

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO – UNINOVE

**PROGRAMA DE MESTRADO E DOUTORADO EM BIOFOTÔNICA
APLICADA ÀS CIÊNCIAS DA SAÚDE**

DIRETORIA DE SAÚDE

DANIELLE DE LIMA RODRIGUES

**EFEITO DO LASER INFRAVERMELHO APLICADO EM DIFERENTES
MOMENTOS SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA DAS CADEIAS PESADAS DE
MIOSINA, CALCINEURINA E MIOSTATINA DURANTE O PROCESSO DE
REPARO DO MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATOS**

SÃO PAULO

2017

DANIELLE DE LIMA RODRIGUES

**EFEITO DO LASER INFRAVERMELHO APLICADO EM DIFERENTES MOMENTOS
SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA DAS CADEIAS PESADAS DE MIOSINA,
CALCINEURINA E MIOSTATINA DURANTE O PROCESSO DE REPARO DO
MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATOS**

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biofotônica
aplicada as Ciências da Saúde
da Universidade Nove de Julho
para obtenção do título de
mestre.

Orientadora: Prof.^a Dra. Raquel Agnelli Mesquita Ferrari

SÃO PAULO

2017

Rodrigues, Danielle de Lima.

Efeito do laser infravermelho aplicado em diferentes momentos sobre a expressão gênica das cadeias pesadas de miosina, calcineurina e miostatina durante o processo de reparo do músculo esquelético de ratos. / Danielle de Lima Rodrigues. 2017.

72 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2017.

Orientador (a): Prof^ª. Dr^ª. Raquel Agnelli Mesquita Ferrari.

1. Fotobiomodulação. 2. Terapia a laser de baixa potência. 3. Músculo esquelético. 4. Cadeias pesadas de miosina. 5. Calcineurina.

I. Ferrari, Raquel Agnelli Mesquita. II. Título

CDU 615.831

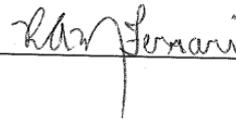
São Paulo, 23 de fevereiro de 2017.

TERMO DE APROVAÇÃO

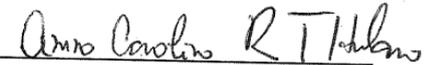
Aluna: DANIELLE DE LIMA RODRIGUES

Título da Dissertação: "Efeito do laser infravermelho aplicado em diferentes momentos sobre a expressão gênica das cadeias pesadas de miosina, calcineurina e mostatina durante o processo de reparo do músculo esquelético de ratos"

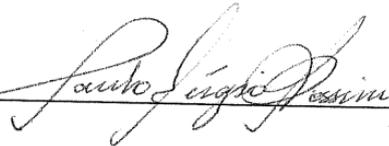
Presidente: PROF.^a DR.^a RAQUEL AGNELLI MESQUITA FERRARI



Membro: PROF.^a DR.^a ANNA CAROLINA RATTO TEMPESTINI HORLIANA



Membro: PROF. DR. PAULO SERGIO BOSSINI



DEDICATÓRIA

***À minha mãe Kátia** pelo cuidado, amor e dedicação em todos os momentos, minha eterna gratidão.*

***Ao meu pai Ocione** pelo carinho, incentivo e exemplo de vida, minha eterna admiração.*

***Ao meu marido Giuliano** pelo companheirismo, compreensão e carinho nas horas difíceis, sempre ao meu lado nos momentos de alegria e de dor.*

***À minha filha Giulia,** pelo mais puro e sincero amor.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por permitir que este trabalho se concretizasse, por tudo o que me concede, por me tornar capaz, por fazer de mim uma pessoa cada dia melhor.

À minha orientadora, Prof.^a Dra. Raquel Agnelli Mesquita Ferrari, por todo ensinamento, incentivo e carinho durante este projeto.

Aos técnicos do Laboratório de Pesquisa da UNINOVE, pela ajuda e suporte.

À Beatriz Ribeiro, pelos ensinamentos, parceria e amizade ao longo do projeto.

Aos amigos de laboratório, Nadhia Helena e Agnelo Alves por toda ajuda e companheirismo durante esta jornada.

Aos alunos de Iniciação Científica pelo apoio e comprometimento.

Aos meus amigos e familiares pela compreensão, apoio e incentivo em todos os momentos.

“ A mente que se abre para uma nova idéia, jamais voltará ao seu tamanho original. ”

Albert Einstein

RESUMO

A alta incidência dos casos de lesão muscular motiva a busca por novas alternativas terapêuticas para um processo de regeneração muscular mais rápido e melhor qualidade. Com a evolução tecnológica e disponibilidade de recursos cada vez mais aperfeiçoados, estudos demonstram grande avanço na regeneração muscular, destacando-se a fotobiomodulação (PBM) usando o laser de baixa potência (LBP). Estudos sobre a aplicação prévia ou pós-lesão têm demonstrado efeitos positivos, contudo ainda existe pouca informação em relação aos seus efeitos sobre a expressão de proteínas relacionadas a funcionalidade e trofismo da fibra muscular após uma lesão. A miostatina é uma proteína envolvida com crescimento/desenvolvimento muscular, a calcineurina está envolvida na contração muscular, e as CPMs determinam o desempenho do músculo quanto à força e velocidade. Desta forma o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do LBP aplicado previamente à indução da lesão muscular, associado ou não a irradiação pós sobre a expressão gênica das cadeias pesadas de miosina, calcineurina e miostatina. Foram utilizadas 65 ratas Wistar, divididos em 4 grupos experimentais: Controle (n= 5); Criolesão não tratado (n= 20); Criolesão tratado previamente com LBP (n= 20) e Criolesão tratado com LBP pré e pós-lesão (n= 20). A criolesão constituiu de duas aplicações de bastão resfriado em nitrogênio líquido no músculo tibial anterior (TA). Os grupos lesionados foram eutanasiados em 1, 3, 7 e 14 dias após a indução da lesão. A irradiação com LBP foi realizada com o laser AsGaAl (780 nm) nos parâmetros de 10 J/cm²; 40 mW; 10 segundos por ponto; 8 pontos; 3,2 J de energia total. Ao término do protocolo, os músculos TA foram removidos para análise da expressão gênica das cadeias pesadas de miosina (CPMs), de calcineurina e miostatina por PCR em tempo real. A comparação entre os grupos foi realizada pela ANOVA/Tukey (p<0,05) por meio do programa BioStat 5.0. Os resultados demonstraram que a irradiação prévia reduziu a expressão de miostatina após 3 dias. A irradiação prévia associada à irradiação pós reduziu a expressão da calcineurina em 14 dias e aumentou a expressão da miostatina no mesmo período. Quanto à expressão de CPMs, o LBP modulou o processo de reparo muscular principalmente na fase aguda, a irradiação prévia diminuiu a expressão de CPM I e CPM IIx em 1 dia, e a irradiação prévia associada à irradiação pós aumentou a expressão de CPM IIx em 3 dias. Concluindo, o LBP foi capaz de modular proteínas importantes para o processo de reparo muscular (CPMs, calcineurina e miostatina), sendo mais evidente seus efeitos quando adotado o regime de aplicação prévia associada à irradiação pós-lesão.

Palavras-chave: Fotobiomodulação, terapia a laser de baixa potência, músculo esquelético, cadeias pesadas de miosina, calcineurina, miostatina, regeneração, fototerapia.

ABSTRACT

The high incidence of cases of muscle injury motivates the search for new therapeutic alternatives for a muscle regeneration process faster and better quality. With the evolution of technology and availability of increasingly perfected capabilities, studies show major advancement in muscle regeneration, especially the photobiomodulation (PBM) using low-level laser therapy (LLLT). Studies on the prior application or post-injury have shown positive effects, yet there is still little information in relation to their effects on the protein expression related to functionality and trophism muscle fiber after an injury. Myostatin is a protein involved in muscle growth/development, calcineurin is involved in muscle contraction, and the MHCs determine muscle performance about the strength and speed. The present study aimed to evaluate the effect of LLLT applied prior to the induction of muscle injury, associated or not to post irradiation on the gene expression of myosin heavy chains, calcineurin and myostatin. 65 Wistar rats were used, divided into 4 experimental groups: control (n = 5); Untreated Cryoinjury (n = 20); Cryoinjury treated previously with LLLT (n = 20) and Cryoinjury treated with LLLT pre-and post-injury (n = 20). The Cryoinjury constituted of two applications of bat cooled in liquid nitrogen in the muscle tibialis anterior (TA). The injured were euthanized in groups 1, 3, 7 and 14 days after the induction of injury. Irradiation with LLLT was done with the laser AsGaAl (780 nm) in the parameters of 10 J/cm²; 40 mW; 10 seconds per point; 8 points; 3.2 J total energy. At the end of the protocol, the TA muscles were removed for analysis of gene expression of myosin heavy chains (MHCs), calcineurin and myostatin by real-time PCR. The comparison between the groups was performed by ANOVA/Tukey (p < 0.05) through the BioStat 5.0 program. The results showed that the previous irradiance reduced the expression of myostatin after 3 days. Prior irradiation associated with post irradiation reduced the expression of calcineurin in 14 days and increased the expression of myostatin in the same period. As for the expression to MHCs, the LLLT radioed the muscle repair process especially in the acute phase, the previous irradiance decreased the expression of MHC I and MHC IIx in 1 day, and the prior irradiation associated with post irradiation increased the expression of MHC IIx in 3 days. In conclusion, the LLLT was able to modulate important proteins for muscle repair process (MHCs, calcineurin and myostatin), being more obvious its effect when adopted the regime of prior application associated to post-injury irradiation.

Keywords: Photobiomodulation, low-level laser therapy, skeletal muscle, heavy myosin chain, calcineurina, myostatin, regeneration, phototherapy.

SUMÁRIO

1. CONTEXTUALIZAÇÃO	15
1.1. Tecido muscular esquelético – Características principais	15
1.2. Cadeias Pesadas de Miosina (CPMs) – A importância das CPMs no tecido muscular esquelético.....	16
1.3. Calcineurina (Cn) – A importância da calcineurina no tecido muscular esquelético.....	16
1.4. Miostatina – A importância da miostatina no tecido muscular esquelético.....	17
1.5. Regeneração muscular – Processo de reparo do tecido muscular esquelético após sofrer uma lesão.....	18
1.6. Terapia com Laser de Baixa Potência (LBP)	19
JUSTIFICATIVA.....	20
2. OBJETIVOS	21
2.1. Objetivo Geral.....	21
2.2. Objetivo Específico	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1. Animais	22
3.2. Grupos Experimentais	22
3.3. Irradiação com Laser de Baixa Potência (LBP).....	23
3.4. Procedimento de Criolesão	24
3.5. Eutanásia e obtenção das amostras musculares.....	25
3.6. Análise pela técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) em tempo real – Avaliação da expressão gênica de CPMs (CPMI, CPMIIa, CPMIIb e CPMIIx), Calcineurina e Miostatina	25
3.7. Análise Estatística	28
4. RESULTADOS	29
4.1. Artigo a ser submetido à revista Lasers in Surgery and Medicine	29
5. SUMÁRIO DOS RESULTADOS	50
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	51
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
8. APÊNDICE	56
8. ANEXOS.....	76

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Procedimento de irradiação com LBP	22
Figura 2. Demonstração do procedimento de criolesão	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros dosimétricos do laser de baixa potência..... 21

Tabela 2. Sequência de primers 25

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

µg	micrograma
µl	microlitro
µm	micrômetro
AsGaAl	Arseneto de Gálio e Alumínio
CaCl₂	Cloreto de cálcio
cDNA	DNA complementar
cm²	Centímetro ao quadrado
Cn	Calcineurina
CPM	Cadeia pesada de miosina
DEPC	Dimetilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Deoxinucleotídeos trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
g	Gramas
GDF-8	Miostatina
h	Hora
J	Joule
J/cm²	Joules por centímetros quadrados
LBP	Laser de baixa potência
mg/Kg	Miligrama por quilograma
ml	mililitro
MLC	Cadeia leve de miosina

mm	milímetro
mW	MiliWatt
NaCl	Cloreto de sódio
NaN₃	Azida de sódio
nm	Nanômetro
°C	Grau Celsius
PCR	Reação em cadeia da polimerase
<i>primers</i>	Oligonucleotídeos iniciadores
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotação por minuto
TA	Tibial anterior
W/cm²	Watts por centímetros quadrados
ZnCl₂	Cloreto de zinco
λ	Comprimento de onda

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

Lesões celulares possuem altíssima incidência e podem resultar de diferentes mecanismos. Uma estimativa calcula que de todos os tipos de lesões ocorridas, cerca de 30% são lesões musculares(1).

As lesões musculares podem ser resultantes de causas diretas como traumas e contusões, ou de causas indiretas, relacionadas a condições médicas. Embora possam ocorrer em atividades profissionais ou recreativas, podendo afetar qualquer indivíduo, a maior incidência ocorre em profissionais do esporte, e cerca de 90% das lesões são resultantes de estiramentos e contusões. As consequências dessas lesões resultam em redução de desempenho, perda de competições, e muitas vezes no afastamento do profissional da modalidade esportiva(2).

1.1. Tecido muscular esquelético – Características principais

O tecido muscular esquelético é considerado o maior tecido corporal humano, representando cerca de 50% do peso corporal de um indivíduo. Este tecido é composto por células multinucleadas, denominadas fibras musculares. As fibras musculares são constituídas por unidades contráteis denominadas sarcômeros, responsáveis pela contração e relaxamento muscular. Os sarcômeros são compostos por várias proteínas, destacando-se os filamentos proteicos de actina e miosina(3).

O tecido muscular é reconhecido por sua facilidade de adaptação diante de diferentes estímulos e por sua grande capacidade regenerativa após diferentes tipos de lesão(4). Embora essas características musculares sejam satisfatórias, o processo de reparação é lento, e dependendo das condições do indivíduo e das condições de tratamento, no decorrer do processo podem ocorrer diversas situações indesejadas, como o desenvolvimento de fibrose no local da lesão ou até mesmo a perda da função muscular(5).

1.2. Cadeias Pesadas de Miosina (CPMs) – A importância das CPMs no tecido muscular esquelético

A miosina é a principal proteína motora do tecido muscular esquelético. Logo, a condição de sua estrutura é extremamente importante para o desempenho da função muscular, sendo também um confiável parâmetro das condições funcionais do músculo esquelético. Esta proteína é composta por dois pares de cadeias leves (MLC) e um par de cadeias pesadas (CPM). As isoformas de CPMs dominantes são consideradas responsáveis pelas diferenças funcionais do músculo esquelético(6).

No tecido muscular esquelético dos seres humanos, são expressos os quatro tipos de isoformas de CPMs: fibras de contração lenta tipo I (CPM I) e fibras de contração rápida tipo II, subdivididas em tipo IIA (CPM Ila), tipo IIB (CPM I Ib) e tipo IId (I Ix em ratos); que ditam a taxa de força desenvolvida e a velocidade máxima de encurtamento das pontes cruzadas de actina e miosina, ou seja, a especificidade da contração muscular(7).

Além do aspecto da função das CPMs, o desempenho funcional do músculo lesionado depende de vários outros aspectos, dentre eles, a atividade de duas proteínas, a miostatina e a calcineurina, que influenciam as características fenotípicas da fibra muscular(8) ou seja, influenciam na determinação da composição das isoforma da proteína miosina presente no sarcômero, que é a unidade contrátil da célula muscular(9).

1.3. Calcineurina (Cn) – A importância da calcineurina no tecido muscular esquelético

A calcineurina (Cn) é uma fosfatase que participa de diversos processos fisiológicos no organismo humano, sendo que no músculo esquelético especificamente, regula a atividade da mitocôndria de canais enzimáticos, proliferação e diferenciação de mioblastos(10).

Um das mais impactantes evidências do seu importante papel no tecido muscular se refere ao envolvimento da Cn em perda e ganho de massa muscular(11), e sua participação na alteração do perfil fenotípico das fibras do músculo esquelético quanto ao tipo(10).

As fibras musculares possuem conjuntos específicos de genes, que caracterizam seu fenótipo. A calcineurina, quando expressa em maior quantidade, participa da regulação de transcrição de genes das fibras musculares, interferindo na mudança do fenótipo das fibras, induzindo uma transição de um fenótipo de contração rápida para um fenótipo de contração lenta(12). Estudos anteriores, como o de Chin et al. (1998) e Serrano et al. (2001) atestam essa informação com pesquisas realizadas com o uso de interferentes na atividade da calcineurina, promovendo um efeito contrário do habitual, transformando fenótipos de contração lenta para fenótipos de contração rápida.

1.4. Miostatina – A importância da miostatina no tecido muscular esquelético

A proteína miostatina, também conhecida como fator de diferenciação de crescimento 8 (GDF-8), possui um mecanismo de ação relacionado ao crescimento muscular, e não a contração como a calcineurina(13). A função da miostatina foi identificada através de experimentos realizados com manipulação genética em camundongos(14). Como resultado, os animais que não sem expressão de miostatina tiveram um aumento de massa muscular significativa em relação aos animais com expressão de miostatina em níveis dentro da normalidade. Além disso, as análises musculares revelaram um aumento de duas a três vezes na massa muscular, quando comparados aos animais controles. Sendo assim, se definiu o papel da miostatina como um importante regulador negativo do desenvolvimento do músculo esquelético(15).

Sabendo que a miostatina é um limitador do crescimento muscular, que a calcine urina está intimamente envolvida na contração muscular e que as CPMs determinam o desempenho do músculo quanto à força e velocidade, pode-se afirmar que a avaliação destes aspectos é determinante para classificar a eficácia e relevância do tratamento utilizado na lesão muscular no que se refere a modulação na expressão destas proteínas(16).

