. PCR em tempo real quantitativo (qRT-PCR)

As reações de qRT-PCR, para análise dos níveis de expressão dos genes IL-6 e TNF- $\alpha$ , foram realizadas utilizando-se o termociclador 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems Carlsbad, CA, USA), fluoróforo SYBR® Green I (SYBR Green Master Mix®, Applied Biosystems) e primers específicos para os genes estudados. Para normalização dos dados foram utilizados primers para GAPDH.

**Tabela 2:** Sequência dos primers utilizados para análise da expressão dos níveis de mRNA nos diferentes grupos e períodos experimentais.

Genes		Primers
<b>GAPDH</b>	NM_017008.4	F: 5'-GCATCCTGGGCTACACTGA-3'
		R: 5'-CCACCACCCTGTTGCTGTA-3'
<b>IL-6</b>	NM_012589.2	F: 5'-TCCAGTTGCCTTCTTGGGAC-3'
		R: 5'-GTGTAATTAAGCCTCCGACTTG-3'
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	NM_012675.3	F: 5'-ACGTCGTAGCAAACCACCAA-3'
		R: 5'-GCAGCCTTGTCCCTTGAAGA-3'

Para a comparação dos dados entre os grupos, unidades arbitrárias foram calculadas da seguinte forma: Unidade Arbitrária =  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , sendo  $\Delta\Delta CT = \Delta CT_{amostra} - \Delta CT_{controle}$  (CT: —threshold cycle||).

### 3.9 Análise da atividade das metaloproteinases (MMP-2) por Zimografia

O extrato tecidual do músculo plantar foi testado quanto à presença de atividade proteolítica, conforme descrito por Cleutjens et al.(1995)<sup>(62)</sup>. As amostras musculares com aproximadamente 50 mg, foram homogeneizadas em 2 mL de tampão de extração (10 mM de ácido cacodílico, pH 5,0, 150 mM de NaCl, 1  $\mu$ M de ZnCl<sub>2</sub>, 20 mM de CaCl<sub>2</sub>, 1.5 mM de NaN<sub>3</sub>, e 0.01% de Triton X-100) com contínua homogeneização no gelo por um período de aproximadamente 5 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 µg 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 3 vezes durante 20 minutos em solução 2,5 % de Triton X-100 para remoção do SDS e incubado no tampão de substrato (50 mM de Tris-HCl, pH 8,0, 5 mM de CaCl<sub>2</sub>, 10 mM de ZnCl<sub>2</sub> e 0,02 % de NaN<sub>3</sub>), a 37°C, durante aproximadamente 20 horas. Após este tempo, o gel foi corado com Coomassie Blue por 30 minutos e descorado com ácido acético: metanol: água (1: 4: 5) para visualização da atividade das bandas líticas. O gel foi então escaneado e a quantificação das bandas de atividade proteolítica foi realizada utilizando o software Image J (NIH). Os valores foram convertidos em unidades arbitrárias considerando o Grupo Controle igual a um<sup>51</sup>.

### **3.10. Análise dos resultados**

Os valores foram testados quanto a sua normalidade pelo teste Kolmogorov-Smirnov e os dados foram expressos em média e erro padrão da média pois aderiram à curva de Gauss. A comparação entre os grupos foi realizada pela ANOVA. O Teste de contraste (Póst-Hoc) utilizado foi o Tukey. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes se  $p \leq 0,05$  e foram analisados por meio do programa GraphPad Prism 5.00 (California, EUA).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Artigo 1 (Em processo de submissão para revista Lasers In Medical Science)

**Avaliação da influência da fotobiomodulação sobre o remodelamento da matriz extracelular e expressão de citocinas inflamatórias durante o processo de hipertrofia compensatória**

Martinelli A S A<sup>1</sup>, Andreo L<sup>2</sup>, Alves AN<sup>2</sup>, Terena SML<sup>2</sup>, Bussadori SK<sup>1,2</sup>, Fernandes KPS<sup>2</sup>, Mesquita-Ferrari RA<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências da Reabilitação, UNINOVE, São Paulo, SP, Brasil

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde, Universidade Nove de Julho (UNINOVE), São Paulo, SP, Brasil

#### **Correspondência:**

Profa. Dra. Raquel Agnelli Mesquita-Ferrari

[raquel.mesquita@gmail.com](mailto:raquel.mesquita@gmail.com)

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Reabilitação;

Universidade Nove de Julho – UNINOVE

[www.uninove.br](http://www.uninove.br)

Rua Vergueiro, 349, CEP 01504001, São Paulo – SP, Brasil

Tel. +55 11 3385-9222

**Financiamentos:** Este trabalho teve apoio da UNINOVE e da seguinte agência de financiamento: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior ([www.capes.gov.br](http://www.capes.gov.br); número do processo: 1691777).

## RESUMO

A hipertrofia compensatória ocorre devido à sobrecarga mecânica do músculo promovendo aumento no tamanho da fibra muscular. A fotobiomodulação (FBM) tem demonstrado efeitos benéficos sobre o tecido muscular durante a hipertrofia compensatória. O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da FBM sobre os marcadores inflamatórios Interleucina-6 (IL-6) e Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- $\alpha$ ) e sobre a atividade das metaloproteinases do tipo 2 da matriz (MMP-2) durante o processo de hipertrofia por sobrecarga do músculo plantar de ratos. **Metodologia:** Foram utilizados 45 ratos wistar pesando 250 g, foram divididos em 3 grupos: grupo controle, grupo hipertrofia e grupo hipertrofia com irradiação. A hipertrofia foi induzida através do modelo de ablação dos sinergistas do músculo plantar. A irradiação foi realizada com laser AsGaAl ( $\lambda$  780 nm; 40mW; densidade de energia 10J/cm<sup>2</sup>; 10 segundos cada ponto, 8 pontos; 3,2J). Os grupos foram avaliados após 7 e 14 dias. Ao final do protocolo os músculos plantares foram removidos e encaminhados para análise dos marcadores inflamatórios por técnica de Elisa e por PCR em tempo real e a atividade das MMP-2 por técnica de zimografia. **Resultados:** A expressão proteica demonstrou um aumento os níveis de IL-6 no grupo hipertrofia +LBP (H+LBP) quando comparado ao grupo hipertrofia (H), verificou-se ainda uma redução no grupo H quando comparado ao grupo Controle e redução de TNF- $\alpha$  nos grupos H e H+LBP quando comparado ao grupo controle após 7 dias. A expressão gênica demonstrou um aumento de IL-6 no grupo H+LBP quando comparado ao grupo H após 14 dias e um aumento de TNF- $\alpha$  no grupo H+LBP quando comparado ao grupo H após 7 dias. Em relação atividade da MMP-2 houve aumento nos grupos H e H+LBP quando comparado ao grupo controle nos períodos experimentais após 7 e 14 dias. **Conclusão:** A FBM no processo de hipertrofia compensatória modulou a expressão das citocinas inflamatórias IL-6 e TNF- $\alpha$ , contudo não alterou de forma significativa a atividade da MMP-2, nos períodos avaliados embora tenha demonstrado uma tendência de elevação após 14 dias.

**Palavras-Chave:** Músculo esquelético, Hipertrofia, Terapia com luz de baixa intensidade, Citocinas, Fototerapia.

## ABSTRACT

Compensatory hypertrophy occurs due to mechanical overload of the muscle promoting increase in muscle fiber size. Photobiomodulation (PBMT) has demonstrated beneficial effects on muscle tissue during compensatory hypertrophy. The objective of this study was to evaluate the effects of PBMT on the inflammatory markers Interleukin-6 (IL-6) and Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- $\alpha$ ) and on the activity of matrix type 2 metalloproteinases (MMP-2) during the rat plantar muscle overload hypertrophy process. **Methods:** Wistar rats weighing 250 g, were divided into three groups: control group, hypertrophy group and irradiation hypertrophy group. Hypertrophy was induced through the ablation model of plantar muscle synergists. The irradiation was performed with AsGaAl laser ( $\lambda$  780 nm; 40mW; energy density 10J / cm<sup>2</sup>, 10 seconds each point, 8 points, 3,2J). The groups were evaluated after 7 and 14 days. At the end of the protocol, the plantar muscles were removed and sent for analysis of the inflammatory markers by Elisa and by real-time PCR technique and the activity of MMP-2 by zymography technique. **Results:** Protein expression increased IL-6 levels in the irradiation hypertrophy group (H + LBP) group when compared to the hypertrophy group (H), a reduction was observed in the group H when compared to the control group and reduction of TNF- $\alpha$  in the H and H + LBP groups when compared to the control group after 7 days. Gene expression demonstrated an increase of IL-6 in the H + LBP group when compared to the H group after 14 days and an increase of TNF- $\alpha$  in the H + LBP group when compared to the H group after 7 days. MMP-2 activity increased in the H and H + LBP groups when compared to the control group after 7 and 14 days. **Conclusion:** PBMT in the compensatory hypertrophy process modulated the expression of inflammatory cytokines IL-6 and TNF- $\alpha$ , but did not significantly alter the activity of MMP-2 in the evaluated periods although it showed a tendency to increase after 14 days.

**Key words:** Skeletal muscle, Hypertrophy, Low-intensity Light therapy, Cytokines, Phototherapy.

## INTRODUÇÃO

O músculo esquelético é um tecido que apresenta alta plasticidade, um exemplo dessa característica ocorre quando este tecido é exposto a uma sobrecarga mecânica aguda, apresentando um aumento na área transversal da fibra, esse tipo de adaptação é conhecido como hipertrofia muscular<sup>(4-7)</sup>.

