

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

THAIS ORICCHIO FEDRI DE SOUZA

**EFEITO DA FOTOTERAPIA COM LASER DE BAIXA POTÊNCIA NO
REMODELAMENTO DOS COLÁGENOS I E III NO PROCESSO DE
REGENERAÇÃO DO MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATO**

**SÃO PAULO
2009**

THAIS ORICCHIO FEDRI DE SOUZA

**EFEITO DA FOTOTERAPIA COM LASER DE BAIXA POTÊNCIA NO
REMODELAMENTO DOS COLÁGENOS I E III NO PROCESSO DE
REGENERAÇÃO DO MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATO**

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a Manoela
Domingues Martins

SÃO PAULO

2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Souza, Thais Oricchio Fedri de.

Efeito da fototerapia com laser de baixa intensidade no remodelamento do colágeno I e III em músculo esquelético de rato após criolesão. / Thais Oricchio Fedri de Souza. 2009.

38 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2009.

Orientador (a): Prof. Dra. Manoela Domingues Martins

1. Músculo esquelético. Remodelamento muscular. 2. Colágeno I. 3. Colágeno III. 4. Matriz extracelular.

CDU 615.8

**EFEITO DA FOTOTERAPIA COM LASER DE BAIXA POTÊNCIA NO
REMODELAMENTO DOS COLÁGENOS I E III NO PROCESSO DE
REGENERAÇÃO DO MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATO**

POR

THAIS ORICCHIO FEDRI DE SOUZA

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

Presidente: Prof. Manoela Domingues Martins, Dra. - Orientadora- Uninove

Membro: Prof. Márcia Martins Marques, Dra - USP

Membro: Prof. Raquel Agnelli Mesquita Ferrari, Dra. - Uninove

São Paulo, 14 de Dezembro de 2009.

DEDICATÓRIA

Dedico este estudo a todas as pessoas que foram e são fundamentais para o meu crescimento pessoal e profissional, bem como a todas que, de alguma maneira contribuíram para a execução do mesmo.

À minha querida família, cujos ensinamentos e valores continuam a me influenciar e inspirar.

Aos meus queridos mestres e formadores, por compartilharem seus conhecimentos e sabedoria, contribuindo de modo direto e ímpar para minha formação.

AGRADECIMENTOS

Quero expressar minha eterna gratidão a todas as pessoas que tornaram este trabalho possível !!!

Primeiramente, gostaria de agradecer a minha querida **família**, pois sem seu apoio, incentivo, e confiança nada seria possível.

Sou profundamente grata à querida Professora Dra. **Manoela Domingues Martins**, pela oportunidade, confiança e dedicação a mim atribuídas, apesar de extremamente requisitada, sempre encontrou tempo para contribuir de forma marcante em minha formação profissional e pessoal, expressando a importância de assumir um compromisso com seus ideais.

Um sincero agradecimento à professora Dra. **Raquel Agnelli Mesquita-Ferrari** pela colaboração valorosa neste estudo, carinho e atenção.

Agradeço as professoras **Kristianne Porta Santos Fernandes e Sandra Kalil Bussadori**, pela amizade, paciência, interminável compreensão nos momentos difíceis.

Ao **Prof. Dr. João Carlos Ferrari Corrêa**, coordenador do programa de Mestrado em Ciências da Reabilitação, pela atenção dedicada a todos os alunos e professores.

Aos **professores** do programa de Mestrado em Ciências da Reabilitação por todos os ensinamentos.

A amiga e colega de mestrado, **Joanna Carolina Bachiega** pelo companheirismo e amizade.

Aos queridos amigos e colegas, **Vanessa Christina Santos Pavesi, Dayane Aparecida Mesquita Rocha, Paulo Roberto Dantas Pestana** que me apoiaram, acreditaram e incentivaram nos momentos mais difíceis.

Um agradecimento especial às “queridas meninas” **Camila Camarão Esteves** e **Juliana Ribeiro**, pela amizade e ajuda preciosa constante.

As técnicas do laboratório de Neurociência do ICB-USP **Joelcimar Martins da Silva** e **Amanda Ribeiro de Oliveira** pela disposição e atenção durante a utilização do criostato.

Sou imensamente grata a todos os amigos e colegas do mestrado, pelo companheirismo, entusiasmo e amizade.

Finalmente, gostaria de agradecer a **Deus**, pois sem sua intercessão direta em minha vida nada seria possível.

RESUMO

A fototerapia com laser de baixa potência (LBP) tem sido utilizada para estimular a reparação tecidual em diferentes tecidos. Entretanto, seu papel no remodelamento muscular, especialmente sua ação no componente colagênico da matriz extracelular, ainda não está bem esclarecido. O objetivo do presente estudo foi investigar o efeito do laser no remodelamento do colágeno tipos I e III durante a regeneração muscular após a criolesão. Foram utilizados 50 ratos Wistar divididos em 4 grupos: controle, sham, criolesionado e criolesionado tratado com laser. O grupo tratado recebeu 3 sessões semanais de irradiação com laser InGaAlP (660nm), de forma pontual com 20mW, diâmetro do feixe de 0,04cm², 5J/cm² de densidade de energia, durante 10 segundos perfazendo uma dose final por ponto de 200mJ. Foram sacrificados 5 animais nos dias 1, 7, 14 e 21 após a lesão. Os músculos foram processados e submetidos à coloração por hematoxilina & eosina e imunohistoquímica. Os cortes histológicos foram analisados de forma qualitativa, semiquantitativa e quantitativa. Os dados foram submetidos a estatística utilizando o teste de Kruskal-Wallis. Os achados morfológicos e semiquantitativos do edema, processo inflamatório, mionecrose e presença de fibras novas imaturas mostraram que o grupo criolesionado e o tratado com laser possuem padrão semelhante de reparo muscular. Entretanto, a análise da distribuição dos colágenos I e III demonstrou um aumento significativo na deposição destas proteínas no grupo tratado com laser quando comparado ao controle. O grupo laser também mostrou aumento de ambos os colágenos aos 7 dias quando comparado ao grupo criolesionado. Conclui-se que a laserterapia promoveu aumento na deposição dos colágenos I e III durante o processo de reparo do músculo esquelético de rato após criolesão.