1.5. Regeneração muscular – Processo de reparo do tecido muscular esquelético após sofrer uma lesão

Ao sofrer uma lesão, o músculo esquelético busca se regenerar por meio de uma série de eventos com a finalidade de recuperar funcionalmente este tecido lesionado(4).

O processo de reparo do tecido muscular tem sido descrito desde o final do século XIX, mas somente nos últimos trinta anos foi realmente compreendida a capacidade regenerativa das fibras musculares esqueléticas(3). O sucesso da regeneração depende da intensidade e da natureza da lesão, porém independente da natureza, intensidade ou extensão da lesão, em todas as situações o processo de regeneração envolve ajustes na permeabilidade vascular, infiltração de células inflamatórias, remoção dos componentes celulares lesionados através da fagocitose, proliferação de células satélites e posteriormente, fusão destas para a formação de novas fibras musculares, e finalmente a recuperação da função muscular(4).

Com base nestes eventos descritos, o processo de regeneração muscular pode ser dividido didaticamente em três fases: fase inflamatória, fase proliferativa e fase de remodelamento. Portanto é imprescindível saber identificar em que fase o músculo lesionado se encontra para a escolha da melhor alternativa de tratamento(5).

O crescente número de lesões musculares induz a ciência a buscar novas opções de tratamento, que sejam mais eficientes e de fácil acessibilidade para a sociedade. Nos dias atuais, os tratamentos utilizados para as lesões musculares são os mesmos de alguns anos atrás, incluindo o uso de anti-inflamatórios(17), além do uso de diferentes terapias como ultrassom terapêutico, estimulação elétrica(1), massagem(18), e mais recentemente e com ótimos resultados apresentados a fototerapia(19)(20)(21)(22). Embora existam diversas opções disponíveis, os melhores tratamentos para lesão muscular ainda não estão totalmente estabelecidos, e existe uma grande variação na aplicabilidade de cada um deles, o que depende muito da intensidade de cada lesão(23). Com um bom tratamento, em dose e período adequado, é possível promover reparo

muscular mais rápido e de melhor qualidade, muitas vezes garantindo a integridade morfológica e funcional do músculo lesionado(24).

1.6. Terapia com Laser de Baixa Potência (LBP)

Nos últimos anos, a fototerapia tem se destacado por apresentar em pouco tempo resultados significativos sem os indesejáveis efeitos colaterais (25).

A fotobiomodulação utiliza diferentes fontes de luz e dentre estas o laser de baixa potência (LBP), que apresenta benefícios para o tecido muscular podendo ser utilizado em diferentes formas de aplicação(22).

A maioria dos estudos descritos na literatura ainda se concentra na investigação dos efeitos da fotobiomodulação utilizada após a ocorrência de uma lesão. Uma revisão de literatura realizada previamente pelo nosso grupo de pesquisa evidencia a diversidade de parâmetros e protocolos utilizados para o tratamento utilizando LBP e os resultados encontrados, sendo na maioria positivos para o processo de reparo muscular, sendo os principais efeitos achados a redução do processo inflamatório, a modulação dos fatores de crescimento e reguladores miogênicos e o aumento da angiogênese.(26)

Estudos demonstram efeitos positivos do laser quando aplicado no espectro de luz vermelho e no infravermelho, promovendo diferentes resultados de acordo com a forma de aplicação(27).

Quando aplicado após lesão muscular aguda, no modo vermelho o LBP (660 nm; potência de saída de 20 mW, densidade de potência de 500 mW/cm², densidade de energia 5 J/cm², exposição tempo 10 s) demonstrou ser capaz de induzir uma melhor deposição e distribuição de colágeno(28), modular a expressão das citocinas TNF- α e TGF- β (21), e de promover a angiogênese e reduzir a mionecrose(5). No modo infravermelho o LBP (780 nm; potência de saída de 40 mW, densidade de potência de 1 W/cm² densidade de energia de 10 J/cm² e tempo de exposição de 10 s) demonstrou ser capaz de modular a expressão gênica de MyoD e IL-6(21).

A aplicação prévia (imediatamente antes da lesão muscular aguda) do LBP (780 nm; potência de saída de 40 mW, densidade de potência de 1 W/cm² densidade de energia de 10 J/cm² e tempo de exposição de 10 s) demonstrou ser capaz de induzir uma diminuição do infiltrado inflamatório e da mionecrose,

induziu um aumento do número de vasos sanguíneos, do número de fibras musculares imaturas e da atividade da MMP-2, além de influenciar promovendo melhor organização e distribuição do colágeno no tecido muscular durante o processo de reparo muscular de ratos(22).

E quando aplicado previamente a lesão muscular aguda associado ou não a aplicação pós lesão, o LBP (780 nm; potência de saída de 40 mW, densidade de potência de 1 W/cm² densidade de energia de 10 J/cm² e tempo de exposição de 10 s) foi ser capaz de modular positivamente o estresse oxidativo e as enzimas antioxidantes(22).

JUSTIFICATIVA

O alto índice de lesão muscular requer um tratamento que promova resultados eficazes e satisfatórios. Existe grande interesse em terapias que promovam estes resultados, pois lesões musculares são recorrentes no meio clínico, principalmente na área desportiva, e a falta de um tratamento adequado resulta no afastamento de atletas de suas atividades esportivas.

A fotobiomodulação despontou nos últimos anos neste panorama como uma alternativa inovadora, acessível, sem efeitos colaterais, de fácil aplicação e com resultados positivos demonstrados na literatura no que diz respeito ao reparo muscular. Embora existam vários estudos que descrevam os efeitos positivos do LBP aplicado tanto prévio quanto após a lesão muscular, seus efeitos não estão completamente esclarecidos. Além disso, pouco há escrito sobre os efeitos da irradiação prévia do tecido muscular, associada ou não à irradiação pós-lesão, sobre a qualidade e tempo deste processo. Entender estes reais efeitos seria especialmente importante no caso indivíduos mais susceptíveis a lesão, ou seja, os atletas, uma vez que direcionaria o estabelecimento de protocolos de irradiação prévia no sentido de melhorar a qualidade do reparo na presença de nova lesão.

Dessa forma, o presente estudo visou analisar o efeito do LBP aplicado em diferentes momentos sobre o reparo muscular, tendo como finalidade avaliar a eficácia do tratamento com LBP nos casos de lesão muscular.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- ✓ O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da irradiação prévia com LBP infravermelho (780 nm) associada ou não a irradiação pós-lesão durante a regeneração muscular.

2.2 Objetivo Específico

- ✓ Avaliar o efeito da irradiação com LBP infravermelho (780 nm) aplicado previamente associado ou não a irradiação pós sobre a expressão gênica da calcineurina, miostatina e das diferentes isoformas de Cadeias Pesadas de Miosina (CPMI, CPMIIa, CPMIIx e CPMIIb) durante o reparo do músculo esquelético de ratos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Para este projeto, a metodologia utilizada foi realizada de acordo com as normas regulamentadoras do Conselho Nacional para o Controle de Experimentação Animal (CONCEA). A mesma foi avaliada pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Nove de Julho (AN 25/2014, Anexo A), e realizada no laboratório de pesquisa do Programa Mestrado e Doutorado em Biofotônica aplicada às Ciências da Saúde da UNINOVE.

3.1. Animais

Foram utilizados 65 ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), fêmeas, pesando 250 g em média. Os animais foram mantidos no biotério da UNINOVE em caixas plásticas apropriadas, temperatura ambiente de 22°C, com umidade relativa de 40%, luminosidade controlada com ciclo de 12h (claro/escuro), além de comida e água *ad libitum*.

3.2. Grupos Experimentais

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos experimentais:

- ✓ **Grupo Controle:** Os animais não foram submetidos ao procedimento de criolesão, mas foi realizada a remoção bilateral do músculo tibial anterior (TA) (n= 5);
- ✓ **Grupo Criolesão não tratado:** Foi realizada a criolesão no músculo TA, e os mesmos não receberam tratamento (n= 20);
- ✓ **Grupo Criolesão tratado previamente com LBP:** Foi realizada uma única irradiação com LBP 780 nm imediatamente antes da criolesão no músculo TA (n= 20);

✓ **Grupo Criolesão tratado com LBP pré e pós-lesão:** Os animais receberam irradiação com LBP previamente à indução da lesão associado com a irradiação pós-lesão (n= 20).

Os animais lesionados, irradiados ou não, foram avaliados nos períodos experimentais de 1, 3, 7 e 14 dias.

3.3. Irradiação com Laser de Baixa Potência (LBP)

A irradiação com o LBP foi realizada com os parâmetros descritos na Tabela 1 (Alves *et al*, 2014, Ribeiro *et al* 2015). Para tal finalidade, o laser utilizado foi o Twin Laser® (MM Optics, São Carlos – SP, Brasil).

Tabela 1: Parâmetros do laser de baixa potência.

Meio ativo	Arseneto de Gálio e Alumínio (AsGaAl)
Comprimento de onda	780 nm
Área do feixe	0,04 cm ²
Potência média	40 mW
Densidade de potência	1 W/cm ²
Densidade de energia	10 J/cm ²
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

A irradiação foi feita diretamente sobre a pele do músculo TA em oito pontos imediatamente antes da criolesão (Figura 1B) conforme descrito previamente por Ribeiro *et al.*, 2015. No grupo Criolesão tratado com LBP pré e pós-lesão, a irradiação também foi feita 2 horas após a indução da criolesão e

diariamente até o fim do protocolo experimental(29),(27). Como demonstrado na Figura 1, o laser foi aplicado em ângulo de 90 graus entre o emissor e a pele do animal para evitar refração do feixe. No início e final do procedimento experimental, a potência de emissão de luz do laser foi aferida utilizando o “Laser Check Power Meter” (Coherent, Santa Clara, CA, USA).

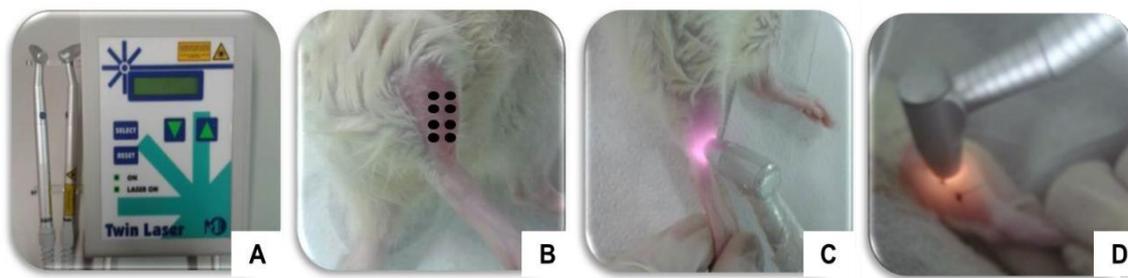


Figura 1. Irradiação com LBP. (A) Equipamento; (B) Pontos irradiados; (C) Realização da irradiação antes da indução da lesão; (D) Realização da irradiação após a indução da lesão muscular(31).

3.4. Procedimento de Criolesão

Foi induzida a lesão muscular no músculo TA pelo procedimento de criolesão. Este modelo está descrito na literatura(30),(28),(5),(29), e foi selecionado por produzir a resposta natural do músculo mediante a lesão, além de produzir lesões com características homogêneas, com áreas bem definidas, proporcionando pouca variabilidade na severidade da mesma. Antes de realizar o procedimento de criolesão, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de anestésico a base de Ketamina 10% (100 mg/Kg) e Xilazina 2% (10mg/Kg). As seringas utilizadas para a aplicação da anestesia foram seringas de modelo insulina. Após a anestesia foi realizada a tricotomia e em seguida foi realizada a irradiação com LBP antes da criolesão nos grupos irradiados.

Como demonstrado na Figura 2, para o procedimento de criolesão, o músculo TA do animal foi exposto cirurgicamente, e a criolesão foi realizada por meio de duas aplicações (duração de 10 segundos cada uma) diretamente na superfície ventral do músculo, utilizando bastão metálico (de 3 mm com extremidade plana) previamente resfriado em nitrogênio líquido. Após o

procedimento de criolesão, foi realizada a sutura das áreas incisadas, para a sutura será utilizado fio de poliamida (5.0) e os animais ficaram mantidos em gaiolas (Figura 2).



Figura 2: Demonstração do procedimento de criolesão desde a tricotomia e exposição do músculo TA até a sutura (31).

3.5. Eutanásia e obtenção das amostras musculares

Os animais lesionados, irradiados ou não, foram eutanasiados por superdose de anestésicos (400 mg/Kg Ketamina 10%); 40 mg/Kg Xilazina 2%) em 1, 3, 7 e 14 dias. Já os animais do Grupo Controle foram eutanasiados logo no primeiro dia do experimento. Os músculos TA foram removidos e as amostras musculares foram destinadas a análises de expressão gênica das CPMs, da calcineurina e da miostatina por PCR em tempo real.

3.6. Análise pela técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) em tempo real – Avaliação da expressão gênica de CPMs (CPMI, CPMIIa, CPMIIb e CPMIIx), Calcineurina e Miostatina

3.6.1. Extração do RNA total

Para a extração do RNA, foram utilizadas entre 80 e 100 mg de amostras musculares, que foram maceradas em nitrogênio líquido. Na

sequência, o tecido foi homogeneizado em 1 ml do reagente TRIzol (Invitrogen, São Paulo, Brasil), para iniciar o isolamento do RNA total. Ocorreu lise celular. Após a lise celular, foram adicionados 300 µl de clorofórmio gelado, incubado em temperatura ambiente por 3 minutos e centrifugado a 10.200 rpm durante 15 minutos a 4°C, sendo a fase aquosa superior contendo o RNA total transferida para um novo microtubo. Em seguida, foram adicionados 750 µl 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 adicionado 1 ml de álcool 75% gelado no precipitado de RNA total que foi centrifugado a 8.400 rpm durante 5 minutos a 4°C, então o álcool foi descartado e o RNA total ressuspendido em 20 µl água livre de RNase e as amostras 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% contendo brometo de etídeo. O RNA total foi quantificado em NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) com comprimento de onda 260 e 280 nm por espectrometria em 260nm e todas as amostras foram tratadas com DNase (Invitrogen) para evitar contaminação com DNA genômico.

Todas as soluções utilizadas para os procedimentos descritos foram preparadas com água livre de RNase tratada com 0,01% de DEPC e, além disso, os materiais plásticos e vidraria também receberam tratamento contra RNase.

3.6.2. Síntese do DNA Complementar (cDNA)

Para obtenção de DNA, o RNA total foi submetido à reação de transcrição reversa utilizando-se o High Capacityc DNA 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°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.

3.6.3. PCR em Tempo Real Quantitativo

Para a avaliação das CPMs (CPMI, CPMIIa, CPMIIb e CPMIIx), da calcineurina e miostatina foi utilizado um termociclador 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems Carlsbad, CA, USA), fluoróforo SYBR® Green I (SYBR Green Master Mix®, Applied Biosystems) e primers (oligonucleotídeos iniciadores) específicos para as proteínas calcineurina e miostatina, bem como para as diferentes isoformas das cadeias pesadas de miosina.

Tabela 2. Sequência de primers utilizados para análise da expressão gênica

Primers	GenBank	Forward	Reverse
Miostatina	NM_005259.2	CTA CCACGGAAACAATCATT	AGCAACATTTGGGCTTTCCAT
Calcineurina	D90035.1	AGGCGATTGATCCCAAGTTG	GGAAATGGAACGGCTTTTCCAC
MHC I	X15939	GAA TGG CAA GAC GGT GAC TGT	GGAAGC GTA CCT CTC CTT GAG A
MHC IIa	XM_340817	ATG ACA ACT CCT CTC GCT TTG G	TTA AGC TGG AAA GTG ACC CGG
MHC IIx	XM_213345	CCA ATG AGA CTA AGA CGC CTG G	GCT ATC GAT GAA TTG TCC CTC G
MHC IIb	NM_019325.1	GAAC ACG AAG CCT GTC ATC CA	AGG TTT CGA TAT CTG CGG AGG

GAPDH	NM_002046	GCATCCTGGGCTACACTGA	CCACCACCCTGTTGCTGTA
-------	-----------	---------------------	---------------------

Para realizar a comparação dos resultados entre os grupos experimentais, as unidades arbitrárias foram calculadas da seguinte forma:

$$\text{Unidade Arbitrária} = 2^{-\Delta\Delta\text{CT}},$$

Sendo $\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT amostra} - \Delta\text{CT controle}$ (CT: "thresholdcycle").

3.7. Análise Estatística

Os valores foram testados quanto a sua normalidade pelo teste Kolmogorov-Smirnov e os dados foram expressos em média e desvio-padrão, pois aderiram à curva de Gauss. A comparação entre os grupos foi realizada pela ANOVA (dados paramétricos). 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 BioStat 5.0.