O modelo de hipertrofia compensatória, consiste na ablação dos músculos sinergistas, direcionando assim um excesso de carga mecânica sobre um outro músculo que deverá se adaptar a essa sobrecarga <sup>(7,11,17)</sup>.

O processo de hipertrofia muscular, é influenciado e modulado por diversos mediadores inflamatórios, como por exemplo a interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ )<sup>(36)</sup>. Broholm C et al.(2008)<sup>(37)</sup>, relataram em seu estudo que o processo de contração muscular desempenha um papel de regulação das citocinas<sup>(38)</sup>, sendo a IL-6 é a primeira miocina que é liberada pela musculatura esquelética, em resposta à contração muscular<sup>(34,38,37)</sup>.

O TNF- $\alpha$  encontra-se presente em casos de inflamação aguda<sup>(40,41)</sup> e no tecido muscular, relaciona-se com situações de lesão tecidual<sup>(42,43)</sup>, pode contribuir para o processo de reparo muscular, através do influxos de células de defesa que realizarão a fagocitose do tecido danificado, melhorando assim as condições de reparo do músculo<sup>(32,44)</sup>. Contudo, seu aumento, associa-se também a efeitos deletérios às células, como ausência de proteção, diminuição do volume de massa muscular e apoptose celular<sup>(44)</sup>.

Um outro aspecto importante durante a HC é o remodelamento da matriz extracelular (MEC), seu adequado remodelamento pode promover uma melhor organização e deposição de colágeno, que por sua vez, pode associar-se a prevenção de lesões, tendinopatias e fibrose. Contudo os mecanismos pelos quais a MEC contribui com o processo de HC, não estão bem claros na literatura<sup>(63,64,65)</sup>. A MEC, é compreendida como uma estrutura dinâmica que confere suporte, proteção e estabilidade ao tecido muscular<sup>(47)</sup>. A degradação de seus componentes, ocorrem através de enzimas denominadas metaloproteinases da matriz (MMPs)<sup>(48,49)</sup>. As MMP-2 degradam e modulam a deposição do colágeno tipo IV, favorecendo uma melhor organização desse colágeno no tecido e contribuindo com a formação de novas fibras e com o remodelamento tecidual<sup>(51,52)</sup>.

O laser de baixa potência (LBP), tem sido utilizado como um recurso terapêutico

em alterações musculoesquelética, conforme já descrito na literatura<sup>(7,48,51)</sup>. O efeito da irradiação do LBP nos tecidos, ocorre através da absorção da luz, pelos fotorreceptores presentes nas células, estes podem modular as reações bioquímicas e fotoquímicas nas células, resultando na transferência de elétrons da cadeia respiratória, induzindo a síntese de adenosina trifosfato (ATP), esse processo é denominado como cadeia mitocondrial respiratória<sup>(55)</sup>.

Dentre os efeitos positivos do LBP no tecido muscular, encontram-se a modulação da resposta inflamatória, a síntese e produção de colágeno<sup>(49,51,56)</sup> e o remodelamento da MEC<sup>(51)</sup>, além de apresentar efeitos positivos sobre os fatores de crescimento<sup>(57)</sup> e sobre a angiogênese<sup>(55)</sup>. Mesquita-Ferrari et al (2011)<sup>(57)</sup> ao utilizar o LBP no tecido muscular, verificaram uma modulação na expressão das citocinas TNF- $\alpha$  após 1 e 7 dias e TGF- $\beta$  após 7 dias.

Com relação a HC no estudo de Terena et al. (2015)<sup>(7)</sup>, ao analisar o efeito do LBP 780nm sobre os aspectos morfológicos do músculo plantar durante o processo de HC, verificaram um aumento na AST das fibras musculares após 14 dias. Além disso, Terena et al. (2018)<sup>(4)</sup>, também observaram: aumento da AST, aumento no número de mionúcleos após 14 dias, aumento do colágeno no grupo irradiado após 7 dias e uma diminuição após 14 dias e melhor organização das fibras colágenas nos tendões após 7 dias.

Sabendo-se que o LBP apresenta efeitos fotobiomoduladores no músculo esquelético durante o processo de HC e sabendo-se da importância das citocinas e mediadores chave para esse processo, o objetivo do trabalho foi analisar a influência desse recurso sobre a modulação de IL-6 e TNF- $\alpha$ , assim como também sobre a atividade da MMP-2, durante o processo de HC, permitindo-nos assim melhorar o entendimento dos mecanismos do LBP sobre o tecido muscular quando exposto a uma situação de sobrecarga.

## MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Nove de Julho - UNINOVE (AN0013/2017) e os experimentos foram realizados em conformidade com as diretrizes do Conselho Nacional para o Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

### Animais

Foram utilizados 45 ratos Wistar, machos, com idade de 2 meses e peso médio de 250g, 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*.

### Grupos experimentais

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 3 grupos experimentais:

Exceto os animais do grupo I (Controle), os outros 40 animais fizeram parte tanto do grupo II (Hipertrofia), como do grupo III (Hipertrofia + LBP) respectivamente, pois a cirurgia foi realizada bilateralmente, possibilitando que um mesmo animal fizesse parte tanto do grupo II (pata direita sem irradiação), como do grupo III (pata esquerda com irradiação). A decisão em realizar a cirurgia bilateralmente está embasada no resultado de um estudo de revisão sistemática realizado e publicado por nosso grupo de pesquisa (Terena et al.2017)<sup>(11)</sup>.

- **I.Grupo Controle:** Os animais não foram submetidos a nenhum procedimento cirúrgico nem a irradiação com LBP. Os animais foram eutanasiados 1 dia após a cirurgia dos outros grupos. Os dois músculos plantar direito e esquerdo de cada animal foram removidos (n=10/ 5 animais);
- **II.Grupo Hipertrofia (H):** Os animais foram submetidos à ablação dos músculos sinergistas do músculo plantar (patas direitas). Não foram irradiados com LBP e foram eutanasiados após 7 e 14 dias, sendo 20 amostras retiradas



após 7 dias de experimento e 20 amostras retiradas após 14 dias (n=40/ 40 animais);

- **III. Grupo Hipertrofia + Laser de Baixa Potência (H+LBP):** Os animais foram submetidos à ablação dos sinergistas e neste grupo foi realizada a irradiação com LBP na região do músculo plantar (patas esquerdas). Os animais foram eutanasiados após 7 e 14 dias, sendo 20 amostras retiradas após 7 dias de experimento e 20 amostras retiradas após 14 dias (n=40/ 40 animais).

Após a eutanásia as amostras musculares foram destinadas a análise dos mediadores inflamatórios IL-6 e TNF- $\alpha$  e para análise da atividade das MMP-2.

### **Procedimento cirúrgico**

O modelo da hipertrofia, consiste na remoção cirúrgica dos músculos sinergistas do músculo plantar, bilateralmente, impondo uma sobrecarga de trabalho funcional sobre esse músculo. Esta técnica cirúrgica foi usada inicialmente por Gutmann & Schiaffino & Hnazlikova em 1971<sup>(59)</sup> e posteriormente utilizada por Terada et al. 2012<sup>(15)</sup>, Gordon et al. 2012<sup>(60)</sup>, também foi descrita e utilizada por Terena et al, 2017<sup>(11)</sup>.

Os animais foram pesados e anestesiados com injeção intraperitoneal a base de Ketamina 10% (0,2/100g do animal) e Xilazina 2% (0,1/100g do animal). Para aplicação da anestesia foram utilizadas seringas de modelo insulina. Em seguida, foi realizada a tricotomia seguida da incisão longitudinal na região dorsal da pata traseira de  $\pm$  2cm e exposição do músculo gastrocnêmio. Esses tendões foram isolados e seccionados para permitir a remoção parcial do músculo. O mesmo procedimento foi realizado para o músculo sóleo, com cuidado para não causar lesões em nervos e vasos sanguíneos. O músculo plantar situado abaixo dos músculos removidos foi preservado e sofreu a sobrecarga funcional. Após o procedimento cirúrgico, foi realizada a sutura das áreas incisadas utilizando-se fio de poliamida e os animais foram mantidos em gaiolas.

### **Irradiação com Laser de Baixa Potência (LBP)**

Imediatamente após a cirurgia, e em todos os dias do experimento (7 ou 14 dias) de acordo com o período experimental, os animais foram irradiados com LBP com os seguintes parâmetros: ( $\lambda = 780$  nm, com potência de saída de 40 mW e área do feixe de  $0,04 \text{ cm}^2$  (TwinLaser, MMOptics, São Carlos, Brasil), dose de  $10 \text{ J/cm}^2$  por ponto, por 10 segundos cada ponto. energia total: 3,2J), conforme descrito na literatura<sup>(4,49,51,57)</sup>. A irradiação foi unilateral (pata esquerda)<sup>(11)</sup>. Os parâmetros utilizados para irradiação estão descritos na tabela 1.