Palavra-chave: Músculo Esquelético; Remodelamento Muscular; Colágeno I; Colágeno III; Matriz Extracelular.

ABSTRACT

Laser phototherapy (LPT) has been employed to stimulate repair in different tissues. However, its role in muscle remodeling is not yet well clarified, especially its effect on the collagen component of the extracellular matrix. The aim of the present study was to investigate the effect of laser on the remodeling of collagens type I and III during skeletal muscle regeneration following cryoinjury. Fifty Wistar rats were divided into four groups: control, sham, cryoinjury and laser-treated cryoinjury. The laser-treated group underwent three weekly sessions of InGaAlP (660nm) punctual laser irradiation with 20 mW, 0.04 cm² focal spot, 5 J/cm² for 10 seconds with 200mJ of total energy dose. Five animals were sacrificed on Days 1, 7, 14 and 21 after the injury. The muscles were processed and submitted to hematoxylin/eosin and immunohistochemical staining. The histological slices were analyzed qualitatively, semi-quantitatively and quantitatively. The data were submitted to statistical analysis using the Kruskal-Wallis test. The morphological and semi-quantitative findings of edema, inflammatory process, myonecrosis and presence of new immature fibers revealed that the cryoinjury group and the laser-treated cryoinjury group exhibited a similar muscle repair pattern. However, the analysis of the distribution of collagen I and III revealed a significant increase in the depositing of these proteins in the laser-treated group when compared to the control. The laser-treated group also exhibited an increase in both collagen types at seven days in comparison to the cryoinjury group. In conclusion, laser therapy promoted a change in the depositing of collagen types I and III during the muscle repair process in rats following cryoinjury.

Keywords: Skeletal Muscle, Muscle Repair; Collagen Type I; Collagen Type III; Cryoinjury; Extracellular Matrix.

SUMÁRIO

1. CONTEXTUALIZAÇÃO.....	13
2. ESTUDO: “Efeito da fototerapia com laser de baixa potência no remodelamento dos colágenos I e III durante o reparo do músculo esquelético de rato após lesão”.....	15
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41
ANEXOS.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABR- Affinity BioReagents

ATP- Adenosina tri-fosfato

BSA- Albumina de soro bovina

COBEA- Colégio Brasileiro de Experimentação animal

DAB- 3-31-diaminobenzidina

HE- Hematoxilina-eosina

ICLAS- International Council of Laboratory Animal Science

InGaAIP- Índio Gálio Alumínio Fósforo

LBP- Laser de Baixa Potência

LSAB- Labeled streptavidinbiotin

MEC- Matriz extracelular

MMPs- Metaloproteinases

p- Significância

PBS- Tampão salina fosfato

SDS- Sodium dodecyl sulfate

TA- Tibial anterior

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Áreas de análise histomorfométrica quantitativa da imunoistoquímica. Imunomarcção para colágeno III, grupo criolesionado analisado após 7 dias.....**23**

Figura 2. Fotomicrografias dos cortes histológicos de músculos criolesionados e criolesionados tratados com laser corados por hematoxilina & eosina.....**25**

Figura 3. Fotomicrografias da marcação imunoistoquímica para colágeno III.....**27**

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Média dos escores dos elementos teciduais analisados de acordo com o período e o grupo experimental.....**28**

Gráfico 2. Média dos percentuais de colágeno I e III obtidos pela histomorfometria quantitativa.....**31**

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

O músculo esquelético é um tecido com alta capacidade regenerativa que realiza tanto um trabalho dinâmico, que permite a locomoção e o posicionamento dos segmentos corporais no espaço, quanto um trabalho estático, responsável pela manutenção da postura corporal¹. Doenças de origem genética, distrófica, ortopédica e postural podem acometer este tecido e têm ampliado o interesse da pesquisa pelo conhecimento da organização estrutural e funcional do tecido muscular esquelético na busca de modelos apropriados de reabilitação.

Os músculos esqueléticos são compostos por fibras musculares e células satélites embebidas em uma matriz extracelular (MEC) que participam ativamente do processo de remodelamento fisiológico ou patológico do músculo esquelético. As interações entre célula-célula e célula-MEC suprem as células com informações essenciais para homeostase, para o controle da morfogênese, crescimento e diferenciação²⁻⁴. Nos tecidos musculares a MEC circunda as fibras musculares conferindo suporte e proteção e é importante na manutenção da integridade funcional das fibras⁵. Modificações nos músculos esqueléticos tais como aumento ou diminuição de atividade contrátil, lesão muscular que gere inflamação ou atrofia promovem o remodelamento da MEC⁶⁻¹⁰.