4. RESULTADOS

4.1. Artigo a ser submetido à revista *Lasers in Surgery and Medicine*.

Fotobiomodulação em diferentes momentos na expressão gênica das cadeias pesadas de miosina, calcineurina e miostatina durante o processo de reparo do músculo esquelético de ratos

RESUMO

A maturação de novas fibras musculares e a recuperação do desempenho funcional do tecido lesado dependem de proteínas envolvidas no trofismo muscular, tais como a miostatina (MSTN) e a calcineurina (CaN), que podem influenciar as características fenotípicas das fibras determinadas pela composição isoformal das Cadeias Pesadas de Miosina (CPMs) presente na unidade contrátil do músculo. A fotobiomodulação (PBM) com laser de baixa potência (LBP) durante o processo de reparo muscular tem sido destaque devido aos vários efeitos positivos. Os benefícios também foram demonstrados com irradiação prévia às lesões. No entanto, existem poucos estudos sobre irradiação prévia associada à irradiação pós e não há literatura descrevendo os efeitos da LBP sobre a expressão de calcineurina, miostatina e CPMs. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do LBP aplicado previamente à lesão muscular, associada ou não à irradiação pós sobre a expressão gênica de calcineurina, miostatina e CPMs durante o processo de reparo muscular. Foram utilizados 65 ratos Wistar, divididos em quatro grupos: Controle (n = 5); Lesão (n = 20); LBP + Lesão (n = 20) e LBP + Lesão + LBP (n = 20). A lesão foi induzida por criolesão no músculo TA. Os grupos lesionados foram eutanasiados em 1, 3, 7 e 14 dias após a lesão. A irradiação prévia com LBP associada ou não com irradiação pós foi realizada com o laser AsGaAl (780 nm) com os parâmetros: 10J / cm²; 40mW; 10 segundos por ponto; 8 pontos; 3,2 J de energia total. No final do protocolo, os músculos TA foram removidos para análise de expressão gênica de CPMs, calcineurina e miostatina por PCR em tempo real. A comparação entre os grupos foi realizada por ANOVA/Tukey (p<0,05). A irradiação prévia reduziu a expressão de miostatina em dias. A irradiação prévia associada à pós-irradiação reduziu a expressão da calcineurina em 14 dias e aumentou a expressão da miostatina no mesmo período. Quanto à expressão de CPMs, o LBP modulou o processo de reparo muscular principalmente na fase aguda, diminuindo expressão

de CPM I e CPM IIx (LBP pré) em 1 dia e aumentando expressão de CPM IIx em 3 dias (LBP pré e pós-lesão), e não provocando alteração nos níveis de um músculo saudável das outras isoformas. Em conclusão, o LBP foi capaz de modular proteínas importantes para o processo de reparo muscular (CPMs, calcineurina e miostatina) sendo mais evidente seus efeitos quando adotado o regime de aplicação prévia associada à irradiação pós-lesão.

Palavras-chave: Fotobiomodulação, terapia a laser de baixa intensidade, músculo esquelético, regeneração, calcineurina, miostatina, fototerapia.

INTRODUÇÃO

Lesões musculares são comuns e frequentemente afetam atletas, resultando em uma redução de desempenho, perda de competições e até mesmo no afastamento do profissional da modalidade esportiva [Järvinen et al., 1993]. Após uma lesão, há uma série de eventos biológicos que integram o processo de reparação tecidual ocorre para a recuperação funcional do músculo lesionado [Piovesan et al.; 2013]. Estes eventos são divididos em três fases interdependentes: inflamatória, reparação / fibrose e remodelação [Souza et al., 2011]. A maturação de novas fibras musculares e a recuperação do desempenho funcional do tecido lesado dependem de proteínas envolvidas no trofismo muscular, como a miostatina (MSTN) e a calcineurina (Cn) que podem influenciar as características fenotípicas das fibras musculares, que são determinadas pela composição das isoformas das cadeias pesadas de miosina (CPMs), principal proteína presente na unidade contrátil do tecido muscular [Dyar et al., 2015].

Cn pode estar envolvida no ganho e na perda do músculo [Friday et al., 2000] bem como com a mudança no perfil fenotípico das fibras musculares esqueléticas [Dyar et al., 2015]. Quando expressa em maior quantidade, pode afetar as fibras através da indução de uma transição de um fenótipo de contração rápida para um fenótipo de contração lenta [Kielbasa et al., 2011]. A MSTN é um membro da família TGF- β também conhecida como fator de crescimento e diferenciação 8, e é um potente regulador negativo do crescimento muscular [Fedoruk et al., 2008].

No tecido humano, são expressos quatro tipos de isoformas de CPM responsáveis pelas diferenças funcionais do músculo esquelético: fibras de contração lenta tipo I (CPM I) e fibras de contração rápida tipo II subdivididas em tipo IIa (CPM IIa), tipo IIc (CPM IIc - CPM IIx em ratos) e tipo IIb (CPM IIb)

[Choi et al., 2009]. Além de fibras puras, há fibras "híbridas", que expressam duas ou mais isoformas de CPM [Drzymala et al., 2012].

Entre os tipos de tratamentos disponíveis para lesões musculares, a terapia a laser de baixa intensidade (LBI) tem sido destacada por seus efeitos positivos no processo de reparo. Estudos têm demonstrado que a LBP é capaz de beneficiar a regeneração muscular quando aplicado previamente a lesão muscular aguda [Ribeiro et al, 20115; Ribeiro et al; 2016], após lesão [Mesquita-Ferrari et al., 2011; Alves et al., 2014] bem como aplicada previamente, associado ou não com irradiação pós-lesão [Ribeiro et al, 2016].

Quando aplicado após lesão aguda, no modo vermelho o LBP (660 nm; potência de saída de 20 mW, densidade de potência de 500 mW/cm², densidade de energia 5 J/cm², exposição tempo 10 s) demonstrou ser capaz de induzir uma melhor deposição e distribuição de colágeno [Baptista et al., 2011], modular a expressão das citocinas TNF- α e TGF- β [Mesquita-Ferrari et al., 2011] e de promover a angiogênese e reduzir a mionecrose [Souza et al., 2011]. No modo infravermelho o LBP (780 nm; potência de saída de 40 mW, densidade de potência de 1 W/cm² densidade de energia de 10 J/cm² e tempo de exposição de 10 s) demonstrou ser capaz de modular a expressão de os fatores regulatórios miogênicos MyoD e miogenina, e citocina IL-6 [Alves et al., 2016].

A aplicação prévia (imediatamente antes da lesão muscular aguda) do LBP (780 nm; potência de saída de 40 mW, densidade de potência de 1 W/cm² densidade de energia de 10 J/cm² e tempo de exposição de 10 s) demonstrou ser capaz de induzir uma diminuição do infiltrado inflamatório e da mionecrose, induziu um aumento do número de vasos sanguíneos, do número de fibras musculares imaturas e da atividade da MMP-2, além de influenciar promovendo melhor organização e distribuição do colágeno no tecido muscular durante o processo de reparo [Ribeiro et al., 2015]. E quando aplicado pré (imediatamente antes da lesão muscular aguda) e pós lesão aguda, o LBP (780 nm; potência de saída de 40 mW, densidade de potência de 1 W/cm² densidade de energia de 10 J/cm² e tempo de exposição 10 s) demonstrou ser capaz de reduzir o estresse oxidativo [Ribeiro et al., 2015].

Embora o LBP tem demonstrado considerável capacidade para acelerar e modular o processo de reparo tecidual muscular, não há relato na

literatura se este recurso terapêutico é capaz de alterar as características fenotípicas em novas fibras musculares. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi analisar os efeitos da irradiação com LBP aplicada em diferentes momentos sobre a expressão de gênica de isoformas de CPMs (I, IIa, IIx e IIb), MSTN e Cn durante o processo de reparo muscular após criolesão.

MATERIAIS E MÉTODOS

Sessenta e cinco ratos Wistar, com peso médio de 250 g, foram utilizadas para este estudo. Os animais foram mantidos em laboratório na Universidade nove de Julho (UNINOVE), em caixas plásticas adequadas, à temperatura ambiente de 22 ° C, com umidade relativa de 40%, brilho controlado com um ciclo de 12h (claro / escuro), além de alimentos e água ad libitum, em conformidade com as normas regulamentadoras do Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Nove de Julho (AN 25/2014 - Anexo A).

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos experimentais: Grupo Controle, no qual houve apenas remoção do músculo TA (n = 5); Grupo Lesão, no qual foi realizada a criolesão no músculo tibial anterior dos animais, e não receberam tratamento (n = 20); LBP + lesão, irradiação recebida com LBP 780 nm imediatamente antes da criolesão no músculo tibial anterior (n = 20); LBP + lesão + LBP, receberam irradiação com LBP antes da criolesão associada à irradiação pós-lesão até o final do período experimental (n = 20).

Os animais lesados irradiados ou não, foram avaliados nos períodos experimentais de 1, 3, 7 e 14 dias. A irradiação foi realizada diretamente na pele do músculo tibial anterior em oito pontos imediatamente antes da criolesão, conforme descrito anteriormente por Ribeiro et al., 2015.

No grupo LBP + lesão + LBP, a irradiação pré e pós também foi realizada 2 horas após a indução da lesão. E diariamente até o final do

protocolo experimental [Alves et al., 2014, Ribeiro et al., 2016]. Os parâmetros utilizados são descritos na tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros de laser de baixa intensidade

Meio ativo	Arseneto de Gálio e Alumínio (AsGaAl)
Comprimento de onda	780 nm
Área do feixe	0,04 cm ²
Potência média	40 mW
Densidade de potência	1 W/cm ²
Densidade de energia	10 J/cm ²
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 criolesão, os animais foram anestesiados com Ketamina 10% (100 mg/kg) e Xilazina 2% (10 mg/kg). Após a anestesia, a região foi limpa, então foi a tricotomia foi realizada e, em seguida, a irradiação com LBP foi feita antes da criolesão nos grupos irradiados. O músculo tibial anterior do animal foi exposto cirurgicamente e a criolesão foi realizada por duas aplicações (duração de 10 segundos cada) diretamente na superfície

ventral do músculo, utilizando uma haste metálica (3 mm com extremidade plana) previamente resfriada em nitrogênio líquido. Conforme descrito [Miyabara et al, 2005; Alves et al, 2014; Ribeiro et al, 2015; Ribeiro et al, 2016]. Após a indução da lesão, as áreas incisadas foram suturadas com fios de poliamida.

Os animais lesionados irradiados ou não, foram eutanasiados por superdose de anestésicos via intraperitoneal a 1, 3, 7 e 14 dias. Os animais do Grupo Controle foram eutanasiados no primeiro dia do experimento. Os músculos TA foram removidos e as amostras musculares foram analisadas quanto à expressão de genes e proteínas.

Análise da expressão gênica de CPM I, CPM IIa, CPM IIb e CPM IIx, calcineurina e miostatina por PCR em tempo real.

As amostras musculares foram maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas com 1 ml de reagente TRIzol (Invitrogen, São Paulo, Brasil) para extração de RNA total. Em seguida, o RNA total foi quantificado por espectrofotometria e todas as amostras foram tratadas com DNase (Invitrogen) para evitar a contaminação com DNA genômico. Para obter o cDNA, o RNA total foi submetido à reação de transcrição inversa usando o High Capacity DNA Reverse Transcriptions Kit (Applied Biosystems) incubado num termociclador (Thermocycler Mastercycler Gradient, Eppendorf AG, Hamburgo, Alemanha). Um Thermocycler 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems Carlsbad, CA, EUA), SYBR Green Master (SYBR Green Master Mix®, Applied Biosystems) e primers, oligonucleotídeos iniciadores específicos para a calcineurina, miostatina, e para as diferentes isoformas de cadeia pesada de miosina (Tabela 2) foram utilizados para a avaliação da expressão gênica. A quantificação foi realizada utilizando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Tabela 2. Descrição das sequências de primers utilizados

Primers	GenBank	Forward	Reverse
----------------	----------------	----------------	----------------

Miostatina	NM_005259.2	CTA CCACGGAAACAATCATT	AGCAACATTTGGGCTTTCCAT
Calcineurina	D90035.1	AGGCGATTGATCCCAAGTTG	GGAAATGGAACGGCTTTTCCAC
MHC I	X15939	GAA TGG CAA GAC GGT GAC TGT	GGAAGC GTA CCT CTC CTT GAG A
MHC IIa	XM_340817	ATG ACA ACT CCT CTC GCT TTG G	TTA AGC TGG AAA GTG ACC CGG
MHC IIx	XM_213345	CCA ATG AGA CTA AGA CGC CTG G	GCT ATC GAT GAA TTG TCC CTC G
MHC IIb	NM_019325.1	GAAC ACG AAG CCT GTC ATC CA	AGG TTT CGA TAT CTG CGG AGG
GAPDH	NM_002046	GCATCCTGGGCTACACTGA	CCACCACCCTGTTGCTGTA

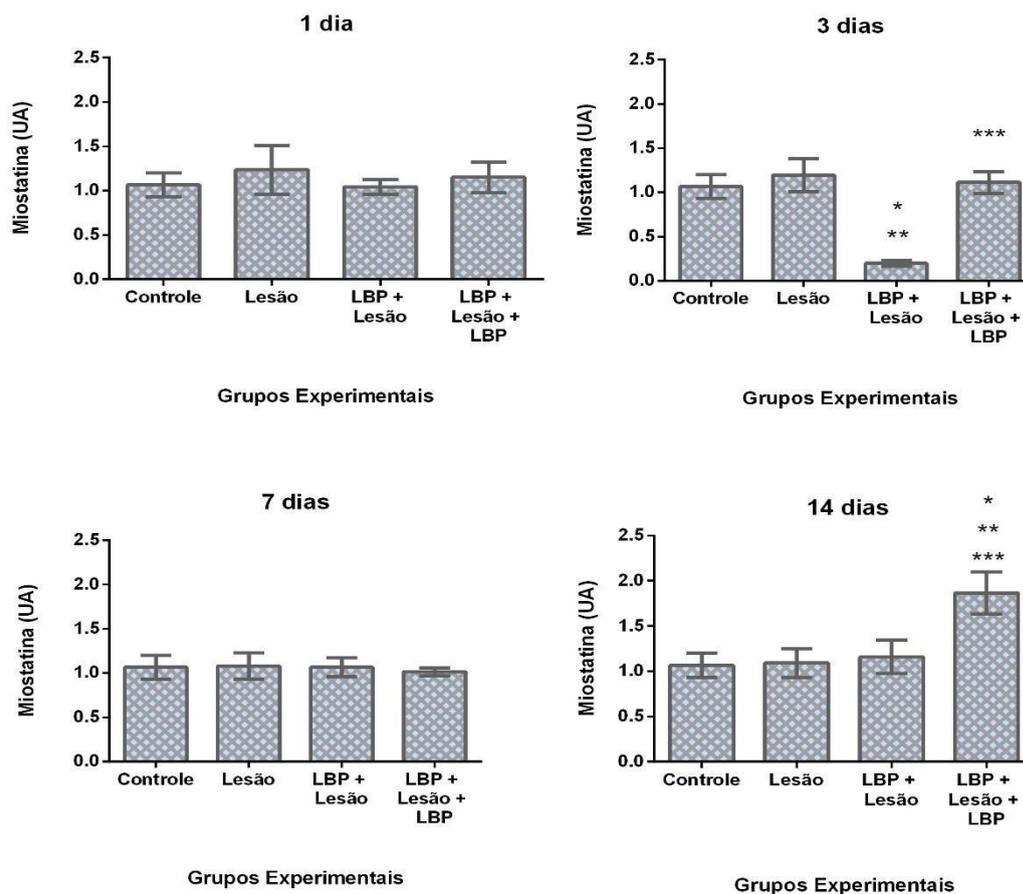
Análise Estatística

Os valores foram testados quanto à sua normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e os dados foram expressos como média e erro padrão da média por aderência à curva de Gauss. A comparação entre os grupos foi realizada por ANOVA (dados paramétricos). O teste de Contraste (Post-Hoc) utilizado foi Tukey. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos, desde $p \leq 0,05$ e foram analisados pelo programa BioStat 5.0.

RESULTADOS

Expressão gênica de Miostatina

Os resultados demonstram que, após 3 dias, houve uma redução dos níveis de mRNA de miostatina no grupo irradiado previamente em comparação aos grupos controle e lesão sem irradiação. Após 14 dias, a irradiação prévia associada à irradiação pós induziu um aumento da expressão da miostatina em

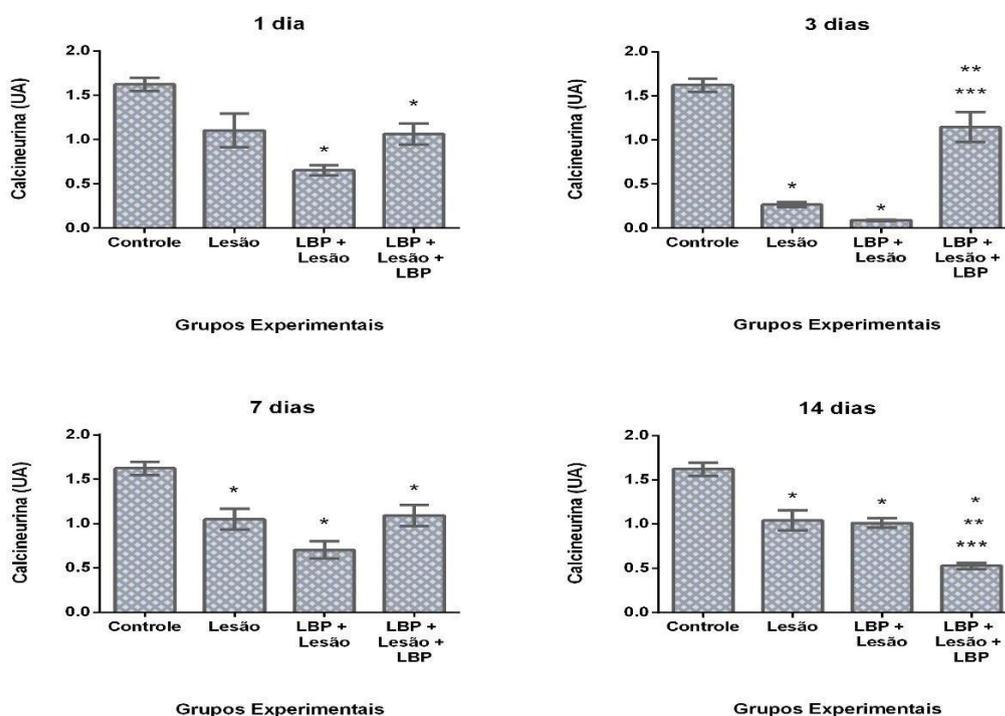


relação aos outros grupos. Não houve diferença entre os grupos experimentais após 1 e 7 dias (figura 1).