**Tabela 1:** Parâmetros programados durante a irradiação

<b>Meio ativo</b>	<b>Arseneto de Gálio e Alumínio (AsGaAl)</b>
<b>Comprimento de onda</b>	780 nm
<b>Frequência do laser</b>	Contínuo
<b>Área do feixe</b>	0,04 cm <sup>2</sup>
<b>Potência média</b>	40 mW
<b>Densidade de potência</b>	1 W/cm <sup>2</sup>
<b>Densidade de energia</b>	10 J/cm <sup>2</sup>
<b>Energia por ponto</b>	0.4 J
<b>Total de pontos</b>	8 pontos
<b>Tempo por ponto</b>	10 segundos
<b>Tempo total</b>	80 segundos
<b>Energia total</b>	3.2 J

Para o procedimento de irradiação, os animais foram contidos manualmente, e a aplicação foi feita por técnica pontual, diretamente sobre a pele que recobre o músculo plantar na região da incisão e ao redor da área, sendo oito pontos de irradiação<sup>(51,61)</sup>. Para evitar refração do feixe o laser foi aplicado em um ângulo de  $90^\circ$  entre o emissor e a pele do animal. A potência de emissão da luz do laser foi aferida utilizando o “Laser Check power meter” (MM Optics – São Carlos – SP – Brasil).

### **Procedimento de eutanásia e coleta do material**

Após o período experimental de cada grupo (7 e 14 dias) os animais foram eutanasiados por overdose de anestésicos (2x a dose aplicada), em região intraperitoneal. Os músculos plantares foram retirados, pesados em balança de precisão e utilizados para as análises dos mediadores inflamatórios IL-6 e TNF- $\alpha$  utilizando-se Kits de Elisa e seguindo a orientação do fabricante (R&D Systems). Para análise da expressão gênica, foi extraído o RNA total do músculo plantar e obtido o cDNA para a realização do PCR em tempo real utilizando primer específico para cada gene. Os músculos também foram utilizados para a análise da atividade de MMP-2 por técnica de zimografia.

### **Análise da expressão proteica de TNF- $\alpha$ e IL-6 por ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)**

Os músculos plantares foram removidos e macerados em nitrogênio líquido, em seguida foram homogeneizados com tampão de extração RIPA e fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) 0.1 mM. O extrato tecidual foi centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos a 4 °C, e o sobrenadante armazenado a -80°C até o momento da análise. A quantificação de proteínas existentes nas amostras foi realizada em NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), com comprimento de onda de 260 e 280 nm. Os níveis de IL-6 e TNF- $\alpha$  no extrato do músculo plantar dos animais foram avaliadas através do ensaio imunoenzimático ELISA, seguindo recomendações do kit comercial (R&D System, Minneapolis, EUA).

### **PCR em tempo real quantitativo (qRT - PCR)**

Para este procedimento foi utilizado entre 80-100 mg do tecido muscular, macerado em nitrogênio líquido. Em seguida, o tecido foi homogeneizado em 1 mL do reagente TRIzol (Invitrogen, São Paulo, Brasil), para iniciar o isolamento do RNA total, seguindo as orientações do fabricante. Após a lise celular, foi adicionado as amostras 300  $\mu$ L de clorofórmio gelado, incubado em temperatura ambiente por 3 minutos e centrifugadas a 10.200 rpm durante 15 minutos a 4°C, para separação das diferentes frações (DNA, RNA e proteína) e a fase aquosa superior contendo o RNA total foi transferida para um novo microtubo. Em seguida, foi adicionado 750 $\mu$ L de álcool isopropílico gelado, incubado em temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugado

a 10.200 rpm durante 10 minutos a 4°C, para precipitação do RNA total. O sobrenadante foi descartado e 1 mL de álcool 75% gelado foi adicionado no precipitado de RNA total e centrifugado a 8.400 rpm durante 05 minutos a 4°C, após essa etapa o álcool foi descartado e o RNA total ressuspenso em 20 µL água livre de RNase tratada com 0,01% de DEPC (Dimetil pirocarbonato). A concentração do RNA total e pureza foi determinada em NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) com comprimento de onda 260 e 280 nm, após as amostras foram armazenadas a -80°C. Para análise da integridade do RNA total, um µg de RNA foi analisado por meio de eletroforese em gel de agarose 1% não desnaturante corado com brometo de etídeo.

O RNA total foi submetido à reação de transcrição reversa utilizando-se o High Capacity cDNA Reverse Transcriptions Kit (Applied Biosystems) para a obtenção do cDNA. Em um tubo de 0,5 ml foram adicionados 1 µg de RNA total, 1 µl de DNase I, 1 µl de 10X buffer DNase do DNase I amplification grade kit (Invitrogen) e água livre de RNase tratada com 0,01% de DEPC para obter um volume total de 10 µl. Os reagentes foram misturados apropriadamente e incubados em temperatura ambiente por 15 minutos e, em seguida, adicionado 1 µl de 25 mM de EDTA e aquecidas em termociclador (Termociclador Mastercycler Gradient, Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha) por 10 minutos a 65° para inibir atividade da DNase. O mix foi adicionado a cada tubo, misturando adequadamente e, depois, incubado em termociclador (Termociclador Mastercycler Gradient, Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha) por 10 minutos a 65°C para inibir a atividade de DNase. Então, foi preparado um mix para cada reação contendo 2 µl de 10X RT buffer, 0,8 µl de 25X dNTP Mix (100 mM), 2 µl de 10X RT Random Primers, 1 µl de RNase Out (Invitrogen), 1 µl de MultiScribe™ Reverse Transcriptase e água livre de RNase para obter volume final de 10 µl. O mix foi adicionado a cada tubo, misturando adequadamente e depois incubado em termociclador (Termociclador Mastercycler Gradient, Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha) e submetido a 25°C por 10 minutos seguidos de 120 minutos a 37°C e 85°C por 5 minutos.

As reações de qRT-PCR, para análise dos níveis de expressão dos genes IL-6 e TNF-α, foram realizadas utilizando-se o termociclador 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems Carlsbad, CA, USA), fluoróforo SYBR® Green I (SYBR Green Master Mix®, Applied Biosystems) e primers específicos para os genes estudados. Para normalização dos dados foram utilizados primers para GAPDH.

**Tabela 2:** Sequência dos primers utilizados para análise da expressão dos níveis de mRNA nos diferentes grupos e períodos experimentais.

Genes		Primers
<b>GAPDH</b>	NM_017008.4	F: 5'-GCATCCTGGGCTACACTGA-3'
		R: 5'-CCACCACCCTGTTGCTGTA-3'
<b>IL-6</b>	NM_012589.2	F: 5'-TCCAGTTGCCTTCTTGGGAC-3'
		R: 5'-GTGTAATTAAGCCTCCGACTTG-3'
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	NM_012675.3	F: 5'-ACGTCGTAGCAAACCACCAA-3'
		R: 5'-GCAGCCTTGTCCCTTGAAGA-3'

Para a comparação dos dados entre os grupos, unidades arbitrárias foram calculadas da seguinte forma: Unidade Arbitrária=  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , sendo  $\Delta\Delta CT = \Delta CT_{amostra} - \Delta CT_{controle}$  (CT: —threshold cyclell).

### **Análise da atividade das metaloproteinases (MMP-2) por Zimografia**

O extrato tecidual do músculo plantar foi testado quanto à presença de atividade proteolítica, conforme descrito por Cleutjens et al (1995)<sup>(62)</sup>. As amostras musculares de aproximadamente 50 mg, 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<sub>2</sub>, 20 mM de CaCl<sub>2</sub>, 1.5 mM de NaN<sub>3</sub>, e 0.01% de Triton X-100) com contínua homogeneização no gelo por um período de aproximadamente 5 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 3 vezes durante 20 minutos em solução 2,5 % de Triton X-100 para remoção do SDS e incubado no tampão de substrato (50 mM de Tris-HCl, pH 8,0, 5 mM de CaCl<sub>2</sub>, 10 mM de ZnCl<sub>2</sub> e 0,02 % de NaN<sub>3</sub>), a 37°C, durante aproximadamente 20 horas. Após este tempo, o gel foi corado

com Coomassie Blue por 30 minutos e descorado com ácido acético: metanol: água (1: 4: 5) para visualização da atividade das bandas líticas. O gel foi então escaneado e a quantificação das bandas de atividade proteolítica foi realizada utilizando o software Image J (NIH). Os valores foram convertidos em unidades arbitrárias considerando o Grupo Controle igual a um<sup>(51)</sup>.