As principais macromoléculas que compõem a MEC do tecido muscular esquelético são representadas por proteínas colagênicas (colágenos) e não-colagênicas (fibronectina, tenascina, laminina), proteoglicanas, incluindo-se o ácido hialurônico, sulfato de condroitina e sulfato de heparana e fosfolipídios^{7,10,11}. Dentre as proteínas, as mais abundantes são os colágenos, sendo que, os tipos I e III estão localizados principalmente no epimísio, perimísio e endomísio e os tipos IV e V na membrana basal, fibras de músculo liso de vasos sanguíneos e células de Schwann⁴. A associação entre o aumento da síntese de colágeno e os processos regenerativos que ocorrem no tecido muscular após dano, desuso e reinervação tem sido demonstrada na literatura¹⁰⁻¹³. Estas alterações na composição da MEC podem levar a mudanças na capacidade do músculo para exercer força de contração e alterar o limiar de resistência muscular frente à lesão.

Diversos recursos terapêuticos vem sendo testados na busca de acelerar a regeneração muscular esquelética dentre eles, tem sido investigada ação do laser de baixa potência (LBP)^{3,13-14}. Isto porque, esta terapia parece ter um efeito positivo sobre os processos inflamatórios, na promoção de reparo tecidual, diminuição da dor, redução de fadiga muscular em vários modelos de pesquisa laboratorial e clínica¹³⁻¹⁴. Entretanto, outros estudos tem demonstrado que o LPB não modifica a resposta muscular²⁵⁻²⁸. Essas respostas diferentes tem sido atribuídas ao fato dos protocolos de aplicação de LPB serem distintos, utilizando diversos materiais ativadores, comprimentos de onda, potências, frequências, densidades de energia e números de irradiações.

O mecanismo de ação do LBP no reparo muscular ainda não está completamente elucidado. Em alguns trabalhos o LBP promoveu aumento da densidade mitocondrial, aumento da área média da fibra muscular, estimulou a proliferação de células satélites, inibiu a fusão e diferenciação de células satélites²⁹. Todavia, o efeito da irradiação laser sobre o metabolismo do colágeno em células musculares, especialmente durante o remodelamento tecidual não foi estudado. Em outros tecidos, tem sido sugerido que o LBP em algumas situações aumenta a síntese de colágeno³⁰, entretanto, durante um período de proliferação celular tem sido demonstrado uma menor síntese de colágeno^{31,32}. Diante destes fatos, sugerimos que pesquisas neste campo podem ser de grande valia no desenvolvimento de protocolos terapêuticos apropriados que estimulem o reparo muscular e nos propusemos a avaliar o efeito do LBP no remodelamento do colágeno I e III no músculo esquelético de rato após criolesão.

2. ESTUDO

2.1. Artigo - Efeito da fototerapia com laser de baixa potência no remodelamento dos colágenos I e III durante o reparo do músculo esquelético de rato após lesão

Effect of phototherapy with low level laser on the remodeling of collagen I and III in skeletal muscle repair following injury

Thais Oricchio Fedri de Souza¹, Dayane Aparecida Mesquita¹, Raquel Agnelli Mesquita-Ferrari¹, Décio dos Santos Pinto Júnior², Luciana Correa², Sandra Kalil Bussadori¹, Kristianne Porta Santos Fernandes¹, Manoela Domingues Martins¹.

¹ Programa de Mestrado em Ciências da Reabilitação da Universidade Nove de Julho – UNINOVE

² Departamento de Estomatologia, Universidade de São Paulo- USP, São Paulo-SP, Brazil

Endereço para contato: *Manoela Domingues Martins, Rua Vergueiro, 235 Liberdade, São Paulo-SP, Brasil, 11-63973621

e-mail: manomartins@gmail.com

Resumo

A fototerapia com laser de baixa potência (LBP) tem sido utilizada para estimular a reparação tecidual em diferentes tecidos. Entretanto, seu papel no remodelamento muscular, especialmente sua ação no componente colagênico da matriz extracelular, ainda não está bem esclarecido. O objetivo do presente estudo foi investigar o efeito do laser no remodelamento do colágeno tipos I e III durante a regeneração muscular após a criolesão. Foram utilizados 50 ratos Wistar divididos em 4 grupos: controle, sham, criolesionado e criolesionado tratado com laser. O grupo tratado recebeu 3 sessões semanais de irradiação com laser InGaAlP (660nm), de forma pontual com 20mW, diâmetro do feixe de 0,04cm², 5J/cm² de densidade de energia, durante 10 segundos perfazendo uma dose final por ponto de 200mJ. Foram sacrificados 5 animais nos dias 1, 7, 14 e 21 após a lesão. Os músculos foram processados e submetidos à coloração por hematoxilina & eosina e imunohistoquímica. Os cortes histológicos foram analisados de forma qualitativa, semiquantitativa e quantitativa. Os dados foram submetidos a estatística utilizando o teste de Kruskal-Wallis. Os achados morfológicos e semiquantitativos do edema, processo inflamatório, mionecrose e presença de fibras novas imaturas mostraram que o grupo criolesionado e o tratado com laser possuem padrão semelhante de reparo muscular. Entretanto, a análise da distribuição dos colágenos I e III demonstrou um aumento significativo na deposição destas proteínas no grupo tratado com laser quando comparado ao controle. O grupo laser também mostrou aumento de ambos os colágenos aos 7 dias quando comparado ao grupo criolesionado. Conclui-se que a laserterapia promoveu aumento na deposição dos colágenos I e III durante o processo de reparo do músculo esquelético de rato após criolesão.

Palavra-chave: músculo esquelético, remodelamento muscular, colágeno I, colágeno III, matriz extracelular.