Figura 1. Expressão gênica de miostatina em 1, 3, 7 e 14 dias após lesão aguda no músculo tibial anterior. Dados expressos em média e erro padrão da média (ANOVA / Tukey). * P <0,05 vs grupo de controle. ** p <0,05 vs grupo lesão. *** p<0,05 vs LBP + Lesão.

Expressão gênica de Calcineurina

Os resultados demonstram que após 1 dia houve uma redução dos níveis de RNAm de calcineurina quando comparados com o grupo de controle com a irradiação prévia e prévia associada à pós. Após 3 dias, a expressão de calcineurina diminuiu no Grupo Lesão e no irradiado previamente em relação ao grupo de controle. Porém neste mesmo período, houve um aumento na expressão no grupo irradiado pré e pós-lesão comparado com o Grupo Lesão e irradiado previamente. Após 7 dias, a expressão de calcineurina diminuiu no Grupo Lesão, no grupo irradiado previamente e no grupo com irradiação pré e pós em relação ao grupo de controle. Já após 14 dias, houve diminuição na expressão de calcineurina no Grupo Lesão, no grupo irradiado previamente e no grupo com irradiação pré e pós em relação ao grupo de controle. No mesmo período houve também diminuição desta expressão no grupo irradiado pré e



pós-lesão em relação ao Grupo Lesão e no grupo irradiado previamente (figura 2).

Figura 2. Expressão gênica de calcineurina em 1, 3, 7 e 14 dias após lesão aguda no músculo tibial anterior. Dados expressos em média e erro padrão da média (ANOVA / Tukey). * $P < 0,05$ vs grupo de controle. ** $p < 0,05$ vs grupo lesão. *** $p < 0,05$ vs LBP + Lesão.

Expressão gênica de CPM I

Os resultados demonstram que, após 1 dia, houve um aumento nos níveis de RNAm de CPM I em relação ao grupo de controle. No mesmo período, houve uma redução da expressão de CPM I no grupo irradiado previamente comparado com o grupo lesão. Contudo, o grupo que recebeu irradiação pré e pós-lesão mostrou um aumento na expressão de CPM I em relação ao grupo controle e ao grupo irradiado previamente. Após 3 dias, houve um aumento na expressão de CPM I no grupo irradiado pré e pós-lesão em relação ao grupo previamente irradiado. Após 7 e 14 dias não houve diferença entre os grupos experimentais (figura 3).

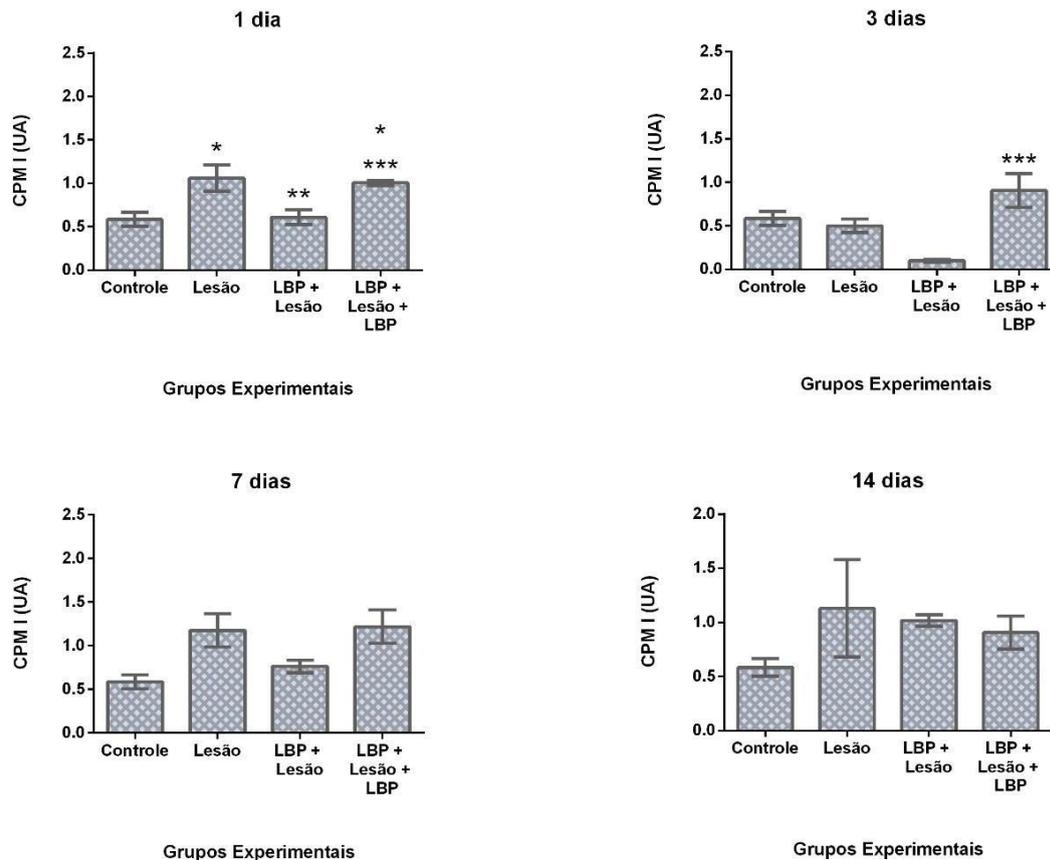


Figura 3. Expressão gênica de CPM I em 1, 3, 7 e 14 dias após lesão aguda no músculo tibial anterior. Dados expressos em média e erro padrão da média (ANOVA / Tukey). * $P < 0,05$ vs grupo de controle. ** $p < 0,05$ vs grupo lesão. *** $p < 0,05$ vs LBP + Lesão.

Expressão gênica de CPM IIa

Os resultados demonstram que, após 1 dia houve redução da expressão de CPM IIa no grupo irradiado previamente em relação ao grupo controle. Após 3 dias, houve diminuição na expressão do CPM IIa nos grupos lesão e irradiado previamente em relação ao grupo de controle, e um aumento desta expressão no grupo irradiado pré e pós-lesão em relação ao grupo irradiado previamente. Após 7 e 14 dias, não houve diferença entre os grupos experimentais (figura 4).

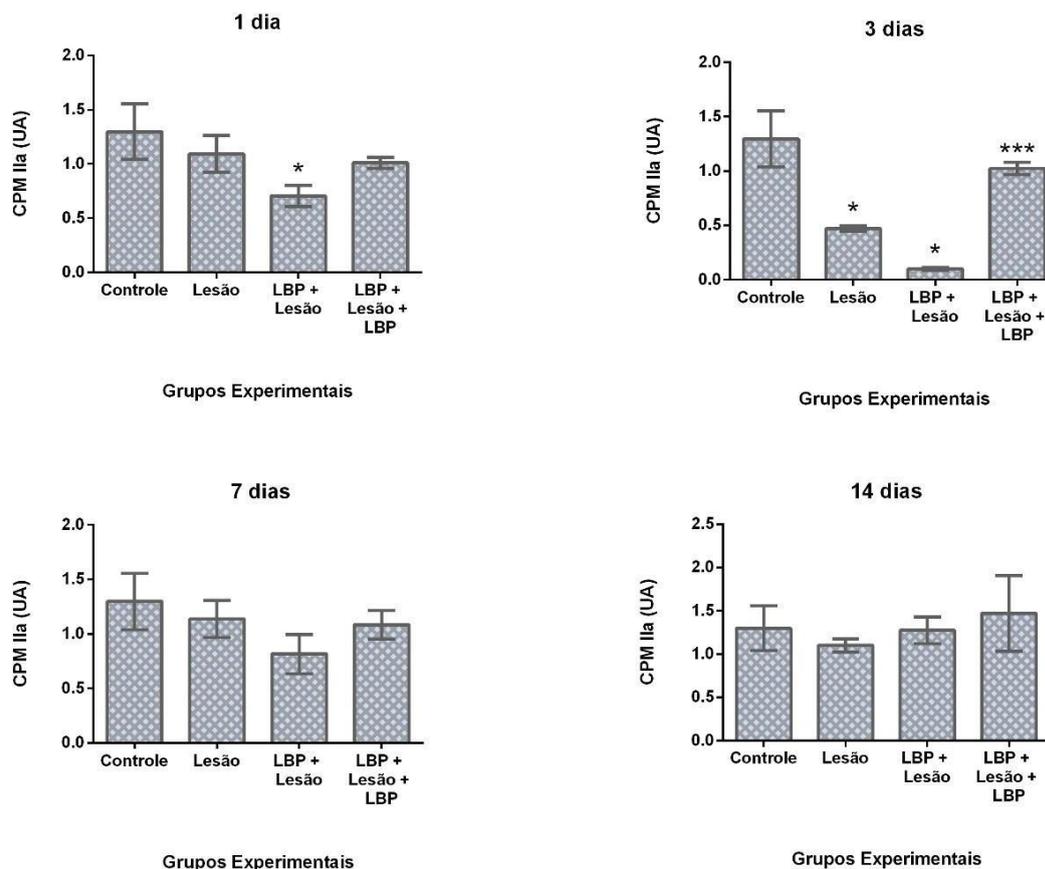


Figura 4. Expressão gênica de CPM IIa em 1, 3, 7 e 14 dias após lesão aguda no músculo tibial anterior. Dados expressos em média e erro padrão da média (ANOVA / Tukey). * $P < 0,05$ vs grupo de controle. ** $p < 0,05$ vs grupo lesão. *** $p < 0,05$ vs LBP + Lesão.

Expressão gênica de CPM IIx

Os resultados mostram que em 1 dia houve redução da expressão de CPM IIx no grupo irradiado previamente em comparação com os grupos controle e lesão, enquanto a irradiação pré e pós-lesão mostrou um aumento na expressão de CPM IIx em relação ao grupo irradiado previamente. Após 3 dias, houve uma diminuição na expressão de CPM IIx no grupo lesão e irradiado previamente em comparação com o grupo controle e um aumento desta expressão de no grupo pré e pós-lesão em comparação com o grupo lesão e irradiado previamente. Entretanto, houve diminuição na expressão de

CPM IIx no grupo irradiado pré e pós-lesão em relação aos outros grupos após 14 dias. Após 7 dias, não houve diferença significativa entre os grupos experimentais (figura 5).

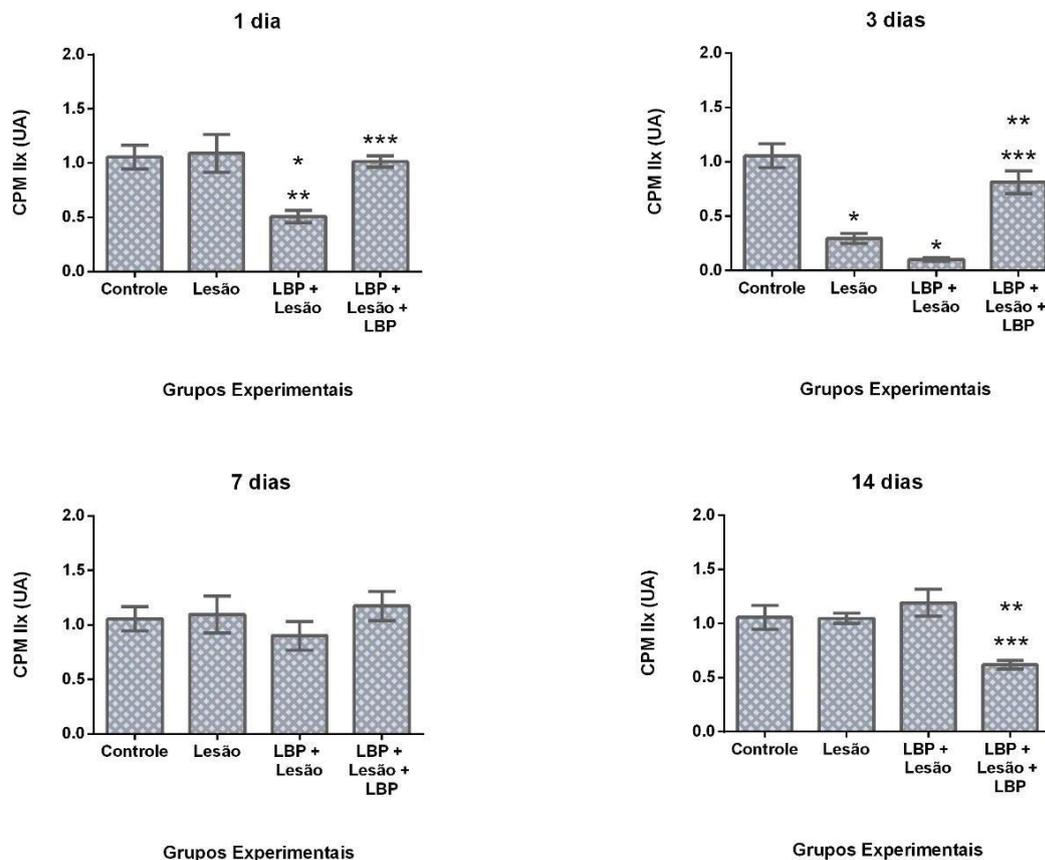


Figura 5. Expressão gênica de CPM IIx em 1, 3, 7 e 14 dias após lesão aguda no músculo tibial anterior. Dados expressos em média e erro padrão da média (ANOVA / Tukey). * P <0,05 vs grupo de controle. ** p <0,05 vs grupo lesão. *** p <0,05 vs LBP + Lesão.

Expressão gênica de CPM IIb

Os resultados demonstram que em 3 dias houve uma diminuição na expressão de CPM IIb nos grupos lesão e irradiado previamente em relação ao grupo controle e um aumento desta expressão no grupo irradiado pré e pós lesão em relação ao grupo irradiado previamente neste mesmo período. Não houve diferença na expressão de CPM IIb entre os grupos experimentais após 1, 7 e 14 dias (figura 6).

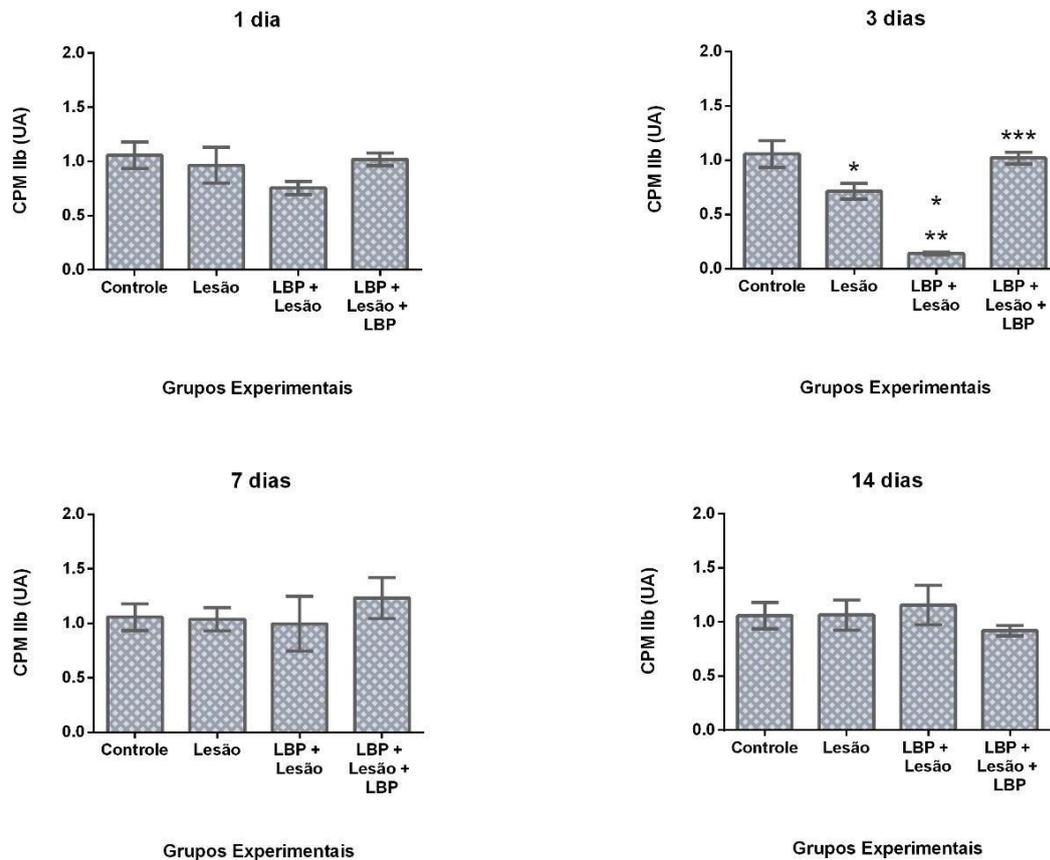


Figura 6. Expressão gênica de CPM IIb em 1, 3, 7 e 14 dias após lesão aguda no músculo tibial anterior. Dados expressos em média e erro padrão da média (ANOVA / Tukey). * $P < 0,05$ vs grupo de controle. ** $p < 0,05$ vs grupo lesão. *** $p < 0,05$ vs LBP + Lesão.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Lesões musculares ocorrem com grande frequência, e são muito recorrentes nos esportes podendo levar à diminuição no desempenho, o que pode resultar em perda de competições e, em muitos casos, no afastamento do profissional evidenciando que um tratamento eficaz é uma prioridade na prática clínica e no ambiente esportivo [Järvinen et al., 1993]. Embora não exista

consenso sobre o melhor tratamento para as lesões musculares, a terapia com LBP tem demonstrado efeitos positivos sobre o processo de reparo muscular em diferentes modelos experimentais e em estudos clínicos.