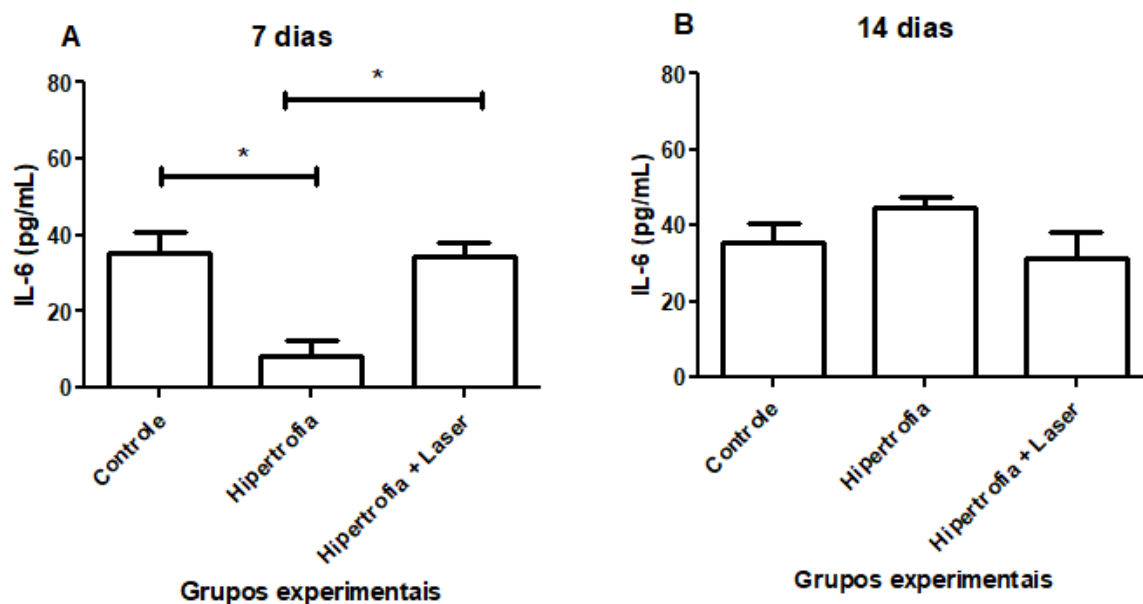
### **Análise dos resultados**

Os valores foram testados quanto a sua normalidade pelo teste Kolmogorov-Smirnov e os dados foram expressos em média e erro padrão da média pois aderiram à curva de Gauss. A comparação entre os grupos foi realizada pela ANOVA. O Teste de contraste (Pós-Hoc) utilizado foi o Tukey. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes se  $p \leq 0,05$  e foram analisados por meio do programa GraphPad Prism 5.00 (California, EUA).

## **RESULTADOS**

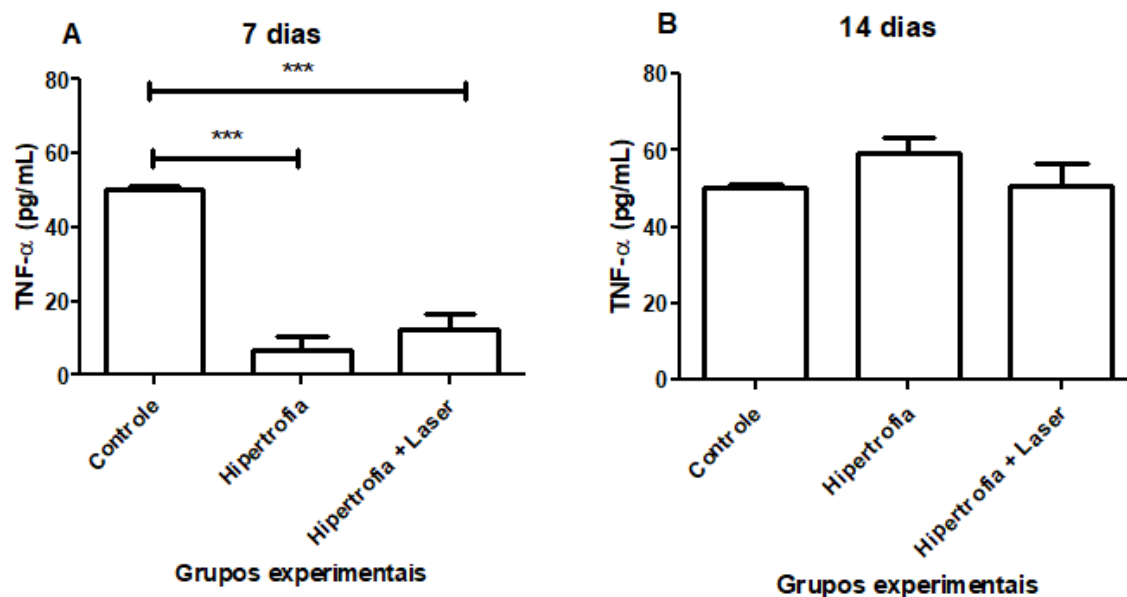
### **Expressão proteica de IL-6 e TNF- $\alpha$ por ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)**

Os resultados da expressão proteica por ELISA de IL-6 demonstraram que houve aumento nos níveis de IL-6 no grupo **H + LBP**, quando comparado ao grupo somente **H** e diminuição no grupo **H** quando comparado ao grupo **Controle**, não houve diferença entre o grupo **Controle** e o grupo **H + LBP** após 7 dias. Não houve diferença estatística entre os grupos experimentais após 14 dias (figura 5).



**Figura 5.** Expressão proteica dos níveis de IL-6 nos diferentes grupos, no período experimental de 7 (**A**) e 14 dias (**B**). Dados apresentados em média e erro-padrão da média. (ANOVA/ Tukey) \* $p < 0,05$  vs controle; \* $p < 0,05$  vs hipertrofia.

O resultado da expressão proteica por Elisa de TNF- $\alpha$  após 7 dias, demonstraram que houve redução nos níveis de TNF- $\alpha$  nos grupos hipertrofia **H** e **H + LBP**, quando comparado ao grupo **Controle**. Não houve diferença na expressão proteica entre os grupos **H** e grupo **H + LBP** no período de 7 dias. Após 14 dias não foram encontradas diferenças estatísticas significantes entre os diferentes grupos experimentais (figura 6).

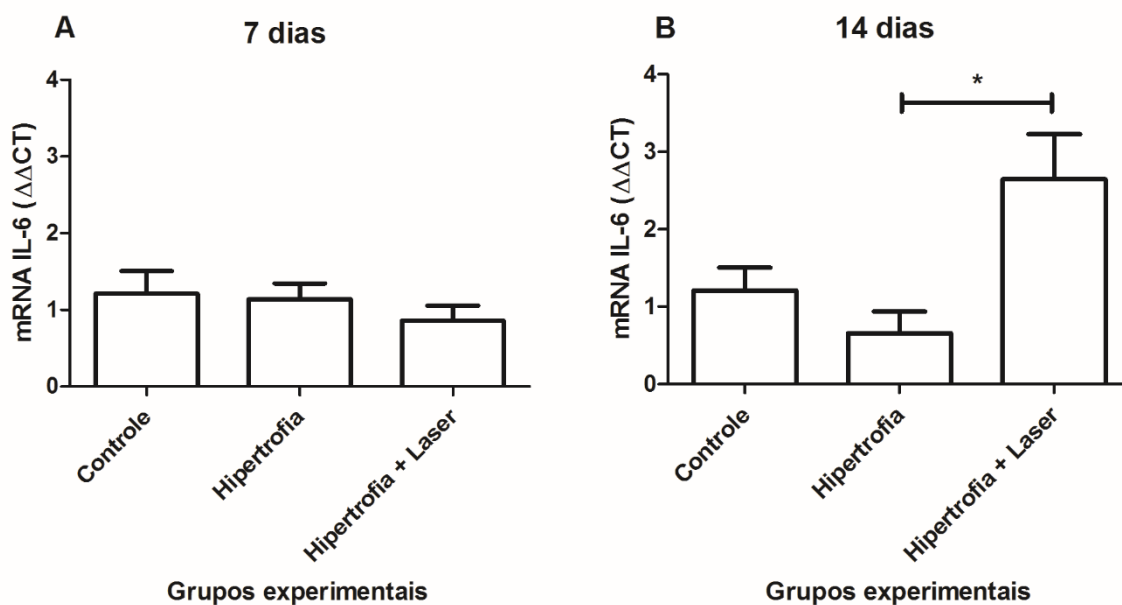


**Figura 6.** Expressão proteica dos níveis de TNF- $\alpha$  nos diferentes grupos e período experimental de 7 (**A**) e 14 dias (**B**). Dados apresentados em média e erro-padrão da média. (ANOVA/ Tukey) \*\*\* $p < 0,001$  vs controle.

### Expressão gênica de IL-6 por PCR em tempo real

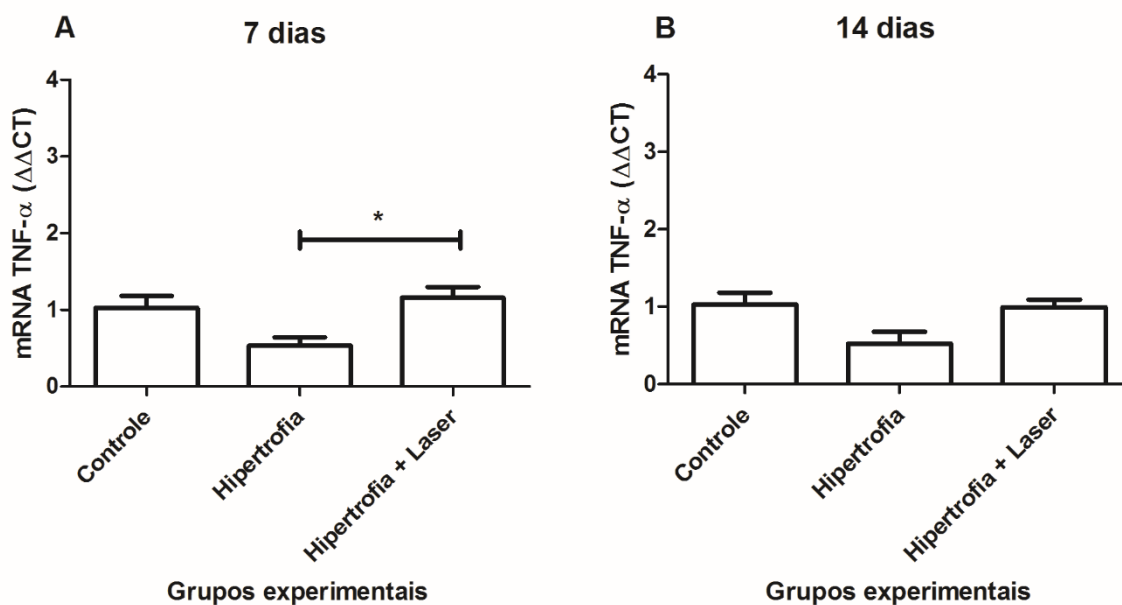
O resultado da expressão gênica de IL-6 demonstrou que não houve diferença estatística significativa dessa citocina após 7 dias entre os diferentes grupos experimentais. Já no período de 14 dias verificou-se um aumento de IL-6 no grupo **H + LBP** quando comparado ao grupo **H**. Não houve diferença entre os grupos **Controle** e grupo **H**, nem entre os grupos controle e **H + LBP** após 14 dias (Figura 7).