Abstract

Laser phototherapy (LPT) has been employed to stimulate repair in different tissues. However, its role in muscle remodeling is not yet well clarified, especially its effect on the collagen component of the extracellular matrix. The aim of the present study was to investigate the effect of laser on the remodeling of collagens type I and III during skeletal muscle regeneration following cryoinjury. Fifty Wistar rats were divided into four groups: control, sham, cryoinjury and laser-treated cryoinjury. The laser-treated group underwent three weekly sessions of InGaAlP (660nm) punctual laser irradiation with 20 mW, 0.04 cm² focal spot, 5 J/cm² for 10 seconds with 200mJ of total energy dose. Five animals were sacrificed on Days 1, 7, 14 and 21 after the injury. The muscles were processed and submitted to hematoxylin/eosin and immunohistochemical staining. The histological slices were analyzed qualitatively, semi-quantitatively and quantitatively. The data were submitted to statistical analysis using the Kruskal-Wallis test. The morphological and semi-quantitative findings of edema, inflammatory process, myonecrosis and presence of new immature fibers revealed that the cryoinjury group and the laser-treated cryoinjury group exhibited a similar muscle repair pattern. However, the analysis of the distribution of collagen I and III revealed a significant increase in the depositing of these proteins in the laser-treated group when compared to the control. The laser-treated group also exhibited an increase in both collagen types at seven days in comparison to the cryoinjury group. In conclusion, laser therapy promoted a change in the depositing of collagen types I and III during the muscle repair process in rats following cryoinjury.

Keywords: skeletal muscle, muscle repair, collagen type I, collagen type III, cryoinjury, extracellular matrix.

INTRODUÇÃO

A lesão muscular é um fenômeno comum que pode ocorrer em função de exercícios físicos intensos, traumas, contusões, eletroestimulação entre outros fatores. Após a agressão, inicia-se o reparo do músculo esquelético em quatro fases interdependentes: degeneração, inflamação, regeneração e fibrose. Ao longo destas fases, observa-se a ativação de diferentes tipos de células, degradação e síntese de proteínas intracelulares e dos componentes da matriz extracelular (MEC)¹⁻³.

No tecido muscular a MEC é composta principalmente por colágeno I, III e IV, laminina-2 e 4, fibronectina, tenascina e as proteoglicanas que circundam as fibras musculares conferindo suporte, proteção e manutenção da integridade funcional das fibras^{3,4}. Os estudos sobre as modificações da MEC no músculo esquelético, em situações fisiológicas e patológicas, vêm sendo desenvolvidos para melhor compreender o papel da cada proteína tecidual, mas, principalmente, para desenvolver métodos de prevenção e reabilitação de lesões musculares; seleção de tipo, carga e duração do exercício em treinamento físico e para contribuir no desenvolvimento de novas terapias para doenças musculares congênitas e inflamatórias.

No que diz respeito ao componente colagenoso da MEC, uma íntima relação tem sido estabelecida entre o aumento da síntese de colágeno e o processo regenerativo que ocorre no músculo esquelético em resposta as diferentes atividades físicas⁵⁻⁸. Sendo que, o aumento da síntese de colágeno após exercício pode representar uma adaptação fisiológica ou parte do processo de reparo com ou sem dano tecidual evidente^{7,9-11}.

Atualmente, grande ênfase tem sido direcionada para terapia utilizando laser de baixa potência (LBP) que tem demonstrado ação antiinflamatória, analgésica e reparadora. Estes efeitos podem estar relacionados com a ação do laser na ativação do metabolismo celular (respiração mitocondrial e da síntese de ATP), aumento da proliferação celular, síntese de colágeno, ativação de linfócitos e a angiogênese¹²⁻¹⁶.

Investigadores têm realizado estudos para mostrar os efeitos positivos da LBP, isoladamente ou em combinação com outras terapêuticas para tratamento de lesões musculares e de tendões¹⁷⁻²⁰, mas os mecanismos

biológicos que ocasionam os resultados positivos obtidos permanecem obscuros. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi verificar o efeito do LBP no remodelamento do colágeno I e III após criolesão em rato.

MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia utilizada neste estudo foi elaborada atendendo às resoluções 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNINOVE (número do protocolo: ANO13/2007) (Anexo1). O protocolo experimental utilizado neste estudo seguiu os princípios de ética e experimentação animal, elaborados pelo COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal), entidade filiada ao International Council of Laboratory Animal Science (ICLAS) com base nas normas internacionais, que visa o aprimoramento de condutas na experimentação animal baseando-se em três princípios básicos: sensibilidade, bom senso e boa ciência.

Animais

Foram utilizados 50 ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia* - linhagem Wistar) pesando 250g entre 300g mantidos no biotério da UNINOVE- Unidade Vergueiro. Os animais foram mantidos sob condições constantes de temperatura ambiente (22°C), umidade (40%), com ciclo 12/12h dia-noite e alimentados antes e durante o período experimental com ração sólida e água *ad libitum*.

Grupos Experimentais

Os animais foram separados em 4 grupos:

Grupo Controle (n=5): músculo tibial anterior (TA) direito sem procedimento cirúrgico e sem criolesão.

Grupo *Sham* (n=5): músculo TA esquerdo submetido apenas ao procedimento cirúrgico.

Grupo Criolesionado (n=20): músculo TA esquerdo submetido a procedimento cirúrgico e criolesão.

Grupo Laser (n=20): músculo TA esquerdo submetido ao procedimento cirúrgico e criolesão, tratado com laser de diodo de baixa potência.