O objetivo do presente estudo foi buscar verificar qual a influência da aplicação prévia do LBP, no músculo ainda saudável, induzir uma lesão aguda que mimetiza uma contusão e então verificar como ocorreria o reparo nesta situação e também na presença de um tratamento adicional com LBP após esta lesão principalmente no que se refere a expressão de algumas proteínas chave para o processo de reparo muscular.

A miostatina é uma proteína que possui um mecanismo de ação relacionado ao crescimento muscular e pode ser um regulador negativo do desenvolvimento do músculo esquelético [Fedoruk et al., 2008]. Além de ser um regulador de crescimento, a miostatina pode inibir o desempenho de fatores de transição, como MyoD e miogenina [Piovesan et al., 2012]. O presente estudo demonstra que o comportamento da expressão do gene da miostatina varia de acordo com o momento de aplicação do LBP. A aplicação prévia do LBP foi capaz de reduzir a expressão de miostatina em três dias após a lesão, porém esta expressão foi aumentada em 14 dias, quando o LBP foi aplicado antes e após lesão. Esta diminuição pode ter ocorrido devido ao fato de que o processo de reparo é avançado no final do processo, sem a necessidade de crescimento muscular, justificando o aumento da expressão desta proteína neste período. Alves et al., 2016 avaliaram o efeito de LBP (780 nm, 40 mW, 3,2J) antes e após a lesão, e demonstraram que apenas o LBP aplicado após lesão aumentou a expressão de RNAm de MyoD aos 3 e 7 dias assim como a expressão de RNAm de miogenina aos 14 dias.

A calcineurina, entre suas participações nos processos fisiológicos, está envolvida na mudança do fenótipo da fibra. Quando ativada, a calcineurina participa na regulação da transcrição gênica de fibras musculares, interferindo na alteração no fenótipo da fibra, induzindo uma transição de um fenótipo de contração rápida para um fenótipo de contração lenta [Kielbasa et al., 2011]. O papel da calcineurina no fenótipo da fibra tem sido descrito há alguns anos, Chin et al., 1998 relataram que a expressão do gene específico da fibra nos músculos esqueléticos é controlada por uma via de sinalização que envolve a calcineurina, e demonstraram que a inibição de sua atividade promove

mudança no fenótipo de fibra lenta para um fenótipo de fibra rápida. Além de influenciar a mudança no fenótipo da fibra, Sakuma et al., 2010 demonstraram que a calcineurina é um potente regulador do remodelamento muscular, pois aumenta a diferenciação através da regulação positiva da miogenina e regulação negativa da miostatina. O presente estudo demonstra que o comportamento da expressão do gene da calcineurina também variou de acordo com a forma de aplicação do laser de baixa potência. O LBP aplicado previamente a lesão reduziu a expressão de calcineurina aos 1, 3, 7 e 14 dias. Quando aplicada antes e após a lesão, esta expressão aumentou em relação à aplicação prévia em 1, 3 e 7 dias, mas esta expressão foi reduzida em relação à aplicação prévia em 14 dias.

As CPMs são parte da estrutura da proteína muscular principal (miosina) e estão envolvidas na taxa de força desenvolvida [Oe et al., 2016] e na velocidade máxima de encurtamento das pontes cruzadas de actina e miosina, (Trevino et al., 2016). Além de serem as cadeias dominantes da miosina, as CPMs são consideradas responsáveis pelas diferenças funcionais do músculo esquelético [Schiaffino & Reggiani, 2011]. O comportamento de CPMs frente a irradiação com LBP ainda não está claro na literatura. O músculo tibial anterior, analisado no presente estudo, possui as quatro isoformas de CPM, porém de acordo com a literatura existe uma predominância das isoformas de contração rápida (tipo II) no músculo TA. Em ordem de predominância no TA, CPM IIa é a isoforma expressa em maior quantidade, seguida por IIx, IIb e a menor quantidade expressa é a CPM I [Drzymala et al., 2012]. Como a calcineurina influencia a transição de fenótipo rápido para lento, a expressão de CPM seguiria as transições IIa para IIx e I para IIa [Boff, 2008].

O presente estudo demonstra que o comportamento da expressão das CPM variou amplamente de acordo com a aplicação do laser de baixa potência.

A irradiação prévia diminuiu a expressão de CPM IIx em 1 dia e a expressão de CPM IIb em 3 dias, enquanto a irradiação pré e pós-lesão aumentou a expressão de CPM IIx em 3 dias, diminuindo a expressão desta mesma isoforma (CPM IIx) em 14 dias. Dos quatro tipos de CPMs, o mais rápido é o tipo IIb, e deste houve diminuição somente com irradiação prévia

após 3 dias, nos demais períodos, sua expressão foi mantida nos níveis encontrados em músculo saudável/controle.

Estudos com irradiação prévia também mostraram efeitos positivos no processo de reparo muscular, pois podem promover um efeito protetor no músculo, uma vez que esta influência na atividade celular inibe ou estimula certas funções químicas e fisiológicas do músculo. Ribeiro et al., 2015 demonstraram que o LBP (AsGaAl 780 nm; 10 J / cm²; 40 mW; 10 s por ponto; 8 pontos; 3,2 J) quando aplicada antes da criolesão reduziu o infiltrado inflamatório após três dias, mionecrose após um e três dias e aumentou o número de vasos sanguíneos após três e sete, também se observou um aumento na atividade da MMP-2 e melhor organização, distribuição e deposição de colágeno. Ribeiro et al., 2016 demonstraram que a irradiação prévia associada a irradiação pós modularam positivamente a atividade de enzimas antioxidantes e reduziram marcadores de estresse durante o processo de reparo muscular, aplicado tanto no vermelho quanto no infravermelho.

Em conclusão, a fotobiomodulação com laser de baixa potência foi capaz de modular positivamente o processo de reparo muscular em relação à funcionalidade da fibra e trofismo. O LBP diminuiu a expressão da calcineurina na fase crônica, quando sua função não fica tão evidente, e aumentou a expressão da miostatina em 14 dias, período no qual não há mais necessidade de crescimento muscular, mantendo assim o equilíbrio entre essas duas proteínas. Foi também capaz de modular positivamente a expressão das isoformas de CPMs na fase aguda, com o aumento da expressão de CPM IIx em 3 dias, e mantendo a expressão das outras isoformas em um nível próximo ao encontrado em músculo saudável/controle. Contudo, o LBP modulou positivamente o processo de reparo, sendo a irradiação prévia associado a irradiação pós-lesão a melhor forma de aplicação, demonstrando que a PBM é um eficiente contribuidor para o sucesso do processo de regeneração muscular.

REFERÊNCIAS

ALVES, A.N.; FERNANDES, K.P.S.; MELO, A.V.; YAMAGUCHI, R.Y.; FRANÇA, C.M.; TEIXEIRA, D.F.; BUSSADORI, S.K.; NUNES, F.D.;

MESQUITA-FERRARI, R.A. Modulating effect of low-level laser therapy on fibrosis in the repair process of the tibialis anterior muscle in rats. *Lasers Medical Science*, v. 29, n. 2, p. 813-821, 2014.

ALVES, A.N.; RIBEIRO, B.G.; FERNANDES, K.P.S.; SOUZA, N.H.C.; ROCHA, L.A.; NUNES, F.D. 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. *Laser in Medical Science*, p. 1-7, 2016.

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

BOFF, S. R. The muscle fiber and the factors that interfere with its phenotype. *Acta Fisiológica*, v. 15, n.2, 2008.

BUCKINGHAM, M.; MONTARRAS, D. Skeletal muscle stem cells. *Current Opinion in Genetics & Development*, v. 18, p. 330-336, 2008.

CHIN, E.R.; OLSON, E.N.; RICHARDSON, J.A.; YANG, Q.; HUMPHRIES, C.; SHELTON, J.M.; WU, H.; ZHU, W.; BASSEL-DUBY, R.; WILLIAMS, R.S. A calcineurin-dependent pathway controls skeletal muscle fiber type. *Genes e Development*, v. 12, n. 16, p. 2499-509, 1998.

CHOI, Y.M.; KIM, B.C. Muscle fiber characteristics, myofibrillar protein isoforms, and meat quality. *Livestock Science*, v. 122, p. 105-18, 2009.

CRESSONI, M.D.; DIB GIUSTI, H.H.; CASAROTTO, R.A.; ANARUMA, C.A. The effects of a 785-nm AlGaInP laser on the regeneration of rat anterior tibialis muscle after surgically-induced injury. *Photomedicine and Laser Surgery*, v. 26, n. 5, p. 461-66, 2008.

DRZYMALA-CELICHOWSKA H, KAROLCZAK J, REDOWICZ MJ, BUKOWSKA D. The content of myosin heavy chains in hindlimb muscles of female and male rats. *J PhysiolPharmacol*, v. 63, n. 2, p.187-93, 2012.

FEDORUK, M.N., RUPERT, J.L. Myostatin inhibition: a potential performance enhancement strategy? *Scand J Med Sci Sports*, v. 18 n. 2, p.123–31, 2008.

FERNANDES, K.P.S.; ALVES, A.N.; NUNES, F. D.; SOUZA, N.H.C.; SILVA, J.A.; SANDRA KALIL BUSSADORI, S.K.; MESQUITA-FERRARI, R.A. Effect of photobiomodulation on expression of IL-1 β in skeletal muscle following acute injury. *Lasers in Medical Science*, v. 28, ed. 3, 2013.

JÄRVINEN, M.J.; LEHTO, M.U. The effects of early mobilisation and immobilisation on the healing process following muscle injuries. *Sports Medicine*, v. 15, n. 2, p. 78-89, 1993.

KIELBASA, O.M.; REYNOLDS, J.G.; WU, C.L.; SNYDER, C.M.; WEILER, H.; KANDARIAN, S.; NAYA, F.J. Myospryn is a calcineurin-interacting protein that negatively modulates slow-fiber-type transformation and skeletal muscle regeneration. *Faseb Journal*, v. 25, n. 7, p. 2276-2286, 2011.

LEE, E.J.; JAN, A.T.; BAIG, M.H.; Fibromodulin: a master regulator of myostatin controlling progression of satellite cells through a myogenic program. *Faseb Journal*, 2016.

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

OE, M.; OJIMA, K.; NAKAJIMA, I.; CHIKUNI, K.; SHIBATA, M.; MUROYA, S. Distribution of tropomyosin isoforms in different types of single fibers isolated from bovine skeletal muscles. *Meat Science*, v. 118, p. 129-132, 2016.

PICARD, B.; BARBOIRON, C.; CHADEYRON, D.; JURIE, C. Protocol for high-resolution electrophoresis separation of myosin heavy chain isoforms in bovine skeletal muscle. *Electrophoresis*, v. 32, n. 14, p. 1804-1806, 2011.

PIOVESAN, R.F.; FERNANDES, K.P.S.; ALVES, A.N.; TEIXEIRA, V.P.; SILVA, J.R.J.A.; MARTINS, M.D.; ALBERTINI, R.; BUSSADORI, S.K.; MESQUITA-FERRARI, R.A. Effect of nandrolone decanoate on skeletal muscle repair. *International Journal of Sports Medicine*, v. 34, n. 1, p. 87-92, 2013.

RIBEIRO, B.G. Efeito da laserterapia prévia sobre o reparo do músculo esquelético de rato. [Dissertação de Mestrado]. São Paulo, 2013.

RIBEIRO, B.G.; ALVES, A.N.; FERNANDES, K.P.S.; CANTERO, T.M.; FRANÇA, C.M.; BUSSADORI, S.K.; TEIXEIRA, D.F.; MESQUITA-FERRARI, R.A. The effect of low-level laser therapy (LLLT) applied prior to muscle injury. *Lasers in Surgery and Medicine*, v. 6, 2015.

RIBEIRO, B.G.; ALVES, A.N.; DOS SANTOS, L.A.; CANTERO, T.M.; FERNANDES, K.P.S.; DIAS, D.S.; BERNARDES, N. DE ANGELIS, K.; MESQUITA-FERRARI, R.A. 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*, v. 15, p. 11, 2016.

SAKUMA, K.; YAMAGUCHI, A. The functional role of calcineurin in hypertrophy, regeneration and disorders of skeletal muscle. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, v. 2010, p. 721,219, 2010.

SCHIAFFINO, S.; REGGIANI, C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiological Reviews*, v. 91, n. 4, p. 1447-531, 2011.

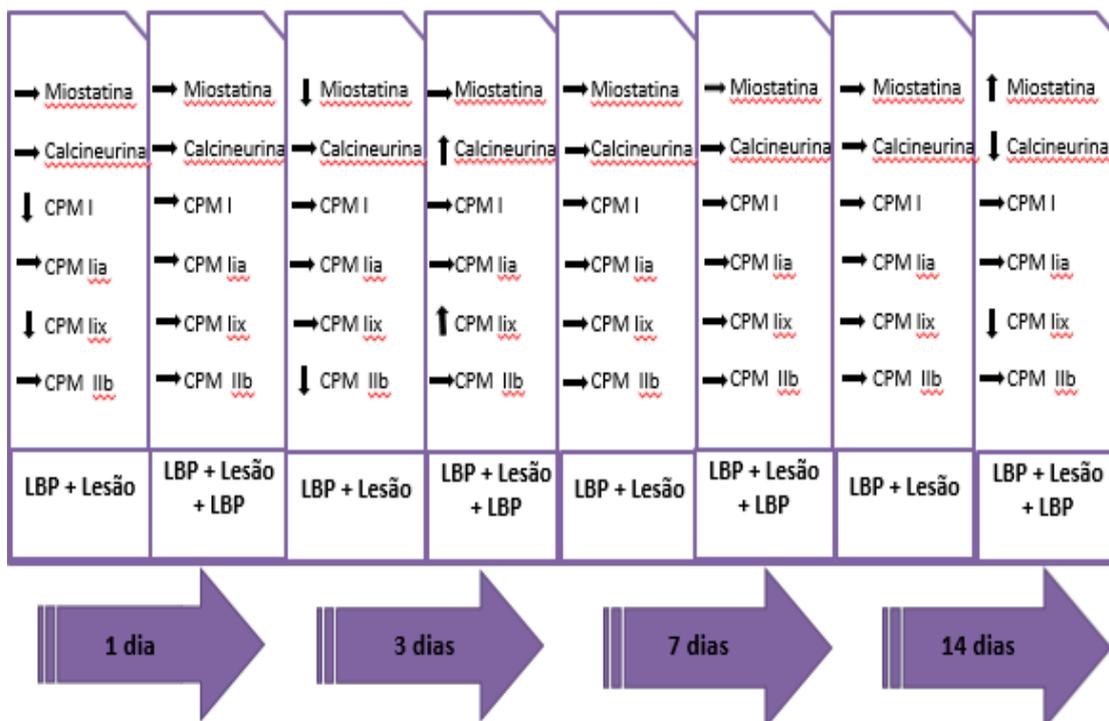
SERRANO, A.L.; MURGIA, M.; PALLAFACCHINA, G.; CALABRIA, E.; CONIGLIO, P.; LOMO, T, SCHIAFFINO, S. Calcineurin controls nerve activity-dependent specification of slow skeletal muscle fibers but not muscle growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 98, n. 23, p. 13108-13, 2001.

SOUZA, T.O.; MESQUITA, D.A.; FERRARI, R.A.; DOS SANTOS PINTO, D. J.R; CORREA, L.; BUSSADORI, S.K.; FERNANDES, K.P.; MARTINS, M.D. Phototherapy with low-level laser affects the remodeling of types I and III collagen in skeletal muscle repair. *Lasers in Medical Science*, v. 26, n. 6, p. 803-814, 2011.

TREVINO, M.A.; HERDA, T.J.; FRY, A.C.; GALLAGHER, P.M.; VARDIMAN, J.P.; MOSIER, E.M.; MILLER, J.D. The influence of the contractile properties of muscle on motor unit firing rates during a moderate contraction intensity in vivo. *Journal of Neurophysiology*, v. 4, 2016.