**Figura 7.** Expressão dos níveis de mRNA de IL-6 nos diferentes grupos e períodos experimentais de 7 (**A**) e 14 dias (**B**). Dados apresentados em média e erro-padrão da média. (ANOVA/ Tukey). \* $p < 0,05$  vs hipertrofia.

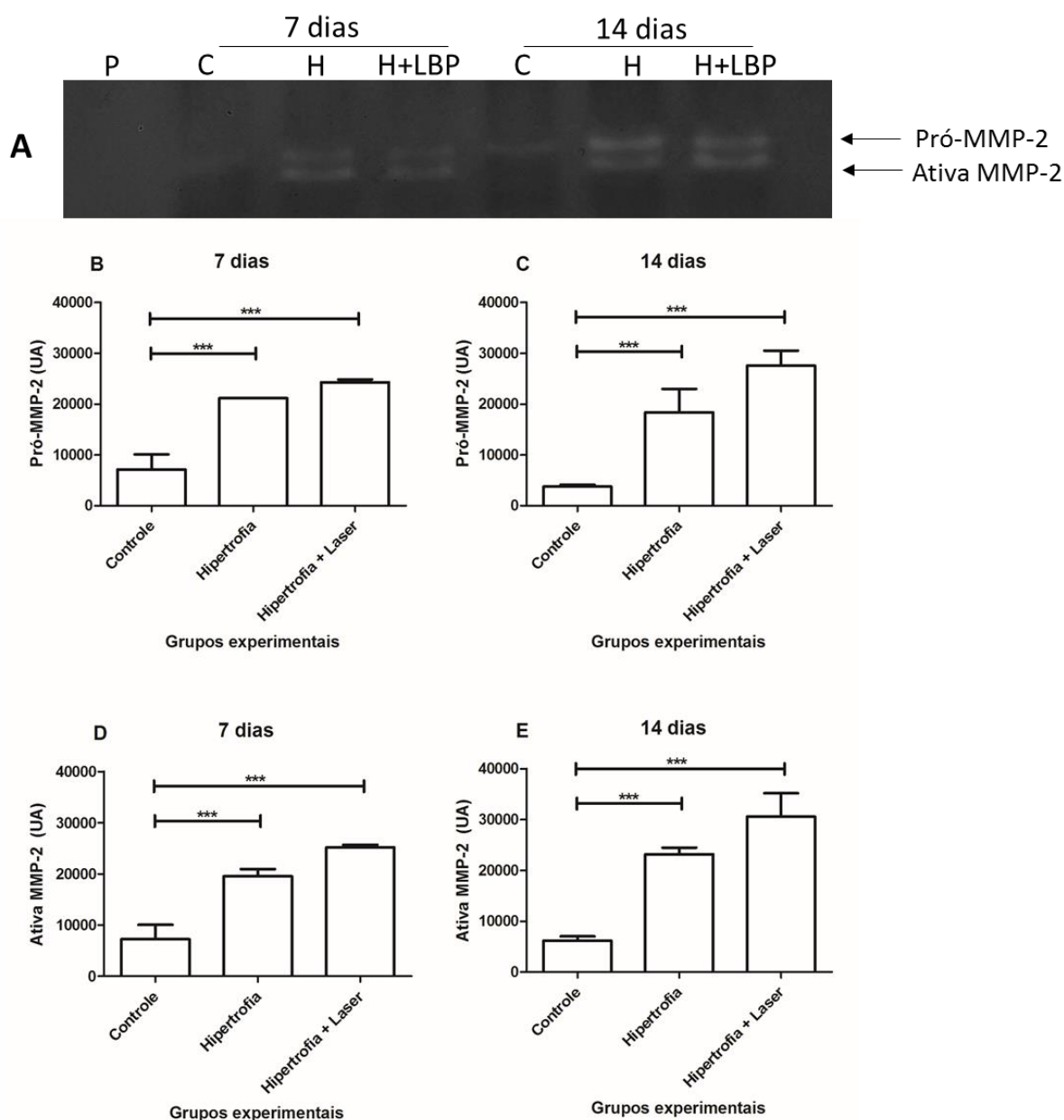
Os resultados da expressão gênica da citocina TNF- $\alpha$  demonstraram que houve um aumento na expressão de TNF- $\alpha$  no grupo **H + LBP**, quando comparado ao grupo **H** após 7 dias. Não houve diferença entre os grupos **Controle** e **H**, nem entre os grupos **Controle** e **H + LBP** no período de 7 dias. Não houve diferença estatística significantes após 14 dias em nenhum dos grupos experimentais. (Figura 8).



**Figura 8:** Expressão proteica dos níveis de TNF- $\alpha$  nos diferentes grupos e período experimental de 7 (**A**) e 14 (**B**) dias. Dados apresentados em média e erro-padrão da média. (ANOVA/ Tukey). \* $p < 0,05$  vs hipertrofia.

### Análise da atividade da MMP-2

Foram detectadas por técnica de zimografia duas bandas líticas correspondentes as formas pró (72 kDa) e ativa (64 kDa) da MMP-2 nas amostras musculares analisadas. Os resultados analisados permitiram verificar que houve um aumento na atividade da MMP-2 nos grupos **H** e **H + LBP** quando comparado ao grupo **Controle** após 7 e 14 dias e uma tendência ao aumento de atividade da MMP-2 no grupo **H + LBP** quando comparado ao grupo **H** após 14 dias, ainda que não tenha sido possível verificar uma diferença estatística significante entre os grupos **H** e **H + LBP** (figura 9).



**Figura 9:** Detecção da atividade gelatinolítica da MMP-2 em amostras musculares (100ug), dos diferentes grupos experimentais analisados, utilizando Zimografia. **(A):** Detecção das bandas referentes às formas Pró e Ativa da MMP-2 (72 e 64 kDa, respectivamente) nos diferentes grupos experimentais. **Padrão de peso molecular (P), grupo controle (C), grupo hipertrofia (H), grupo hipertrofia + laser (H + LBP)** nos diferentes grupos e período experimental de 7 e 14 dias. Em **(B,C,D e E):** quantificação das bandas líticas por densitometria após 7 e 14 dias. Dados apresentados em média e erro-padrão da média. (ANOVA/ Tukey) \*\*\* $p < 0,001$  vs controle.

## 5. DISCUSSÃO

O músculo esquelético é um tecido que apresenta grande capacidade adaptativa (plasticidade)<sup>(5,66)</sup>, sendo capaz de alterar suas características para atender sua demanda funcional, essa adaptação ocorre tanto nas estruturas contráteis como também no tecido conjuntivo sempre que algum tipo de sobrecarga funcional é imposta a este tecido<sup>(4)</sup>.

Neste estudo a forma escolhida para gerar uma sobrecarga funcional e consequente hipertrofia do músculo plantar, foi o modelo de ablação dos músculos sinergistas do músculo plantar<sup>(7)</sup>. Dessa forma, o músculo plantar sofreu uma sobrecarga funcional demasiada, levando-o a mudanças morfológicas com características hipertrófica, o que nos permitiu avaliar como e quais seriam essas mudanças em um curto espaço de tempo. A escolha do músculo plantar está embasada na literatura e a justificativa dos autores para sua escolha se dá pela diversidade dos tipos de fibras presente nesse músculo (Tipo I:  $8 \pm 2\%$ ; Tipo IIA:  $19 \pm 3\%$ ; Tipo IIB/D:  $74 \pm 4\%$ ), que lhe conferem diferentes respostas adaptativas<sup>(11)</sup>.

O uso de LBP é relatado na literatura e tem sido cada vez mais utilizado como recurso terapêutico sobre diversas condições a que o tecido muscular pode ser exposto. Estudos relatam efeitos positivos do LBP na modulação da resposta inflamatória, no aumento neoangiogenese e no remodelamento da MEC em situações de lesões musculares<sup>(49,51,56)</sup>. No que se diz respeito a hipertrofia compensatória, ainda há pouco descrito na literatura, contudo os achados na literatura referente a hipertrofia muscular por sobrecarga, sugerem que o LBP pode modular positivamente esse processo, demonstrando alterações importantes na morfologia do tecido muscular, como o aumento na quantidade de mionucleos, aumento da AST e redução da área de colágeno<sup>(4,7,56)</sup>.