O grupo controle foi composto por músculos obtidos da pata direita dos animais que não sofreram nenhum tipo de intervenção tendo sido avaliados após 1 dia de experimento. O grupo *Sham* foi composto por animais submetidos apenas ao procedimento cirúrgico, sem a realização de criolesão e tratamento. Este grupo foi avaliado após 7 dias. No grupo criolesionado e laser a lesão foi realizada no músculo TA do lado esquerdo e a análise do remodelamento foi feita nos períodos de 1, 7, 14 e 21 dias.

Modelo de Criolesão

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados sob a administração da ketamina 1mL/kg de 1% HCL (Dopalen, Vetbrands, São Paulo) e xilazina 2% (Anasedan, Vetbrands, São Paulo, Brasil). Exposição cirúrgica do músculo tibial anterior (TA) e criolesão foram realizadas conforme descrito por Miyabara *et al.* (2005)²¹ e consistiu de dois ciclos de criolesão do músculo *in situ*. Congelamento foi realizado mediante a aplicação de uma peça de aço (0,4 x 1cm) previamente resfriado em nitrogênio líquido na superfície do músculo e foi mantido nesta posição por 10s. O mesmo procedimento foi repetido duas vezes consecutivas com um intervalo de tempo de 30s. Após a criolesão, o ferimento foi fechado com sutura utilizando fio de poliamida (6-0) e os animais foram mantidos por várias horas em caixas aquecidas (37°C) para evitar hipotermia.

Protocolo de tratamento com laser

Para este procedimento os animais foram anestesiados com Ketamina (Dopalen) e de Xilazina (Anasedan) e a seguir realizou-se a irradiação com laser de diodo, índio gálio alumínio *fósforo* (InGaAlP) emitido na faixa do vermelho visível (660 nm), usando a técnica pontual, no modo contínuo e em contato. O equipamento utilizado foi o Twin Laser (MM Optics, São Carlos) e foram realizadas aplicações em 8 pontos distribuídos ao longo da área criolesionada. Os parâmetros utilizados foram potência de 20mW, área de irradiação de 0,04cm², densidade de energia de 5J/cm², tempo de irradiação de 10 segundos gerando uma dose de energia total por ponto de 200mJ. Estes parâmetros foram selecionados, pois foi previamente demonstrado que o LBP em baixas doses tem efeito estimulador do reparo muscular^{19,22-24}. Foram realizadas aplicações 3 vezes por semana. A primeira aplicação foi realizada

4h após o término do procedimento cirúrgico. Antes de cada aplicação empregou-se analisador de potência digital modelo Laser Check (Coherent, Inc., Santa Clara, CA) para verificar a potência de saída do aparelho laser, com a finalidade de garantir a fidedignidade da densidade média de energia emitida.

Sacrifício

Os animais foram sacrificados por meio de uma overdose anestésica e os músculos foram retirados e imediatamente congelados em isopentano resfriado e armazenado em nitrogênio líquido. Os músculos congelados foram cortados em seções transversais de 10 μ m de espessura em criostato (Leica CM3050, Nussloch, Alemanha) e estendidos em lâminas de vidro previamente tratadas com 3-aminopropiltriétoxissilano (Sigma, Chemical CO, St Louis, MO/USA). Os espécimes foram submetidos à coloração histoquímica de hematoxilina & eosina (HE) e à técnica imunoistoquímica para detecção dos colágenos I e III.

Técnica Imunoistoquímica

Os cortes foram fixados em acetona 20% por 10 minutos, em seguida, incubados durante 15 minutos em solução de metanol com água oxigenada (1:1), por duas vezes e lavados em água destilada, incubados por 10 min. em solução fosfato-salina tamponada (PBS) 1X e 20 min, em PBS1X / 2% de albumina soro bovino (BSA) para bloquear as ligações inespecíficas. Após as etapas descritas, as lâminas foram incubadas na presença de anticorpo primário anti-colágeno I (Santa Cruz, catalogo C0807) diluído 1:100 em solução de PBS1X/ BSA por 1 hora e anticorpo primário anti-colágeno III (ABR, monoclonal mouse, catalogo MA1-22147) diluído 1:50 em solução de PBS1X/ BSA por 1 hora.

Após a incubação com o anticorpo primário, os cortes foram lavados com PBS1X por 10 min e expostos aos anticorpos secundários (1:100) (LSAB plus System HRP, Dako) por 30 min e, após uma nova lavagem, foram incubadas com o complexo estreptavidina-biotina durante 30 min. Os cortes foram incubados com diaminobenzidina tetra-hidroclorato (DAB, Novocastra) e contracolorados com hematoxilina de Mayer. Controles negativos foram obtidos através da substituição dos anticorpos primários com soro não-imune.

Análise qualitativa e semiquantitativa

As análises qualitativa e semiquantitativa das lâminas foram realizadas em microscopia de luz convencional por um examinador previamente calibrado.

A análise qualitativa dos cortes histológicos corados em HE compreendeu a descrição das etapas do remodelamento tecidual envolvendo a presença e o tipo de infiltrado inflamatório, edema, necrose, fibras novas e imaturas. A análise semiquantitativa consistiu na graduação dos componentes teciduais descritos acima em: ausente (grau 0), discreto (grau 1), moderado (grau 2) e intenso (grau 3) de acordo com Walker, 2006²⁵.

Na análise qualitativa das lâminas coradas pela imunistoquímica foi observada a localização e padrão de distribuição da imunomarcacão (endomísio, perimísio, epimísio).