5. SUMÁRIO DOS RESULTADOS

LASER DE BAIXA POTÊNCIA (780 nm)



6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo avaliou os efeitos do laser de baixa potência previamente a lesão muscular aguda, e seus efeitos aplicado pré e pós-lesão sobre a regeneração do músculo esquelético avaliando importantes proteínas para o processo de reparo muscular, a miostatina, a calcineurina e as isoformas de CPMs. Diante dessas análises, o LBP demo capaz de modular positivamente o processo de reparo muscular, sendo um eficiente contribuidor para o processo de regeneração, contudo são poucos os estudos sobre os efeitos do LBP quando aplicado previamente e quando aplicado pré e pós-lesão durante regeneração muscular e, para maior entendimento dos mecanismos envolvidos nesse processo, ainda são necessário novos estudos sobre esta associação (irradiação pré e pós), além de investigação se há alterações nesses fatores devido à diferença entre o tempo de aplicação prévia do laser e indução da lesão.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ahmad CS, Redler LH, Ciccotti MG, Maffulli N, Longo UG, Bradley J. Evaluation and management of hamstring injuries. *Am J Sports Med* [Internet]. 2013;41(12):2933–47. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23703914>
2. JARVINEN MJ, LEHTO MUK. THE EFFECTS OF EARLY MOBILIZATION AND IMMOBILIZATION ON THE HEALING-PROCESS FOLLOWING MUSCLE INJURIES. *Sport Med*. 1993;15(2):78–89.
3. Buckingham M, Montarras D. Skeletal muscle stem cells. *Curr Opin Genet Dev*. 2008;18:330–6.
4. Tidball JG. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* [Internet]. 2005;288(2):R345-53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15637171>
5. 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.
6. Schiaffino S, Reggiani C. Fiber Types in Mammalian Skeletal Muscles. *Physiol Rev*. 2011;91(4):1447–531.
7. Trevino MA, Herda TJ, Fry AC, Gallagher PM, Vardiman JP, Mosier EM, et al. Influence of the contractile properties of muscle on motor unit firing rates during a moderate-intensity contraction in vivo. *J Neurophysiol* [Internet]. 2016 Aug 1;116(2):552–62. Available from: <http://jn.physiology.org/lookup/doi/10.1152/jn.01021.2015>
8. Serrano a L, Murgia M, Pallafacchina G, Calabria E, Coniglio P, Lømo T, et al. Calcineurin controls nerve activity-dependent specification of slow skeletal muscle fibers but not muscle growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(23):13108–13.
9. Choi YM, Kim BC. Muscle fiber characteristics, myofibrillar protein isoforms, and meat quality. Vol. 122, *Livestock Science*. 2009. p. 105–18.

10. Dyar KA, Ciciliot S, Tagliazucchi GM, Pallafacchina G, Tothova J, Argentini C, et al. The calcineurin-NFAT pathway controls activity-dependent circadian gene expression in slow skeletal muscle. *Mol Metab.* 2015;4(11):823–33.
11. Friday BB, Horsley V, Pavlath GK. Calcineurin activity is required for the initiation of skeletal muscle differentiation. *J Cell Biol.* 2000;149(3):657–65.
12. Kielbasa OM, Reynolds JG, Wu C-L, Snyder CM, Cho MY, Weiler H, et al. Myospryn is a calcineurin-interacting protein that negatively modulates slow-fiber-type transformation and skeletal muscle regeneration. *FASEB J* [Internet]. 2011;25(7):2276–86. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3114531&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
13. Lee EJ, Jan AT, Baig MH, Ashraf JM, Nahm S-S, Kim Y-W, et al. Fibromodulin: a master regulator of myostatin controlling progression of satellite cells through a myogenic program. *FASEB J* [Internet]. 2016 Aug 1;30(8):2708–19. Available from: <http://www.fasebj.org/cgi/doi/10.1096/fj.201500133R>
14. McPherron AC, Lee SJ. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1997 Nov 11;94(23):12457–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9356471>
15. Fedoruk MN, Rupert JL. Myostatin inhibition: a potential performance enhancement strategy? *Scand J Med Sci Sports* [Internet]. 2008 Feb 3;18(2):123–31. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-0838.2007.00759.x>
16. Oliveira NM I., Gava AD, Salvini TF. O efeito da crioterapia e compressão interminente no músculo lesado de ratos: uma análise morfométrica. *Rev Bras Fisioter.* 2007;11(5):403–9.
17. Barroso GC, Thiele ES. Lesão muscular nos atletas. *Rev Bras Ortop* [Internet]. 2011;46(4):354–8. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-36162011000400002&lng=pt&nrm=iso&tlng=en
18. Cressoni MDC, Giusti HHKD, Casarotto RA, Anaruma CA. The Effects of

- a 785-nm AlGaInP Laser on the Regeneration of Rat Anterior Tibialis Muscle After Surgically-Induced Injury. *Photomed Laser Surg* [Internet]. 2008 Oct;26(5):461–6. Available from:
<http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/pho.2007.2150>
19. Leal Junior ECP, Lopes-Martins RÁB, Baroni BM, De Marchi T, Taufer D, Manfro DS, et al. Effect of 830 nm low-level laser therapy applied before high-intensity exercises on skeletal muscle recovery in athletes. *Lasers Med Sci*. 2009;24(6):857–63.
 20. 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- α and TGF- β in skeletal muscle during the repair process. *Lasers Med Sci*. 2011;26(3):335–40.
 21. 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.
 22. 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.
 23. Huard J, Li Y, Fu FH. Muscle injuries and repair: current trends in research. *J Bone Joint Surg Am*. 2002;84–A(5):822–32.
 24. Best TM, Gharaibeh B, Huard J. Stem cells, angiogenesis and muscle healing: a potential role in massage therapies? *Br J Sports Med* [Internet]. 2013;47(9):556–60. Available from:
<http://bjsm.bmj.com/cgi/doi/10.1136/bjsports-2012-091685>
 25. Karu T. Is It Time to Consider Photobiomodulation As a Drug Equivalent? *Photomed Laser Surg* [Internet]. 2013 May;31(5):189–91. Available from:
<http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/pho.2013.3510>
 26. Alves AN, Fernandes KPS, Deana AM, Bussadori SK, Mesquita-Ferrari RA. Effects of Low-Level Laser Therapy on Skeletal Muscle Repair: A Systematic Review. *Am J Phys Med Rehabil* [Internet]. 2014;1–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25122099>
 27. 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. Sheweita SA, editor. PLoS One [Internet]. 2016 Apr 15;11(4):15. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0153618>
28. Baptista J, Martins MD, Pavesi VCS, Bussadori SK, Fernandes KPS, Pinto Júnior DDS, 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.
 29. 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.
 30. Miyabara EH, Aoki MS, Moriscot AS. Cyclosporin A preferentially attenuates skeletal slow-twitch muscle regeneration. *Brazilian J Med Biol Res.* 2005;38(4):559–63.
 31. Ribeiro BG, Efeito da laserterapia prévia sobre o reparo do músculo esquelético de rato. [Dissertação de Mestrado]. São Paulo, 2013.

8. APÊNDICE

8.1. Apêndice A. Artigo a ser submetido para a revista *Lasers in Surgery and Medicine*.

Effects of photobiomodulation at different times on the gene expression of myosin heavy chains, calcineurin and myostatin during the skeletal muscle repair process in rats

ABSTRACT

The maturation of new muscle fibers and the recovery of the functional performance of injured tissue are dependent on proteins involved in muscle trophism, such as myostatin and calcineurin, which can influence the phenotypic characteristics of muscle fibers determined by the isoform composition of the myosin heavy chain (MHC) protein present in the contractile unit of muscle tissue. Photobiomodulation during the muscle repair process is reported to have various positive effects. Benefits have also been demonstrated with irradiation prior to injury. However, there are few studies on prior irradiation combined with post-injury irradiation and there is no literature describing the effects of photobiomodulation in the form of low level laser therapy (LLLT) on the expression of calcineurin, myostatin and MHCs, which are important proteins for adequate muscle function. The objective of this study was to evaluate the effects of LLLT prior to muscle injury with and without post-injury irradiation on the expression of calcineurin, myostatin and MHCs during the repair process. Wistar rats were divided into four groups: Control (n = 5); Injury (n = 20); LLLT + Injury (n = 20) and LLLT + Injury + LLLT (n = 20). Cryoinjury was performed on the tibialis anterior (TA) muscle. The injured groups were euthanized at one, three, seven and fourteen days after injury. LLLT was performed using an AsGaAl laser (780 nm) with the following parameters: 10 J/cm²; 40 mW; 10 seconds per point; 8 points; and 3.2 J of total energy. At the end of each period, the TA muscle was removed for the analysis of MHC, calcineurin and myostatin gene expression using real-time PCR. Comparisons among the groups were performed with ANOVA/Tukey (p < 0.05). The results demonstrated that prior irradiation reduced the expression of myostatin and calcineurin at three days. Prior irradiation combined with post-injury irradiation decreased the expression of calcineurin at 14 days and increased myostatin expression in the same period. Prior irradiation combined with post-injury irradiation decreased MHC type I, IIx and IIb at 14 days. However, prior irradiation combined with post-injury irradiation increased MHC IIa at three days. In conclusion, photobiomodulation with LLLT was able to exert a positive effect on MHCs, calcineurin and myostatin during the skeletal muscle repair process in rats.

Keywords: Photobiomodulation, low-level laser therapy, skeletal muscle, regeneration, calcineurin, myostatin, phototherapy.

INTRODUCTION

Muscle injuries are common and often affect athletes, resulting in a reduction of performance, the loss of competitions and even the removal of the athlete from the sport [Järvinen et al., 1993]. After an injury, a series of biological events occur that are part of the tissue repair process for the functional recovery of the injured muscle [Piovesan et al., 2013]. These events are divided into three interdependent phases: inflammation, repair/fibrosis and remodeling [Souza et al., 2011]. The maturation of new muscle fibers and the recovery of the functional performance of injured tissue are dependent on proteins involved in muscle trophism, such as myostatin (MSTN) and calcineurin (CaN), which can influence the phenotypic characteristics of muscle fibers determined by the isoform composition of the myosin heavy chain (MHC) protein present in the contractile unit of muscle tissue [Dyar et al., 2015].

CaN is involved in muscle gain and loss [Friday et al., 2000] as well as the change in the phenotypic profile of skeletal muscle fibers [Dyar et al., 2015]. When expressed in increased quantity, CaN affects the fibers by inducing a transition from the fast-twitch to slow-twitch phenotype [Kielbasa et al., 2011]. MSTN is a member of the TGF- β family and is also known as growth and differentiation factor 8, which is a potent negative regulator of muscle growth [Fedoruk et al., 2008].

In human tissue, four types of MHC isoforms responsible for the functional differences of skeletal muscle are expressed: type I slow-contraction fibers (MHC I) and type II fast-twitch fibers, which are subdivided into type IIa (MHC IIa), type IIc (MHC IIc – MHC IIx in rats) and type IIb (MHC IIb) [Choi et al., 2009]. In addition to pure fibers, there are "hybrid" fibers that express two or more MHC isoforms [Drzymala et al., 2012].

Among the types of treatment available for muscle injuries, low-level laser therapy (LLLT) has been highlighted due to its positive effects on the repair process. Studies have shown that LLLT is able to benefit muscle regeneration when applied prior to injury [Ribeiro et al., 2011; Ribeiro et al.,

2016], after injury [Mesquita-Ferrari et al., 2011; Alves et al., 2014] as well as prior to injury combined with post-injury irradiation [Ribeiro et al., 2016], positively modulating collagen deposition in the muscle repair process [Baptista et al., 2011; Souza et al., 2011; Alves et al., 2014, Ribeiro et al., 2015], the gene expression of myogenic regulatory factors [Alves et al., 2016] and inflammatory cytokines [Fernandes et al., 2013, Mesquita-Ferrari et al., 2011] as well as reducing oxidative stress [Ribeiro et al., 2016].

Although photobiomodulation has demonstrated considerable capacity to accelerate and modulate the tissue repair process, there are no reports in the literature on whether this therapeutic resource is able to alter phenotypic characteristics in new muscle fibers. Thus, the aim of the present study was to analyze the effects of irradiation with LLLT applied at different times on the mRNA expression of MHC isoforms (I, IIa, IIx and IIb), MSTN and CaN during the muscle repair process following cryoinjury.

MATERIALS AND METHODS

Sixty-five Wistar rats weighing an average of 250 g were used for this study. The animals were kept in the laboratory at University Nove de Julho in appropriate plastic boxes at temperature of 22 °C and a relative humidity of 40%, with a cycle of 12-h (light/dark) photoperiod and free access to food and water in accordance with the regulatory norms of the Brazilian National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA). This study received approval from the Ethics Committee on Animal Research of University Nove de Julho (AN 25/2014).

The animals were randomly assigned to four experimental groups: Control group – submitted to only the removal of the tibialis anterior (TA) muscle (n = 5); injury group – cryoinjury was performed on the TA muscle, but not treated (n = 20); LLLT + injury – irradiation with LLLT 780 nm immediately prior to cryoinjury of the TA muscle (n = 20); LLLT + Injury + LLLT – irradiation with LLLT prior to cryoinjury combined with post-injury irradiation until the end of the experimental period (n = 20). The injured animals (irradiated or not) were evaluated after one, three, seven and fourteen days.

Irradiation was performed directly on the skin over the TA muscle at eight points immediately prior to cryoinjury, as previously described by Ribeiro et al. (2015). In the LLLT + Injury + LLLT group, irradiation was also performed two hours after the induction of injury and subsequently on a daily basis until the end of the experimental protocol [Alves et al., 2014; Ribeiro et al., 2016]. Table 1 displays the laser parameters.

Table 1. Low-level laser therapy parameters

Active medium	AsGaAl
Wavelength	780 nm
Beam area	0.04 cm ²
Output power	40 mW
Power density	1 W/cm ²
Energy density	10 J/cm ²
Energy per point	0.4 J
Total points	8
Time per point	10 seconds
Time total	80 seconds
Energy total	3.2 J

For the cryoinjury procedure, the animals were anesthetized with ketamine 10% (100 mg / kg) and xylazine 2% (10mg / kg). The site was then cleaned and LLLT was performed prior to cryoinjury in the irradiated groups. The TA muscle of the animal was then surgically exposed and cryoinjury was performed with two applications (duration of 10 seconds each) directly on the ventral surface of the muscle using a metallic rod (flat end measuring 3 mm) previously cooled in liquid nitrogen, as described elsewhere [Miyabara et al., 2005; Alves et al., 2014; Ribeiro et al., 2015; Ribeiro et al., 2016]. The incised areas were sutured with polyamide threads. The injured animals (irradiated or not) were euthanized with an overdose of anesthetics (intraperitoneal injection) at one, three, seven and 14 days. The animals in the control group were euthanized on the first day of the experiment. The TA muscles were removed and samples were analyzed for gene and protein expression.

Analysis of gene expression of MHC1, MHCIIa, MHCIIb and MHCIIx, calcineurin and myostatin using real-time PCR

The muscle samples were macerated in liquid nitrogen and homogenized with 1 ml of TRIzol reagent (Invitrogen, São Paulo, Brazil) for the extraction of total RNA, which was quantified by spectrophotometry. All samples

were treated with DNase (Invitrogen) to avoid contamination with genomic DNA. To obtain cDNA, total RNA was submitted to the reverse transcription reaction using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) incubated in a thermal cycler (Thermocycler Mastercycler Gradient, Eppendorf AG, Hamburg, Germany). The 7500 Real-Time PCR System Thermocycler (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA), SYBR Green Master (SYBR Green Master Mix®, Applied Biosystems) and primer oligonucleotides specific for the calcineurin and myostatin proteins as well as for the different myosin heavy chain isoforms (Table 2) were used for the evaluation of gene expression. Quantification was performed using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method.

Table 2. Description of primers used in study

Primers	GenBank	Forward	Reverse
Miostatina	NM_005259.2	CTA CCACGGAAACAATCATT	AGCAACATTTGGGCTTTCCAT
Calcineurina	D90035.1	AGGCGATTGATCCCAAGTTG	GGAAATGGAACGGCTTTCCAC
MHC I	X15939	GAA TGG CAA GAC GGT GAC TGT	GGAAGC GTA CCT CTC CTT GAG A
MHC IIa	XM_340817	ATG ACA ACT CCT CTC GCT TTG G	TTA AGC TGG AAA GTG ACC CGG
MHC IIx	XM_213345	CCA ATG AGA CTA AGA CGC CTG G	GCT ATC GAT GAA TTG TCC CTC G
MHC IIb	NM_019325.1	GAAC ACG AAG CCT GTC ATC CA	AGG TTT CGA TAT CTG CGG AGG
GAPDH	NM_002046	GCATCCTGGGCTACACTGA	CCACCACCCTGTTGCTGTA

Statistical analysis

The Kolmogorov-Smirnov test was used to test the normality of the variables. As adherence to the Gaussian curve was demonstrated, the data were expressed as mean and standard error of mean. Comparisons among the groups were performed using ANOVA (parametric data). Tukey's post hoc test

was also used. A p-value < 0.05 was considered indicative of statistical significance. All data were analyzed with the aid of the BioStat 5.0 program.

RESULTS

Myostatin gene expression

The results demonstrate a reduction in myostatin mRNA levels after three days in the group irradiated prior to injury compared to the control and injury groups. After fourteen days, prior irradiation combined with post-injury irradiation induced an increase in myostatin expression in relation to the other groups. No differences among the experimental groups were found after one and seven days (figure 1).