Neste estudo ao utilizar a irradiação infravermelha (780nm) sobre o músculo plantar, observou-se um aumento na expressão proteica da citocina IL-6 após 7 dias e uma diminuição da citocina TNF- $\alpha$  também após 7 dias. No período experimental de 14 dias não observou-se alterações significantes na expressão proteica de IL-6 ou de TNF- $\alpha$ . Os resultados da expressão gênica da citocina IL-6, demonstraram que a irradiação com LBP infravermelho não promoveu o aumento de IL-6 após 7 dias, já em relação ao TNF- $\alpha$  verificou-se um aumento na expressão de mRNA após 7 dias

de irradiação. No período experimental de 14 dias houve um aumento na expressão gênica de IL-6 no grupo irradiado, em relação ao TNF- $\alpha$  não observou-se alteração no mRNA após 14 dias de irradiação.

No que se diz respeito a citocina IL-6, a literatura é bem clara ao demonstrar sua importante participação para o aumento de massa muscular e regulação da hipertrofia muscular, segundo Song Gau et al. (2017)<sup>(67)</sup>, tanto a contração como a sobrecarga muscular, podem aumentar a concentração de IL-6 no tecido muscular, desempenhando assim uma função de regulação tanto do aumento de massa quanto na atrofia muscular. Em um estudo realizado por nosso grupo de pesquisa, Alves et al. (2016)<sup>(68)</sup>, após induzir uma lesão muscular em ratos, também verificaram um aumento no mRNA de IL-6 após 14 dias de irradiação utilizando os mesmos parâmetros desse estudo. Os relatos desse estudo demonstram que o aumento de IL-6, pode sugerir uma contribuição dessa citocina para diferenciação dos mioblastos, esses relatos podem explicar os dados obtidos no presente estudo, assim como os achados presente na literatura no que diz respeito a IL-6. No estudo de Serrano et al. (2008)<sup>(39)</sup>, ao induzir a hipertrofia compensatória no músculo plantar de camundongos, porém sem irradiação com LBP, verificou-se uma indução da elevação de IL-6 após 1, 3 e 14 dias de sobrecarga e uma diminuição após esse período. Estes resultados estão em concordância com os achados no presente estudo em que também evidenciou-se o aumento na expressão proteica de IL-6 após a irradiação com laser no período de 7 dias e um aumento na expressão de mRNA de IL-6 após 14 dias de HC associada a irradiação com LBP, demonstrando assim a importância e participação desta citocina para a manutenção e aumento da massa muscular, uma vez que essa citocina, participa do processo de proliferação e fusão das células musculares precursoras também chamadas de células satélites. Shiffino et al. (2013)<sup>(20)</sup>, relataram que a IL-6 desempenha um importante papel na fusão de mioblastos, promovendo assim o crescimento muscular durante a fase de diferenciação celular, isso porque a IL-6 é capaz de atuar sobre os mioblastos favorecendo sua proliferação e fusão a outras fibras musculares. A IL-6 pode ser liberada no músculo esquelético em resposta a algum tipo de sobrecarga ou estímulo advindo de um exercício, ativando assim as células satélites. Estas, são células indiferenciadas presente entre o sarcolema e lâmina basal da fibra muscular, quando ativadas as células satélites podem entrar em processo de proliferação, diferenciação

e fusão ou formação de novas fibras musculares contribuindo assim com o processo de hipertrofia do músculo esquelético<sup>(69)</sup>.

Outro resultado evidenciado nesse estudo foi a diminuição na expressão proteica de TNF- $\alpha$  após 7 dias de irradiação. Diversos estudos atribuem a essa citocina uma característica pró-inflamatória, e no tecido muscular sua expressão pode associar-se com a ausência de proteção do tecido, diminuição do volume de massa muscular e apoptose celular<sup>(44)</sup>. Estudos utilizando o LBP durante o processo de reparo das lesões teciduais do músculo esquelético de ratos, demonstraram significantes reduções do TNF- $\alpha$  associado a melhora do processo de reparo tecidual<sup>(57)</sup>. No estudo de Leal Junior et al. (2014)<sup>(70)</sup>, ao aplicar o LBP com comprimento de onda de (904nm; densidade da potência 75mW/cm<sup>2</sup>; potência de saída de 15mW; energia total de 1,0J; tempo de 67 segundos) em camundongos mdx em um modelo de distrofia muscular, que promove intensa perda de massa muscular, verificaram que o LBP foi capaz de diminuir a expressão gênica de TNF- $\alpha$  após 14 semanas de irradiações com 5 irradiações por semana, sugerindo que o LBP pode apresentar efeitos protetores sobre o tecido muscular no que se diz respeito a perda de massa muscular. Contudo, no presente estudo os resultados da expressão de mRNA de TNF- $\alpha$  após 7 dias, apontou um aumento dessa citocina. Tidball et al. (2010)<sup>(5)</sup>, relatam em seu estudo que os níveis de TNF- $\alpha$  pode permanecer elevado após 14 dias em uma situação de dano muscular e necessidade de regeneração, sugerindo sua participação no processo regenerativo tecidual através da modulação da diferenciação e da proliferação das células musculares. No processo de HC também ocorre dano tecidual agudo, devido a ablação dos músculos sinergistas e a sobrecarga imposta sobre o músculo plantar, proporcionando danos as fibras musculares, o que poderia justificar o aumento de TNF- $\alpha$  encontrado no presente estudo após 7 dias de irradiação com LBP. Além disso, os macrófagos e neutrófilos também expressam TNF- $\alpha$ , induzindo assim o aumento de IL-6 pela ativação do (NF-KB) e tanto o TNF- $\alpha$  como a IL-6, possuem a capacidade de direcionar as células satélites até a área de lesão, promovendo a diferenciação dos mioblastos. Portanto o aumento encontrado na citocina TNF- $\alpha$  após 7 dias podem associar-se a esses aspectos.

No que se diz respeito ao remodelamento da MEC, por intermédio da MMP-2, os resultados desse estudo, demonstraram que após irradiação no período de 14 dias houve uma tendência ao aumento da atividade da MMP-2 no grupo H + LPB quando comparado ao grupo H e um aumento nos grupos H e H+LBP, quando comparados

ao grupo Controle. Esses resultados vão de encontro ao estudo de Ribeiro et al. (2015)<sup>(49)</sup>, que ao utilizar a irradiação com LBP ( $\lambda$  780nm), densidade de energia 10J/cm<sup>2</sup>, potência de 40mW e 3,2J/cm<sup>2</sup> no músculo tibial anterior de ratos previamente a lesão muscular, observaram um aumento da atividade da MMP-2 após 7 dias de irradiação associado a diminuição da área de colágeno. Em um outro estudo, Alves et al. (2014)<sup>(51)</sup>, ao aplicar o LBP ( $\lambda$  780nm), densidade de energia 10J/cm<sup>2</sup>, potência de 40mW e 3,2J/cm<sup>2</sup> de energia total, após o procedimento de criolesão também no músculo tibial anterior da ratos, verificaram um aumento na ação das MMP-2 após 7 dias de irradiação. Já o estudo de Terena et al. (2018)<sup>(4)</sup>, relata que a irradiação com LBP ( $\lambda$  780nm), densidade de energia 10J/cm<sup>2</sup>, potência de 40mW e 3,2J/cm<sup>2</sup> de energia total, foi capaz de diminuir a quantidade de colágeno da MEC 14 dias após indução de hipertrofia compensatória, demonstrando a eficácia do LBP sobre o músculo esquelético também durante a sobrecarga muscular. Esses achados podem associar-se ao resultado encontrado no presente estudo em relação a tendência ao aumento da atividade da MMP-2 após 14 dias, uma vez que estas enzimas são responsáveis por degradar o excesso de colágeno da MEC e conseqüentemente, diminuir o risco de fibrose no tecido muscular, além de promover uma melhor condição de reparo do tecido, sendo estes, aspectos importantes diante de um processo de hipertrofia muscular<sup>(51)</sup>.

Em um outro estudo realizado por nosso grupo de pesquisa Terena et al. (2015)<sup>(7)</sup>, ao aplicar o LBP com os mesmos parâmetros utilizados nesse estudo em músculo plantar de ratos submetidos a hipertrofia compensatória, verificaram um aumento no peso do músculo plantar após 14 dias de irradiações diárias, verificaram ainda um aumento na AST durante o mesmo período do experimento. Contudo, no estudo referido não foram analisados fatores e citocinas de crescimento envolvidos nesse processo.

Assis et al. (2015)<sup>(71)</sup>, ao realizar exercícios de treinamento de resistência em ratos, 5 vezes por semana, durante 8 semanas, realizando irradiações após o treinamento, utilizando comprimento de onda de (808 nm, 30mW, 5,6 J de energia total, por 47 segundos), verificaram um aumento na AST do músculo sóleo e do músculo tibial anterior, quando compararam os grupos irradiados aos grupos não irradiados. Nesse estudo, não foi dado ênfase à modulação de citocinas ou da MMP-2 após o treinamento de resistência seguido de irradiações.

Com base em todos os resultados descritos, fica claro que o uso do LBP sobre o músculo esquelético pode ser um importante recurso terapêutico promissor a ser utilizado durante a hipertrofia compensatória.

O presente estudo, veio preencher uma lacuna no conhecimento no que diz respeito a modulação de citocinas inflamatórias e enzimas importantes para o tecido muscular durante o processo de hipertrofia compensatória.