Análise histomorfométrica quantitativa da imunistoquímica

Os cortes histológicos corados pela técnica imunistoquímica foram submetidos à análise morfométrica de quantificação do colágeno I e colágeno III. Para tal, 3 campos histológicos de cada espécime foram digitalizados por intermédio de microscópio de luz convencional (Laborval, Zeiss, Alemanha) contendo câmera CCD (Sony, Japão) conectada a *software* de captura de imagem (Captivator). As regiões digitalizadas corresponderam a: zona central da lesão (região A); zona lateral (região B) - zona a direita da área central da lesão e zona profunda (região C) - zona imediatamente abaixo da área central da lesão. Essas regiões, marcadas na Figura 1, correspondem às áreas de análise.

Foi utilizado um aumento de 100X de intensidade de luz padronizada, com seleção manual da área imunomarcada (reação positiva) e posterior quantificação automatizada pelo *software* de morfometria ImageLab 2000 (ImageLab, Brasil).

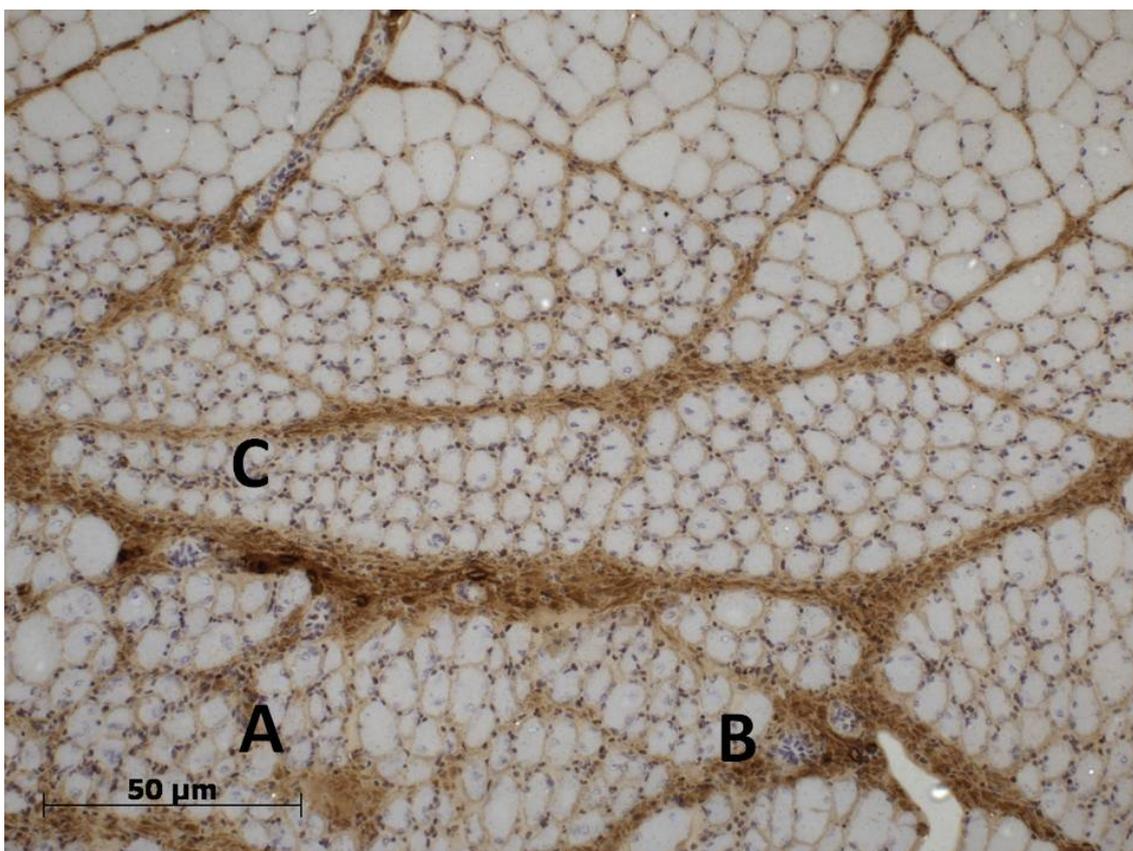


Figura 1. Áreas de análise histomorfométrica quantitativa da imunohistoquímica. Imunomarcagem para colágeno III, grupo criolesionado analisado após 7 dias. (aumento original, 100x). A= zona central da lesão; B= zona a direita da área central da lesão e C= zona imediatamente abaixo da área central da lesão.

Análise Estatística

A comparação das diferenças entre os escores em grupo e período experimental tanto na análise semiquantitativa como na quantitativa foi realizada utilizando o teste de Kruskal-Wallis. Fixando os tempos, foram realizadas comparações entre os quatro grupos pelo teste da mediana. Todas as análises foram feitas no programa SAS for Windows, v.9.1.3 e no programa GraphPad Prism, v.4.0.

RESULTADOS

Análise Qualitativa (Aspectos Morfológicos)

Coloração por HE

O grupo controle, em todos os tempos experimentais, exibiu músculo esquelético com morfologia normal caracterizada pela presença de fibras poligonais, com múltiplos núcleos dispostos na periferia da célula e sem sinais de lesão.

O grupo *sham* mostrou discreto infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear, poucas células musculares degeneradas (mionecrose) e focos de edema situados em região superficial.