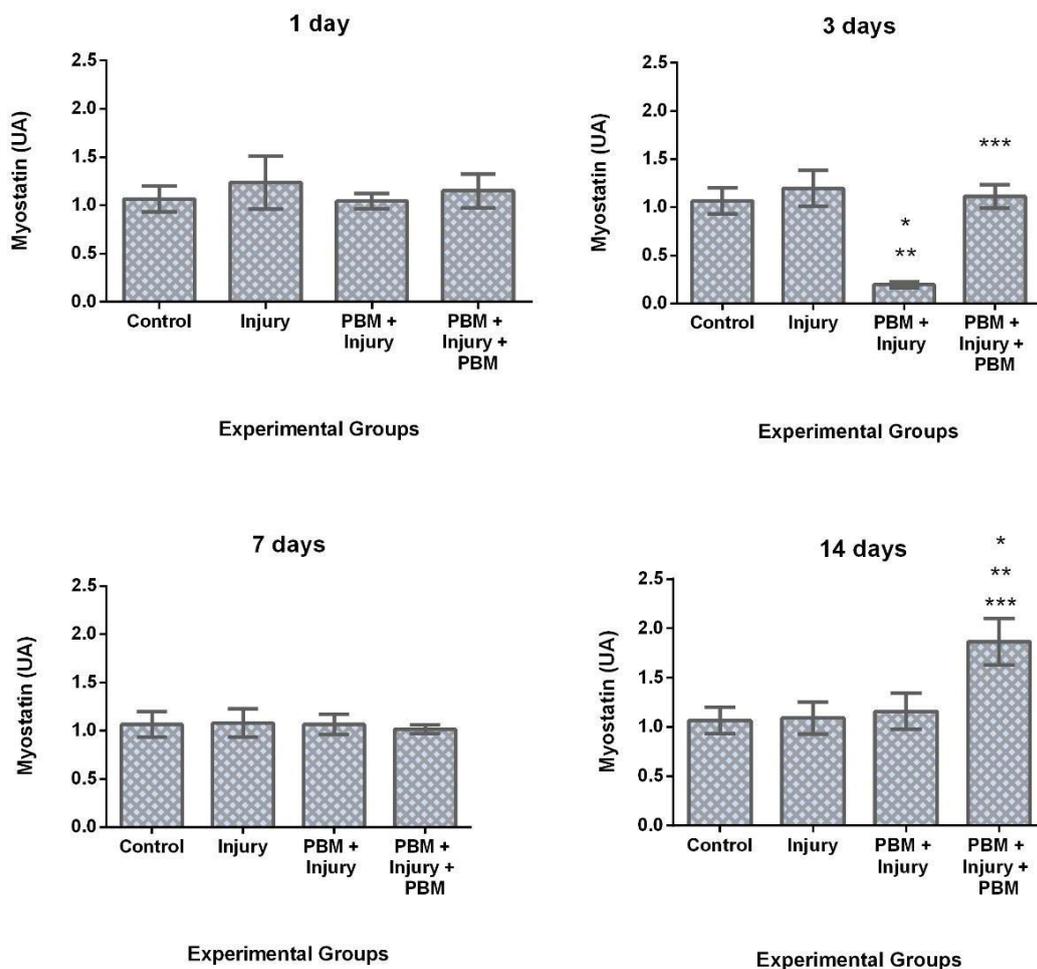


Figure 1. Gene expression of myostatin one, three, seven and fourteen days after induction of acute injury in TA muscle. Data expressed as mean and

standard error of mean (ANOVA/Tukey). *p < 0.05 vs. control group; **p < 0.05 vs. injury group; *** p < 0.05 vs. LLLT + injury group.

Gene expression of calcineurin

The results demonstrate a reduction in calcineurin mRNA levels one day after injury compared to the control group. After three days, calcineurin expression decreased in the injury group and group irradiated prior to injury in relation to the control group. In this same period, an increase in expression was found in the group irradiated before and after injury compared to the injury group and group irradiated prior to injury. After seven days, calcineurin expression decreased in the injury group, group irradiated prior to injury and group irradiated before and after injury in relation to the control group. After fourteen days, a decrease in calcineurin expression was found in the injury group, group irradiated prior to injury and group irradiated before and after injury in relation to the control group. In the same period, a decrease in this expression was found in the irradiated before and after injury in relation to the injury group and group irradiated prior to injury (figure 2).

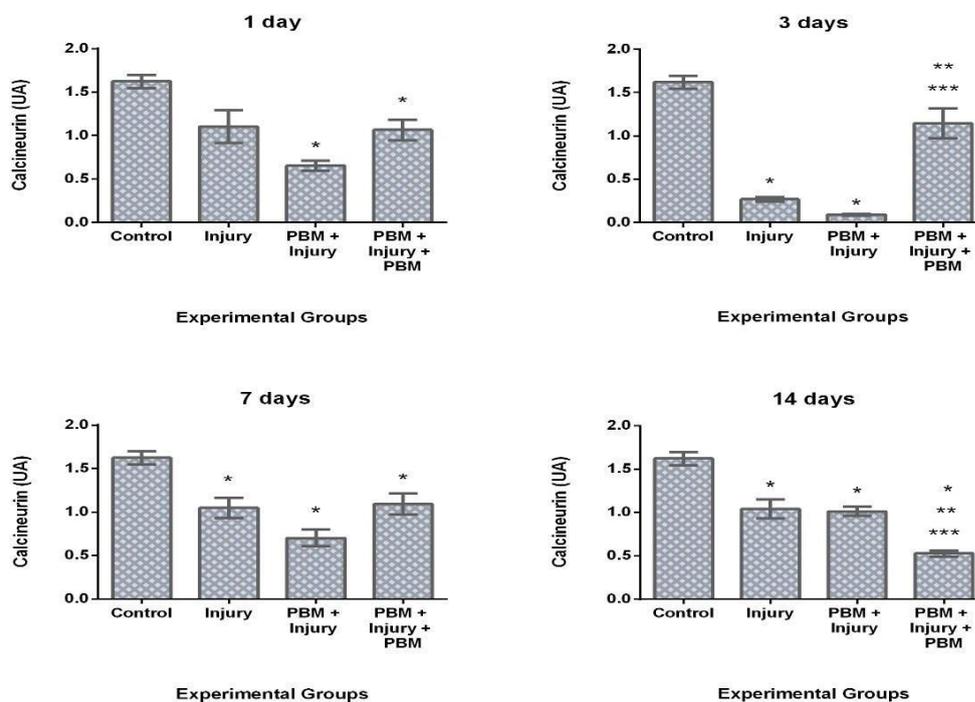


Figure 2. Gene expression of calcineurin one, three, seven and fourteen days after induction of acute injury in TA muscle. Data expressed as mean and

standard error of mean (ANOVA/Tukey). *p < 0.05 vs. control group; **p < 0.05 vs. injury group; *** p < 0.05 vs. LLLT + injury group.

Gene expression of MHC I

The results demonstrate an increase in MCH I mRNA levels after one day in relation to the control group. In the same period, a reduction in MHC I expression was found in the group irradiated prior to injury compared the injury group. However, the group irradiated before and after injury exhibited an increase in MHC I expression in relation to the control group and group irradiated prior to injury. After three days, an increase in MHC I expression was found in the group irradiated before and after injury in relation to the group irradiated prior to injury. After fourteen days, an increase in MHC I expression was found in the injury group in relation to the control group and a decrease in MHC I expression was found in the group irradiated before and after injury in relation to the injury group. No differences among the experimental groups were found after seven days (figure 3).

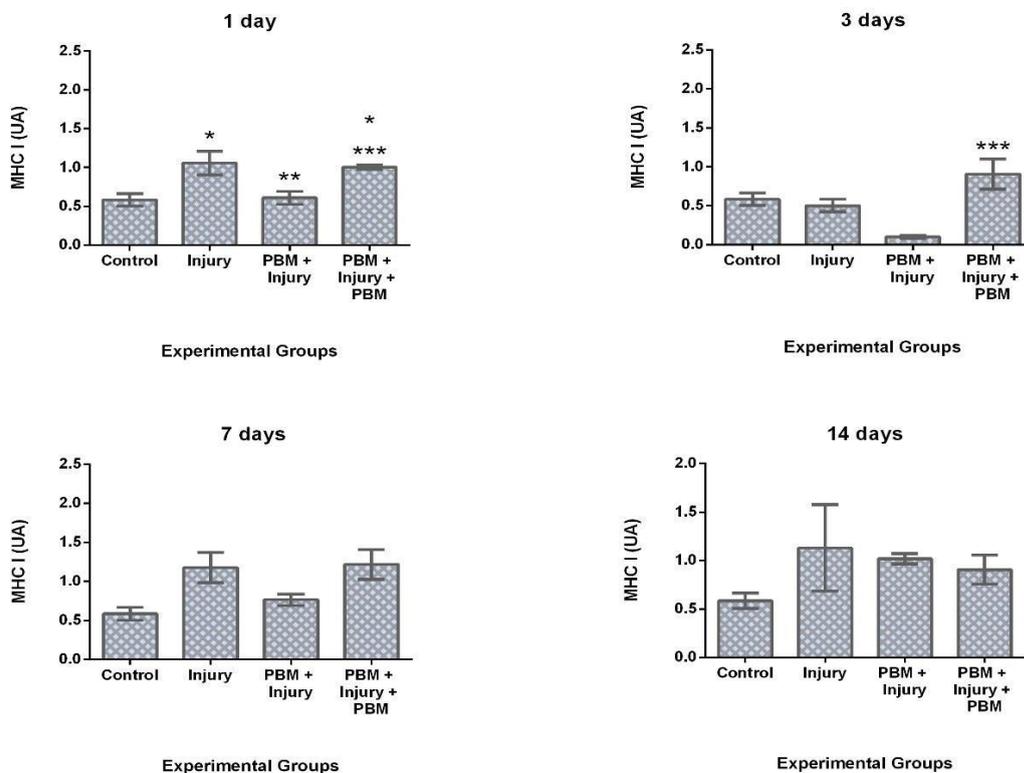


Figure 3. Gene expression of MHC I one, three, seven and fourteen days after induction of acute injury in TA muscle. Data expressed as mean and standard error of mean (ANOVA/Tukey). *p < 0.05 vs. control group; **p < 0.05 vs. injury group; *** p < 0.05 vs. LLLT + injury group.

Gene expression of MHC IIa

The results demonstrate a reduction in MHC IIa expression after one day in the group irradiated prior to injury compared to the control. After three days, a decrease in MHC IIa expression was found in the injury group and group irradiated prior to injury in relation to the control group and an increase of this expression was found in the group irradiated before and after injury in relation to the group irradiated prior to injury. After fourteen days, a decrease in MHC IIa expression was found in the group irradiated before and after injury in relation to the control group. No differences among groups the experimental groups were found at seven days (figure 4).

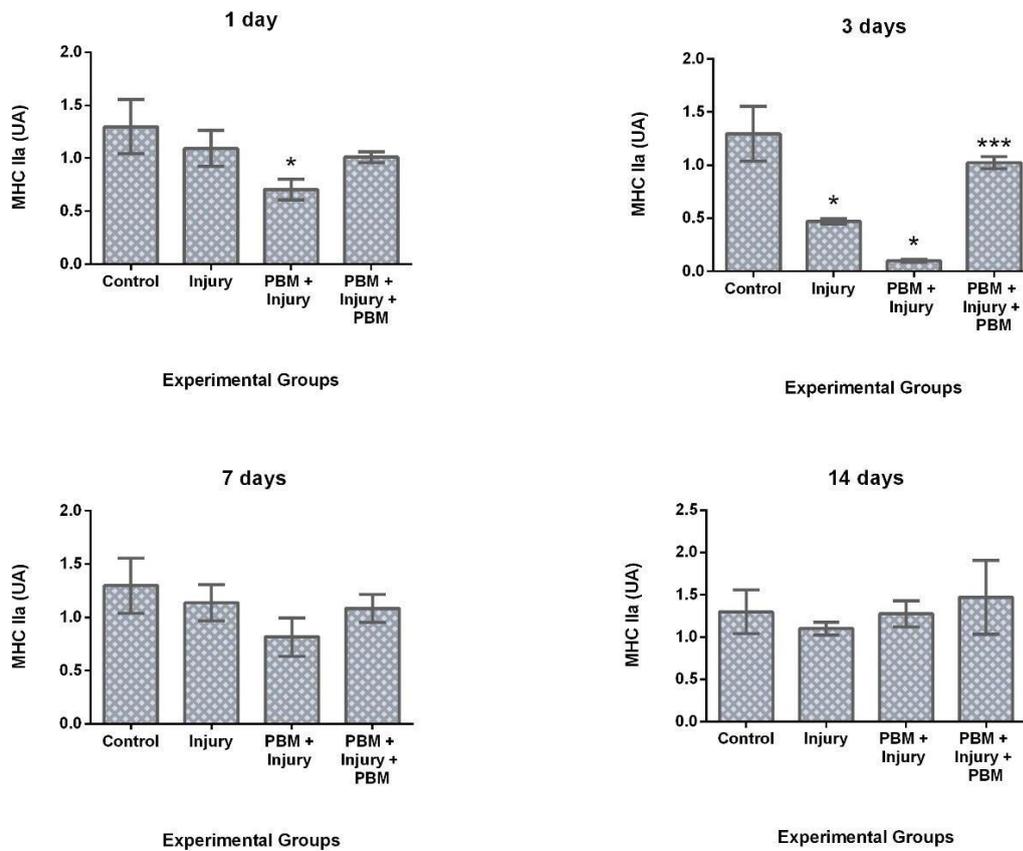


Figure 4. Gene expression of MHC IIa one, three, seven and fourteen days after induction of acute injury in TA muscle. Data expressed as mean and standard error of mean (ANOVA/Tukey). *p < 0.05 vs. control group; **p < 0.05 vs. injury group; *** p < 0.05 vs. LLLT + injury group.

Gene expression of MHC IIx

The results show a reduction in MHC IIx expression after one day in the group irradiated prior to injury compared to control and injury group and an increase in the group irradiated before and after injury in relation to the group irradiated prior to injury. After three days, a decrease in MHC IIx expression was found in the injury group and group irradiated prior to injury compared to the control group and an increase was found in the group irradiated before and after injury compared to the injury group and group irradiated prior to injury. After fourteen days, a decrease in MHC IIx expression was found in the group irradiated before and after injury in relation to the other groups. No differences among groups the experimental groups were found at seven days (figure 5).

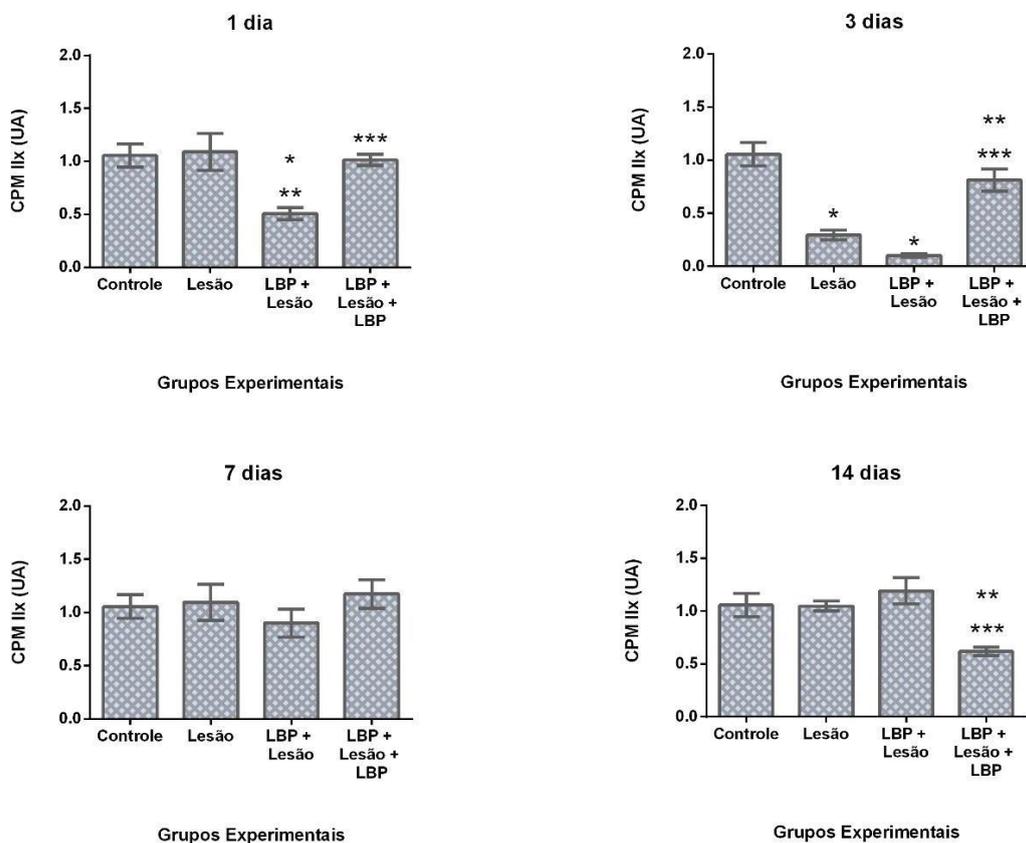


Figure 5. Gene expression of MHC IIx one, three, seven and fourteen days after induction of acute injury in TA muscle. Data expressed as mean and standard error of mean (ANOVA/Tukey). *p < 0.05 vs. control group; **p < 0.05 vs. injury group; *** p < 0.05 vs. LLLT + injury group.