Em conclusão a fotobiomodulação com laser infravermelho e com os parâmetros utilizados nesse estudo, modulou a ação das citocinas inflamatórias IL-6 e TNF- $\alpha$  após 7 e 14 dias de irradiação. Além disso sugeriu uma possível resposta positiva da FBM sobre a atividade da MMP-2 após 14 dias de irradiação durante o processo de hipertrofia compensatória.



## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo avaliou o efeito do FBM durante o processo de hipertrofia compensatória do músculo plantar de ratos sobre a expressão das citocinas inflamatórias e sobre o remodelamento da MEC e demonstrou que a FBM foi capaz de modular a expressão das citocinas IL-6 e TNF- $\alpha$ , bem como, sugeriu uma possível ação positiva sobre a enzima MMP-2 no tecido muscular no que diz respeito a HC. Estes resultados são de extrema importância para um direcionamento da utilização do LBP como recurso terapêutico durante diferentes tipos de lesões que necessitem de hipertrofia muscular, como por exemplo, em situações de acidentes que levem a um comprometimento muscular com perda dos estímulos de condução nervosa parciais, promovendo a perda de função muscular. Contudo, ainda são poucos os estudos demonstrando os efeitos da FBM sobre a hipertrofia compensatória muscular, estudos futuros que avaliem a distribuição e a quantidade de colágeno no músculo, poderão colaborar de forma pertinente com esse estudo, a fim de estabelecer a função do laser como recurso terapêutico sobre a qualidade do tecido, verificando-se assim o fenótipo das fibras musculares e avaliar com mais exatidão a funcionalidade muscular.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. de Brito A, Alves AN, Ribeiro BG, Barbosa DVDE, Magalhaes EMR, Fernandes KPS, et al. Effect of photobiomodulation on connective tissue remodeling and regeneration of skeletal muscle in elderly rats. *Lasers Med Sci.* 2018;33(3):513–21.
2. Rayagiri SS, Ranaldi D, Raven A, Mohamad Azhar NIF, Lefebvre O, Zammit PS, et al. Basal lamina remodeling at the skeletal muscle stem cell niche mediates stem cell self-renewal. *Nat Commun.* 2018;9(1):1–12.
3. Souza J de, Gottfried C. Muscle injury: Review of experimental models. *J Electromyogr Kinesiol.* 2013;23(6):1253–60.
4. Terena SML, Fernandes KPS, Bussadori SK, Brugnera Junior A, de Fátima Teixeira da Silva D, Magalhães EMR, et al. Infrared Laser Improves Collagen Organization in Muscle and Tendon Tissue During the Process of Compensatory Overload. *Photomed Laser Surg.* 2018;36(3):130–6.
5. Thoma A, Lightfoot AP. NF- $\kappa$ B and Inflammatory Cytokine Signalling: Role in Skeletal Muscle Atrophy. *Adv Exp Med Biol.* 2018;238(6166):267–79.
6. Schoenfeld BJ. The Mechanism Of Muscle Hypertrophy And Their Application To Resistance Training. *Glob Fit Serv Scarsdale, New York.* 2010;24(10):2857–72.
7. Terena SML, Fernandes KPS, Kalil S, Alves AN, Mesquita Ferrari RA. Effects of low level laser in the morphology of the skeletal muscle fiber during compensatory hypertrophy in plantar muscle of rats. *Prog Biomed Opt Imaging - Proc SPIE.* 2015;9531:1–7.
8. Glass DJ. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005;37(10 SPEC. ISS.):1974–84.
9. Allen DL, Harrison BC, Sartorius C, Byrnes WC, Leinwand L a. Mutation of the IIB myosin heavy chain gene results in muscle fiber loss and compensatory hypertrophy. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001;280(3):C637–45.

10. Miyazaki M, Esser KA. Cellular mechanisms regulating protein synthesis and skeletal muscle hypertrophy in animals. *J Appl Physiol*. 2009;106(4):1367–73.
11. Terena SML, Fernandes KPS, Bussadori SK, Deana AM, Mesquita-Ferrari RA. Systematic review of the synergist muscle ablation model for compensatory hypertrophy. *Rev Assoc Med Bras*. 2017;63(2):164–72.
12. DiPasquale DM, Cheng M, Billich W, Huang S a, van Rooijen N, Hornberger T a, et al. Urokinase-type plasminogen activator and macrophages are required for skeletal muscle hypertrophy in mice. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007;293(4):C1278–85.
13. McCarthy JJ, Mula J, Miyazaki M, Erfani R, Garrison K, Farooqui AB, et al. Effective fiber hypertrophy in satellite cell-depleted skeletal muscle. *Development*. 2011;138(17):3657–66.
14. Parvaresh KC, Huber AM, Brochin RL, Bacon PL, McCall GE, Huey KA, et al. Acute vascular endothelial growth factor expression during hypertrophy is muscle phenotype specific and localizes as a striated pattern within fibres. *Exp Physiol*. 2010;95(11):1098–106.
15. Terada M, Kawano F, Ohira T, Nakai N, Nishimoto N. Effects of Mechanical Over-Loading on the Properties of Soleus Muscle Fibers , with or without Damage , in Wild Type and Mdx Mice. *PLoS One*. 2012;7(4).
16. Wang M, Yu H, Soo Y, Bidwell CA, Kuang S. Biochemical and Biophysical Research Communications Myostatin facilitates slow and inhibits fast myosin heavy chain expression during myogenic differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;426(1):83–8.
17. Goodman CA, Mayhew DL, Hornberger TA. Recent progress toward understanding the molecular mechanisms that regulate skeletal muscle mass. *Cell Signal*. 2015;23(12):1896–906.
18. Schuenke MD, Brooks NE, Hikida RS. Interactions of Aging , Overload , and Creatine Supplementation in Rat Plantaris Muscle. *J Aging Res*. 2011;2011:393–416.

19. Huey KA, Burdette S, Zhong H, Roy RR. Early response of heat shock proteins to functional overload of the soleus and plantaris in rats and mice. *Exp Physiol.* 2010;1145–55.
20. Schiaffino S, Dyar KA, Ciciliot S, Blaauw B, Sandri M. Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. *FEBS J.* 2013;280:4294–314.
21. Fukada SI. The roles of muscle stem cells in muscle injury, atrophy and hypertrophy. Vol. 163, *Journal of Biochemistry.* 2018. p. 353–8.
22. Buckingham M, Montarras D. Skeletal muscle stem cells. *Curr Opin Genet Dev.* 2008 Aug 1;18(4):330–6.
23. Bazgir B, Fathi R, Valojerdi MR, Mozdziak P, Asgari A. Satellite cells contribution to exercise mediated muscle hypertrophy and repair. *Cell J.* 2016;18(4):473–84.
24. Sampath SC, Sampath SC, Ho AT V., Corbel SY, Millstone JD, Lamb J, et al. Induction of muscle stem cell quiescence by the secreted niche factor Oncostatin M. *Nat Commun.* 2018;9(1):1531.
25. Tedesco FS, Dellavalle A, Diaz-manera J, Messina G, Cossu G. Review series Repairing skeletal muscle : regenerative potential of skeletal muscle stem cells. *J Clin Invest.* 2010;120(1):11–9.
26. Feng X, Naz F, Juan AH, Orso SD, Sartorelli V. Identification of Skeletal Muscle Satellite Cells by Immunofluorescence with Pax7 and Laminin Antibodies. *J Vis Exp.* 2018;(April):8–13.
27. Martin NR, Lewis MP. Satellite cell activation and number following acute and chronic exercise: A mini review. *Cell Mol Exerc Physiol.* 2012;1(1):1–5.
28. Ling YH, Sui MH, Zheng Q, Wang KY, Wu H, Li WY, et al. MiR-27b regulates myogenic proliferation and differentiation by targeting Pax3 in goat. *Sci Rep.* 2018;8(1):1–12.
29. Adams GR, Bamman MM. Characterization and Regulation of Mechanical Loading-Induced Compensatory Muscle Hypertrophy. *Compr Physiol.* 2012;2(October):2829–70.

30. Muñoz-Cánoves P, Scheele C, Pedersen BK, Serrano AL. Interleukin-6 myokine signaling in skeletal muscle: A double-edged sword? *FEBS J.* 2013;280(17):4131–48.
31. Pedersen BK, Febbraio MA. Muscles , exercise and obesity : skeletal muscle. *Nat Rev Endocrinol.* 2012;8(8):457–65.
32. Calle MC, Fernandez ML. Effects of resistance training on the inflammatory response. *Nutr Res Pract.* 2010;4(4):259.
33. Peake J, Della Gatta P, Suzuki K, Nieman D. Cytokine expression and secretion by skeletal muscle cells: regulatory mechanisms and exercise effects. *Exerc Immunol Rev.* 2015;21(32):8–25.
34. Costa EM da, Werutsky CA. IL-6: Sinalização na Hipertrofia Muscular e efeitos Metabólicos Sistêmicos. *Int J Nutrology.* 2015;8(4):95–100.
35. Introduction I. Muscle as an Endocrine Organ : Focus on Muscle-Derived Interleukin-6. 2008;1379–406.
36. Jung S, Ahn N, Kim S, Byun J, Joo Y, Kim S, et al. The effect of ladder-climbing exercise on atrophy / hypertrophy- related myokine expression in middle-aged male Wistar rats. *J Physiol Sci.* 2015;
37. Broholm C, Mortensen OH, Nielsen S, Akerstrom T, Zankari A, Dahl B, et al. Exercise induces expression of leukaemia inhibitory factor in human skeletal muscle. *J Physiol.* 2008;586(8):2195–201.
38. Zeng L, Akasaki Y, Sato K, Ouchi N, Izumiya Y, Walsh K. Insulin-like 6 is induced by muscle injury and functions as a regenerative factor. *J Biol Chem.* 2010;285(46):36060–9.
39. Serrano AL, Baeza-Raja B, Perdiguero E, Jardí M, Muñoz-Cánoves P. Interleukin-6 Is an Essential Regulator of Satellite Cell-Mediated Skeletal Muscle Hypertrophy. *Cell Metab.* 2008;7(1):33–44.
40. Xi Y, Nakajima G, Gavin E, Morris CG, Kudo K, Hayashi K, et al. Systematic analysis of microRNA expression of RNA extracted from fresh frozen and