No grupo criolesionado e no laser os achados morfológicos foram muito semelhantes em todos os tempos experimentais. Após 1 dia da criolesão foi observado intenso edema entre as fibras musculares, moderado infiltrado inflamatório com neutrófilos e macrófagos dispersos por entre as fibras. Nesta etapa grande quantidade de células musculares necróticas (mionecrose) caracterizadas pelo rompimento e desorganização das fibras musculares pode ser observada (Figura 2 a, b). Em ambos os grupos, tratados e não tratados, após 7 dias notou-se redução do processo inflamatório, escassa mionecrose e o surgimento de inúmeras fibras musculares novas e imaturas, com núcleo centralizado, cortadas (separadas) indicando renovação tecidual (Figura 2c, d). A formação de vasos novos (angiogênese) entre as novas fibras musculares, especialmente no grupo tratado com laser, pode ser evidenciada de forma exuberante nesta fase (Figura 2d). Após 14 dias, o edema e o infiltrado inflamatório eram escassos, e notava-se moderada presença de células musculares com núcleo centralizado (figura 2e,f). Aos 21 dias o músculo mostrou evidência morfológica de reparo (regeneração) completo sem sinais inflamatórios e raras células com núcleo centralizado (Figura 2g,h).

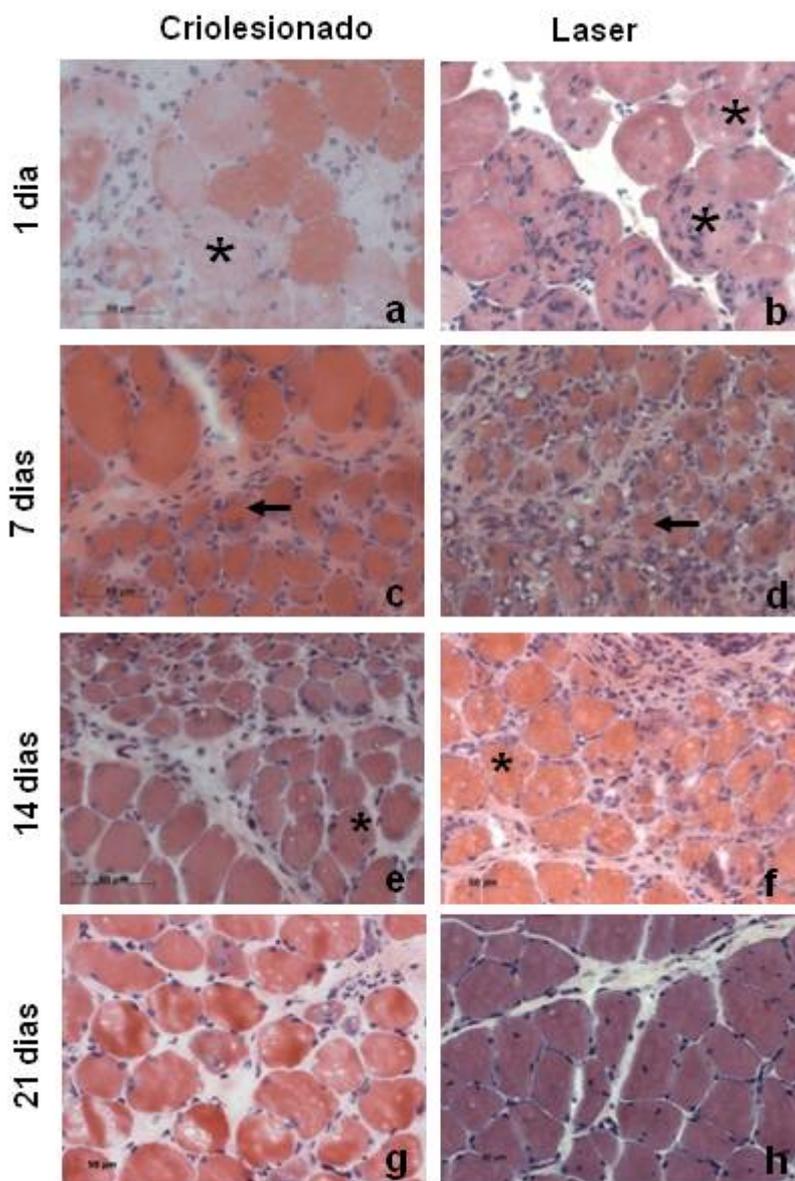


Figura 2. Fotomicrografias dos cortes histológicos de músculos criolesionados e criolesionados tratados com laser corados por hematoxilina & eosina. No 1º dia (a, b) foi observado extensa mionecrose (*), edema e intenso infiltrado inflamatório de neutrófilos. Aos 7 dias (c,d) houve redução do edema, da mionecrose e do infiltrado inflamatório. Novas células musculares imaturas puderam ser observadas (setas). Aos 14 dias (e,f) foi observado que as células musculares mostravam maior diâmetro e algumas ainda exibiam núcleo centralizado (*). Após 21 dias (g,h) as fibras musculares exibiam aspecto de normalidade. (aumento original, 400x).

Imunomarcção do colágeno I e III

Na análise imunoistoquímica dos músculos controle, em todos os períodos experimentais, foi observado que o colágeno I e III estiveram presentes como uma linha tênue envolvendo as fibras musculares (endomísio) e com marcação mais abundante no perimísio (Figura 3a). Nos músculos do grupo criolesionado e no grupo laser foi observada alteração na intensidade da imunomarcção destas proteínas, tanto no endomísio quanto no perimísio, dependendo do estágio (período) de regeneração muscular.

Após 1 dia da criolesão pode-se observar uma modificação no padrão de marcação e distribuição do colágeno I e III tanto no perimísio como no endomísio. A imunomarcção mostra que ambos os colágenos se mostraram mais difusos por entre as células musculares lesadas e com marcação mais intensa. Além disso, em algumas células com nítido rompimento de sarcolema evidenciou-se marcação intracitoplasmática destas proteínas (Figura 3b). O padrão de imunomarcção foi semelhante no grupo criolesionado e no grupo laser.