Gene expression of MHC IIb

The results demonstrate a decrease in MHC IIb expression after three days in the injury group and group irradiated prior to injury in relation to the control group and an increase in expression in the group irradiated before and after injury in relation to the group irradiated prior to injury in the same period. After 14 days, a decrease in MHC IIb expression was found in the group irradiated before and after injury in relation to the group irradiated prior to injury. No differences among groups the experimental groups were found at one or

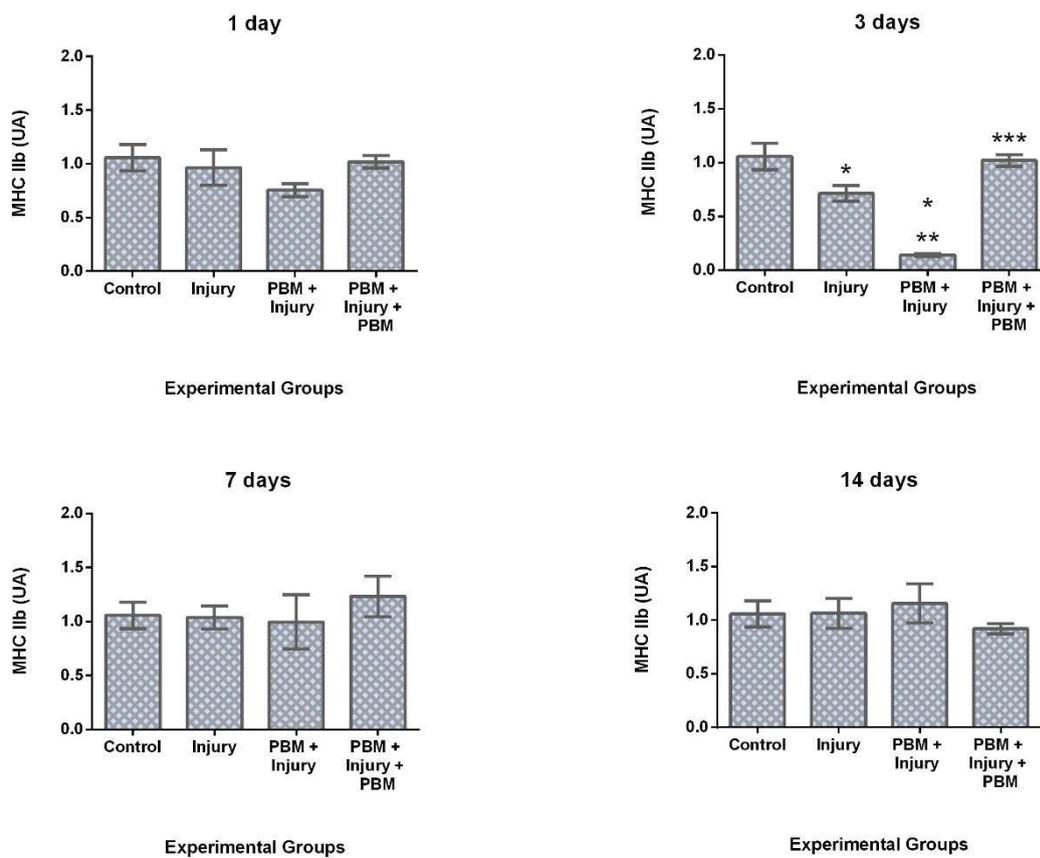


Figure 6. Gene expression of MHC IIb one, three, seven and 14 days after induction of acute injury in TA muscle. Data expressed as mean and standard error of mean (ANOVA/Tukey). * $p < 0.05$ vs. control group; ** $p < 0.05$ vs. injury group; *** $p < 0.05$ vs. LLLT + injury group.

DISCUSSION AND CONCLUSION

Muscle injuries occur with great frequency and are very recurrent in sports. As such injuries can lead to diminished performance, which may result in the loss of competitions or, in many cases, the withdrawal of an athlete from the sport, adequate, effective treatment is a priority in clinical practice and the sports environment [Järvinen et al., 1993]. While there is no consensus on the best treatment for muscle injuries, photobiomodulation has demonstrated positive effects on the muscle repair process in different experimental models.

In the present study, myostatin gene expression was decreased after three days when irradiation was performed prior to injury and was increased after 14 days when irradiation was performed before and after injury. The expression of calcineurin was increased after three days in the group irradiated before and after injury and decreased in this group after fourteen days. MHC I expression decreased the first day with the previous irradiation and also decreased after fourteen days with pre- and post-injury irradiation. The expression of MHC IIa did not differ significantly from the injury group. The expression of MHC IIx decreased on the 1st day with previous irradiation, increased after three days with pre and post-injury irradiation and decreased after fourteen days with pre and post-injury irradiation. The expression of MHC IIb decreased after three days with previous irradiation.

Myostatin is a protein that has a mechanism of action related to muscle growth and may be a negative regulator of skeletal muscle development [Rupert et al., 2008]. In addition to being a growth regulator, myostatin may inhibit the performance of transcriptional factors, such as MyoD and myogenin [Piovesan et al., 2012]. The present study demonstrates that the behavior of myostatin

gene expression varies depending on the manner by which LLLT is administered. Prior LLLT was able to reduce the expression of myostatin three days after injury, but expression was increased at fourteen days when LLLT was administered before and after injury. This may have occurred due to the fact that the repair process is advanced at the end of the process, without the need for muscle growth, which would explain the increase in the expression of this protein in this period. Alves et al. (2016) evaluated the effect of LLLT (780 nm, 40 mW, 3.2J) before or after injury and demonstrated that only post-injury LLLT increased the expression of MyoD mRNA at three and seven days as well as the expression of myogenin mRNA at fourteen days.

Among its different roles in physiological processes, calcineurin is involved in the change of the fiber phenotype. When activated, calcineurin participates in the regulation of the gene transcription of muscle fibers, inducing a transition from the fast to slow contraction phenotype [Kielbasa et al., 2011]. The role of calcineurin in fiber phenotype was described several years ago. Chin et al. (1998) reported that the expression of the fiber-specific gene in the skeletal muscle is controlled by a signaling pathway involving calcineurin and demonstrated that the inhibition of calcineurin activity causes a change from a slow to fast fiber phenotype. Moreover, Sakuma et al. (2010) demonstrated that calcineurin is a potent regulator of muscle remodeling, as it enhances differentiation through the upregulation of myogenin and downregulation of myostatin. In the present study, a relationship was found between calcineurin and myostatin: calcineurin was decreased and myostatin was increased (three and fourteen days). The present study demonstrates that the expression of the calcineurin gene also varied according to manner by which LLLT was administered. Prior administration led to a reduction in calcineurin expression at one, three, seven and fourteen days. When applied before and after injury, this expression was increased in relation to prior application at one, three and seven days, but reduced in relation to prior application at fourteen days.

As stated above, calcineurin may be a negative regulator of myostatin and, when activated, may influence the phenotype of muscle fibers. MHCs are part of the structure of the main muscle protein (myosin) and strongly dictate the rate of strength developed [Oe et al., 2016] as well as the maximum speed of the shortening of actin and myosin cross-bridges, that is, muscle contraction

[Trevino et al., 2016]. Besides being the dominant chains of myosin, MHCs are considered responsible for the functional differences of skeletal muscle [Schiaffino & Reggiani, 2011]. The TA muscle has a predominance of type II fibers (fast contraction isoforms) [Choi et al., 2009]. In certain situations, calcineurin can influence the phenotype of fibers, with a transition from the fast fiber (type II) to slow fiber (type I) phenotype. With regard to the isoforms, IIa transitions to IIx and I transitions to IIa [Boff, 2008].

The behavior of MHCs under low-level laser irradiation remains unclear in the literature. The TA muscle has the four MHC isoforms, but, according to the literature, there is a predominance of fast contraction (type II) isoforms in the TA. In order of predominance in the TA muscle, MHC IIa is the isoform expressed in greatest quantity, followed by IIx, IIb and the smallest amount is MHC I [Drzymala et al., 2012].

In the present study, MHC expression varied widely according to the manner by which LLLT was administered. The expression of types I, IIa and IIx was increased with pre- and post-injury irradiation after the three days. MHC I was decreased at 14 days with pre- and post-injury irradiation, which is not a negative result, since this isoform is a slow contraction type. In this same period (14 days), a reduction also occurred in MHC IIx with pre- and post-injury irradiation. Among the four types of MHC, the fastest is type IIb, which was decreased in the group submitted to LLLT before and after injury only in relation to group irradiated prior to injury. On the third day, prior irradiation also decreased the expression of MHC IIb, but pre- and post-injury irradiation increased the expression to practically the level of healthy muscle.

Studies with prior irradiation have also demonstrated positive effects on the muscle repair process, as LLLT has a protective effect on muscle due to its influence on cellular activity, with the inhibition or stimulation of certain chemical and physiological functions. Ribeiro et al. (2015) demonstrated that LLLT (AsGaAl 780 nm; 10 J/cm²; 40 mW; 3.2 J) applied prior to cryoinjury reduced the inflammatory infiltrate after three days, reduced myonecrosis after one and three days and increased the number of blood vessels after three and seven days. An increase in MMP-2 activity as well as better collagen organization, distribution and deposition were also found. Ribeiro et al. (2016) demonstrated

that pre- and post-injury irradiation (both red and infrared) positively modulated the activity of antioxidant enzymes and reduced stress markers during the muscle repair process. Complementing previous studies, the present findings suggest positive modulation regarding the structural and functional properties of the muscle, the fiber phenotype as well as the strength and speed of muscle contractions.

In conclusion, low-power laser photobiomodulation was able to positively modulate the muscle repair process in relation to fiber and trophic functionality. LBP decreased calcineurin expression in the chronic phase, when its function is not so evident, and increased the expression of myostatin in 14 days, during which there is no need for muscle growth, thus maintaining the balance between these two proteins. It was also able to positively modulate the expression of CPM isoforms in the acute phase, with increased CPM IIx expression in 3 days, and maintaining the expression of the other isoforms at a level close to that found in healthy / control muscle. However, the LBP positively modulated the repair process, with prior irradiation associated with post-injury irradiation being the best form of application, demonstrating that PBM is an efficient contributor to the success of the muscle regeneration process.

REFERENCES

ALVES, A.N.; FERNANDES, K.P.S.; MELO, A.V.; YAMAGUCHI, R.Y.; FRANÇA, C.M.; TEIXEIRA, D.F.; BUSSADORI, S.K.; NUNES, F.D.; MESQUITA-FERRARI, R.A. Modulating effect of low-level laser therapy on fibrosis in the repair process of the tibialis anterior muscle in rats. *Lasers Medical Science*, v. 29, n. 2, p. 813-821, 2014.

ALVES, A.N.; RIBEIRO, B.G.; FERNANDES, K.P.S.; SOUZA, N.H.C.; ROCHA, L.A.; NUNES, F.D. 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. *Laser in Medical Science*, p. 1-7, 2016.

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

BOFF, S. R. The muscle fiber and the factors that interfere with its phenotype. *Acta Fisiátrica*, v. 15, n.2, 2008.

BUCKINGHAM, M.; MONTARRAS, D. Skeletal muscle stem cells. *Current Opinion in Genetics & Development*, v. 18, p. 330-336, 2008.

CHIN, E.R.; OLSON, E.N.; RICHARDSON, J.A.; YANG, Q.; HUMPHRIES, C.; SHELTON, J.M.; WU, H.; ZHU, W.; BASSEL-DUBY, R.; WILLIAMS, R.S. A calcineurin-dependent pathway controls skeletal muscle fiber type. *Genes e Developmen*, v. 12, n. 16, p. 2499-509, 1998.

CHOI, Y.M.; KIM, B.C. Muscle fiber characteristics, myofibrillar protein isoforms, and meat quality. *Livestock Science*, v. 122, p. 105-18, 2009.

CRESSONI, M.D.; DIB GIUSTI, H.H.; CASAROTTO, R.A.; ANARUMA, C.A. The effects of a 785-nm AlGaInP laser on the regeneration of rat anterior tibialis muscle after surgically-induced injury. *Photomedicineand Laser Surgery*, v. 26, n. 5, p. 461-66, 2008.

DRZYMALA-CELICHOWSKA H, KAROLCZAK J, REDOWICZ MJ, BUKOWSKA D. The content of myosin heavy chains in hindlimb muscles of female and male rats. *J PhysiolPharmacol*, v. 63, n. 2, p.187-93, 2012.

FEDORUK, M.N., RUPERT, J.L. Myostatin inhibition: a potential performance enhancement strategy? *Scand J Med Sci Sports*, v. 18 n. 2, p.123–31, 2008.

FERNANDES, K.P.S.; ALVES, A.N.; NUNES, F. D.; SOUZA, N.H.C.; SILVA, J.A.; SANDRA KALIL BUSSADORI, S.K.; MESQUITA-FERRARI, R.A. Effect of photobiomodulation on expression of IL-1 β in skeletal muscle following acute injury. *Lasers in Medical Science*, v. 28, ed. 3, 2013.

JÄRVINEN, M.J.; LEHTO, M.U. The effects of early mobilisation and immobilisation on the healing process following muscle injuries. *Sports Medicine*, v. 15, n. 2, p. 78-89, 1993.

KIELBASA, O.M.; REYNOLDS, J.G.; WU, C.L.; SNYDER, C.M.; WEILER, H.; KANDARIAN, S.; NAYA, F.J. Myospryn is a calcineurin-interacting protein that negatively modulates slow-fiber-type transformation and skeletal muscle regeneration. *Faseb Journal*, v. 25, n. 7, p. 2276-2286, 2011.

LEE, E.J.; JAN, A.T.; BAIG, M.H.; Fibromodulin: a master regulator of myostatin controlling progression of satellite cells through a myogenic program. *FasebJournal*, 2016.

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

OE, M.; OJIMA, K.; NAKAJIMA, I.; CHIKUNI, K.; SHIBATA, M.; MUROYA, S. Distribution of tropomyosin isoforms in different types of single fibers isolated from bovine skeletal muscles. *Meat Science*, v. 118, p. 129-132, 2016.

PICARD, B.; BARBOIRON, C.; CHADEYRON, D.; JURIE, C. Protocol for high-resolution electrophoresis separation of myosin heavy chain isoforms in bovine skeletal muscle. *Electrophoresis*, v. 32, n. 14, p. 1804-1806, 2011.

PIOVESAN, R.F.; FERNANDES, K.P.S.; ALVES, A.N.; TEIXEIRA, V.P.; SILVA, J.R.J.A.; MARTINS, M.D.; ALBERTINI, R.; BUSSADORI, S.K.; MESQUITA-FERRARI, R.A. Effect of nandrolone decanoate on skeletal muscle repair. *International Journal of Sports Medicine*, v. 34, n. 1, p. 87-92, 2013.

RIBEIRO, B.G. Efeito da laserterapia prévia sobre o reparo do músculo esquelético de rato. [Dissertação de Mestrado]. São Paulo, 2013.

RIBEIRO, B.G.; ALVES, A.N.; FERNANDES, K.P.S.; CANTERO, T.M.; FRANÇA, C.M.; BUSSADORI, S.K.; TEIXEIRA, D.F.; MESQUITA-FERRARI, R.A. The effect of low-level laser therapy (LLLT) applied prior to muscle injury. *Lasers in Surgery and Medicine*, v. 6, 2015.

RIBEIRO, B.G.; ALVES, A.N.; DOS SANTOS, L.A.; CANTERO, T.M.; FERNANDES, K.P.S.; DIAS, D.S.; BERNARDES, N. DE ANGELIS, K.; MESQUITA-FERRARI, R.A. 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*, v. 15, p. 11, 2016.

SAKUMA, K.; YAMAGUCHI, A. The functional role of calcineurin in hypertrophy, regeneration and disorders of skeletal muscle. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, v. 2010, p. 721,219, 2010.

SCHIAFFINO, S.; REGGIANI, C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiological Reviews*, v. 91, n. 4, p. 1447-531, 2011.

SERRANO, A.L.; MURGIA, M.; PALLAFACCHINA, G.; CALABRIA, E.; CONIGLIO, P.; LOMO, T, SCHIAFFINO, S. Calcineurin controls nerve activity-dependent specification of slow skeletal muscle fibers but not muscle growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 98, n. 23, p. 13108-13, 2001.

SOUZA, T.O.; MESQUITA, D.A.; FERRARI, R.A.; DOS SANTOS PINTO, D. J.R; CORREA, L.; BUSSADORI, S.K.; FERNANDES, K.P.; MARTINS, M.D. Phototherapy with low-level laser affects the remodeling of types I and III collagen in skeletal muscle repair. *Lasers in Medical Science*, v. 26, n. 6, p. 803-814, 2011.

TREVINO, M.A.; HERDA, T.J.; FRY, A.C.; GALLAGHER, P.M.; VARDIMAN, J.P.; MOSIER, E.M.; MILLER, J.D. The influence of the contractile properties of muscle on motor unit firing rates during a moderate contraction intensity in vivo. *Journal of Neurophysiology*, v. 4, 2016.

- (X) Aprovado, sendo que este projeto deverá permanecer arquivado por 05 (cinco) anos nesta Secretaria.
() Com pendência (relacionar), devendo o Pesquisador encaminhar as modificações sugeridas, e iniciar a coleta de dados somente após a aprovação do projeto por este Comitê.
() Não-Aprovado

Comentários:

-Adequar a data de início do estudo no cronograma do projeto de acordo com o relatado no formulário, bem como inserir a metodologia de eutanásia no projeto conforme consta no formulário.

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

São Paulo, 23 de setembro de 2014

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

8. ANEXOS

8.1. Anexo A. Parecer de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal.

UNINOVE
Universidade Nove de Julho

Protocolo de Pesquisa referente ao Projeto nº AN0025/2014

Título do Projeto: Comparação dos efeitos do laser vermelho e infravermelho aplicado em diferentes momentos sobre o processo de reparo do músculo esquelético de ratos
Orientador: Raquel Agnelli Mesquita Ferrari
Aluno: Beatriz Guimarães Ribeiro Cardoso

Data de início: 01/10/2014
Data de término: 01/12/2016

Apresentado a este Comitê para análise ética, foi considerado:

(X) Aprovado, sendo que este projeto deverá permanecer arquivado por 05 (cinco) anos nesta Secretaria.
() Com pendência (relacionar), devendo o Pesquisador encaminhar as modificações sugeridas, e iniciar a coleta de dados somente após a aprovação do projeto por este Comitê.
() Não-Aprovado

Comentários:

-Adequar a data de início do estudo no cronograma do projeto de acordo com o relatado no formulário, bem como inserir a metodologia de eutanásia no projeto conforme consta no formulário.

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

São Paulo, 23 de setembro de 2014

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