- formalin-fixed paraffin-embedded samples. *RNA*. 2007;13(10):1668–74.
41. Edu- F De, Educa- E De. Dano muscular : resposta inflamatória sistêmica após ações excêntricas máximas. *Rev Bras Educ Física e Esporte*. 2012;26(3):367–74.
  42. Article R, Macedo DV. Physical exercise , inflammatory process and adaptive condition : an overview. 2011;(February):320–8.
  43. Moacir Pereira Junior , Rubian Diego Andrade, José Roberto Lazarini Junior FHO. Efeito Agudo Do Exercício Resistido Sobre A Interleucina 6 E O Fator De Necrose Tumoral Alfa Em Idosos: Uma Revisão Sistemática. *Rev Bras Prescrição e Fisiol do Exerc*. 2015;597–604.
  44. Hai-Peng Lina, 1, Yan-Qing Zhengb, 1, Zhi-Ping Zhoua G-X, and Ping-Fan Guoc. Ryanodine receptor antagonism alleviates skeletal muscle ischemia reperfusion injury by modulating TNF- $\alpha$  and IL-10. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2018;1386-0291.
  45. Tidball JG, Villalta SA. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. *AJP-Regul Integr Comp Physiol*. 2010;2:R1173–R1187.
  46. Zhang C, Li Y, Wu Y, Wang L, Wang X, Du J. Interleukin-6/signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) pathway is essential for macrophage infiltration and myoblast proliferation during muscle regeneration. *J Biol Chem*. 2013;288(3):1489–99.
  47. Carmignac V, Durbeej M. Cell – matrix interactions in muscle disease. *J Pathol*. 2012;200–18.
  48. de Melo CAV, Alves AN, Terena SML, Fernandes KPS, Nunes FD, da Silva D de FT, et al. Light-emitting diode therapy increases collagen deposition during the repair process of skeletal muscle. *Lasers Med Sci*. 2016;31(3):531–8.
  49. Ribeiro BG, Alves AN, Santos LAD Dos, Fernandes KPS, Cantero TM, Gomes MT, et al. The effect of low-level laser therapy (LLLT) applied prior to muscle

- injury. *Lasers Surg Med.* 2015;47(7):571–8.
50. Aparecida C, Melo V De, Alves AN, Maris S, Terena L, Porta K, et al. Light-emitting diode therapy increases collagen deposition during the repair process of skeletal muscle. 2016;
  51. Alves AN, Fernandes KPS, Melo CA V., Yamaguchi RY, França CM, Teixeira DF, et al. Modulating effect of low level-laser therapy on fibrosis in the repair process of the tibialis anterior muscle in rats. *Lasers Med Sci.* 2014;29(2):813–21.
  52. Gillies AR, Lieber RL. Structure and function of the skeletal muscle extracellular matrix. *Muscle nerve.* 2012;44(3):318–31.
  53. de Lima Rodrigues D, Alves AN, Guimarães BR, de Alcântara Araujo Amorim WW, Bussadori SK, Fernandes KPS, et al. Effect of prior application with and without post-injury treatment with low-level laser on the modulation of key proteins in the muscle repair process. *Lasers Med Sci.* 2018;1–7.
  54. Mesquita-Ferrari RA, Alves AN, de Oliveira Cardoso V, Artilheiro PP, Bussadori SK, Rocha LA, et al. Low-level laser irradiation modulates cell viability and creatine kinase activity in C2C12 muscle cells during the differentiation process. *Lasers Med Sci.* 2015;30(8):2209–13.
  55. Rennó ACM, Toma RL, Feitosa SM, Fernandes K, Bossini PS, de Oliveira P, et al. Comparative Effects of Low-Intensity Pulsed Ultrasound and Low-Level Laser Therapy on Injured Skeletal Muscle. *Photomed Laser Surg.* 2011;29(1):5–10.
  56. De Souza TOF, Mesquita DA, Ferrari RAM, Dos Santos Pinto D, Correa L, Bussadori SK, et al. Phototherapy with low-level laser affects the remodeling of types I and III collagen in skeletal muscle repair. *Lasers Med Sci.* 2011;26(6):803–14.
  57. Mesquita-Ferrari RA, Martins MD, Silva JA, Da Silva TD, Piovesan RF, Pavesi VCS, et al. Effects of low-level laser therapy on expression of TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$  in skeletal muscle during the repair process. *Lasers Med Sci.* 2011;26(3):335–40.

58. Ribeiro BG, Alves AN, Dos Santos LAD, Cantero TM, Fernandes KPS, Dias D da S, et al. Red and Infrared Low-Level Laser Therapy Prior to Injury with or without Administration after Injury Modulate Oxidative Stress during the Muscle Repair Process. *PLoS One*. 2016;11(4):e0153618.
59. These H. Mechanism of Compensatory Muscle Hypertrophy of the Rat in Skeletal. 1971;451464.
60. Gordon BS, Díaz DCD, White JP, Carson JA, Kostek MC. Six1 and Six1 cofactor expression is altered during early skeletal muscle overload in mice. *J Physiol Sci*. 2012;62(5):393–401.
61. Baptista J, Martins MD, Pavesi VCS, Bussadori SK, Fernandes KPS, Júnior D dos SP, et al. Influence of Laser Photobiomodulation on Collagen IV During Skeletal Muscle Tissue Remodeling After Injury in Rats. *Photomed Laser Surg*. 2011;29(1):11–7.
62. Cleutjens JPM, Kandala JC, Guarda E, Guntaka R V., Weber KT. Regulation of collagen degradation in the rat myocardium after infarction. *J Mol Cell Cardiol*. 1995;27(6):1281–92.
63. Senger DR, Davis GE. Angiogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Bio*. 2018;1–20.
64. Heinemeier KM, Olesen JL, Haddad F, Langberg H, Kjaer M, Baldwin KM, et al. Expression of collagen and related growth factors in rat tendon and skeletal muscle in response to specific contraction types. *J Physiol*. 2007;582(3):1303–16.
65. Franchi M, Trirè A, Quaranta M, Orsini E, Ottani V. Collagen structure of tendon relates to function. *ScientificWorldJournal*. 2007;7:404–20.
66. Harrison BC, Bell ML, Allen DL, Byrnes WC, Leinwand LA. Skeletal muscle adaptations in response to voluntary wheel running in myosin heavy chain null mice. *J Appl Physiol*. 2002;92(1):313–22.
67. Gao S, Durstine JL, Koh XH, Carver WE, Frizzell N, Carson JA. Acute myotube



- protein synthesis regulation by IL-6-related cytokines. *Am Physiol Soc.* 2017;3:0363-6143.
68. Alves AN, Ribeiro BG, Fernandes KPS, Souza NHC, Rocha LA, Nunes FD, et al. Comparative effects of low-level laser therapy pre- and post-injury on mRNA expression of MyoD, myogenin, and IL-6 during the skeletal muscle repair. *Lasers Med Sci.* 2016;31(4):679–85.
  69. Macedo DV. Exercício físico , processo inflamatório e adaptação : uma visão geral. *Rev Bras Cineantropom Desempenho Hum* 2011,. 1980;320–8.
  70. Almeida D, Tomazoni SS, Tarso P De, Leal-junior ECP, Frigo L, Joensen J, et al. Superpulsed Low-Level Laser Therapy Protects Skeletal Muscle of mdx Mice against Damage , Inflammation and Morphological Changes Delaying Dystrophy Progression. 2014;9(3).
  71. Patrocinio T, Sardim AC, Assis L, Fernandes KR, Rodrigues N, Renno ACM. Effect of Low-Level Laser Therapy (808 nm) in Skeletal Muscle After Resistance Exercise Training in Rats. *Photomed Laser Surg.* 2013;31(10):492–8.

## 8. ANEXOS

### 8.1. Certificado de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Experimentação Animal



#### CERTIFICADO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Certificado que o projeto intitulado Efeito do laser de baixa potência (LBP) sobre os marcadores inflamatórios durante o processo de hipertrofia por sobrecarga do músculo plantar de ratos, protocolo nº AN 13/2017, sob a responsabilidade de Raquel Agnelli Mesquita Ferrari que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Nove de Julho em reunião de 21/11/2017.

Vigência do Projeto: 05/12/2017 a 01/12/2018

Espécie/linhagem: Rato heterogênico - Wistar

Nº de animais 45

Peso/Idade: 200 – 250 gramas

Sexo: Macho

Origem: UNINOVE

  
Prof Dr Rodrigo Labat Marcos

Coordenação - Comissão de Ética no Uso de Experimentação Animal - CEUA