Aos 7 dias no grupo criolesionado notou-se fraca imunomarcção do colágeno I e III e delimitando o endomísio das fibras musculares jovens ou de forma dispersa nas áreas onde não havia a fusão completa dos mioblastos (Figura 3c). O grupo laser mostrou imunomarcção mais intensa neste período (Figura 3d).

Aos 14 dias foi observada marcação moderada para ambos os colágenos, tanto no grupo criolesionado como no grupo laser. Estas proteínas estavam envolvendo as fibras musculares (endomísio) (Figura 3e). Área focal de marcação dispersa foi observada nas locais onde não havia a fusão completa dos mioblastos.

Após 21 dias verificou-se que o padrão de marcação dos colágenos I e III, tanto do grupo criolesionado como do grupo laser foram semelhantes ao do músculo controle, mesmo havendo algumas células apresentando aspecto morfológico imaturo, com núcleo centralizado (Figura 3f).

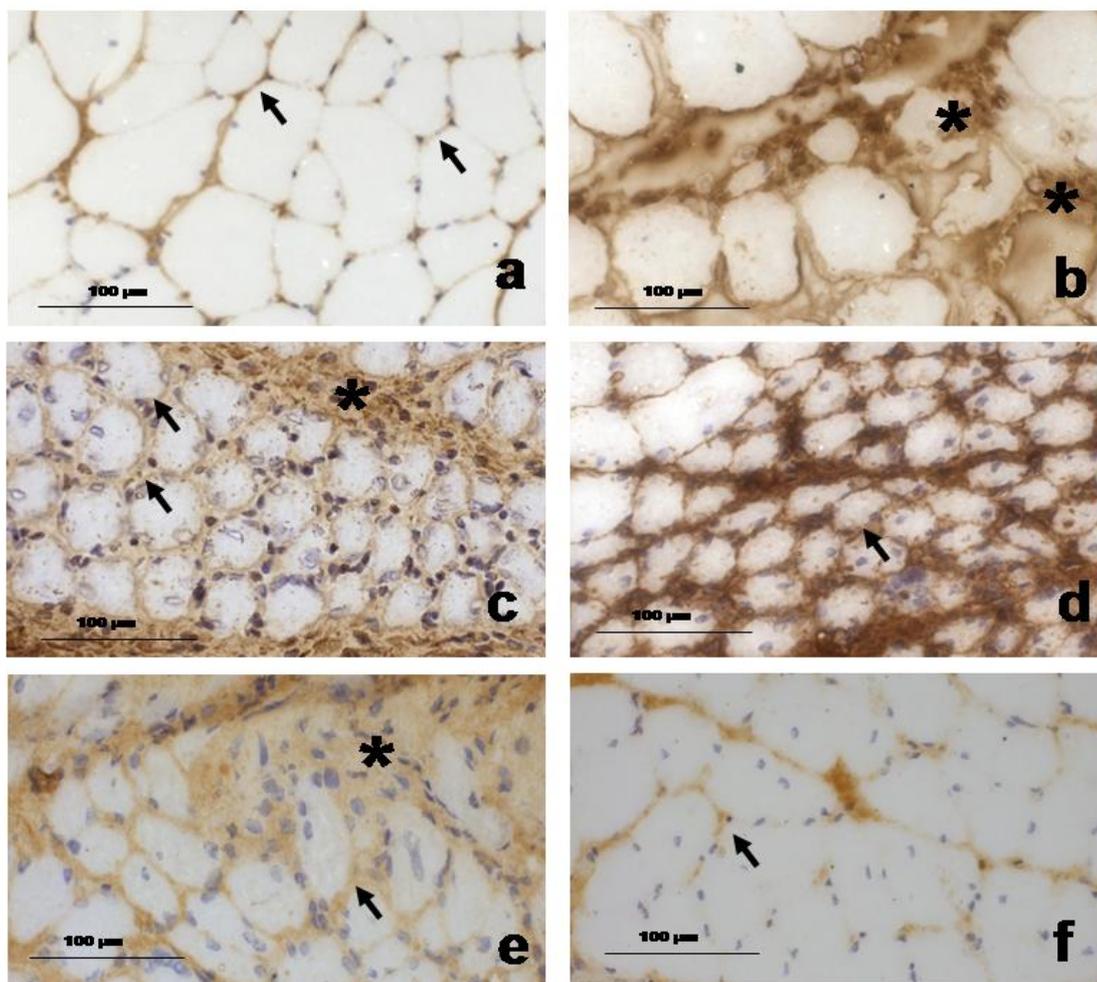


Figura 3. Fotomicrografias da marcação imunoistoquímica para colágeno III. a: grupo controle com imunomarcação tênue no endomísio (setas); b: grupo criolesionado após 1 dia mostrando marcação imunoistoquímica difusa e no interior das fibras necróticas (*); c: grupo criolesionado após 7 dias com marcação fraca no endomísio (setas) e moderada no perimísio (*); d: grupo laser aos 7 dias exibindo intensa marcação (seta); e: grupo laser aos 14 dias exibindo intensa marcação no endomísio (seta) e áreas focal de marcação dispersa onde não há fusão completa dos mioblastos. f: aos 21 dias notou-se tênue marcação no endomísio (seta). (aumento original, 400x)

Análise semiquantitativa das lâminas em coloração de hematoxilina e eosina

O gráfico 1 mostra a média dos escores dos elementos teciduais analisados e que estão diretamente envolvidos no processo de reparo muscular, de acordo com o período e o grupo experimental.

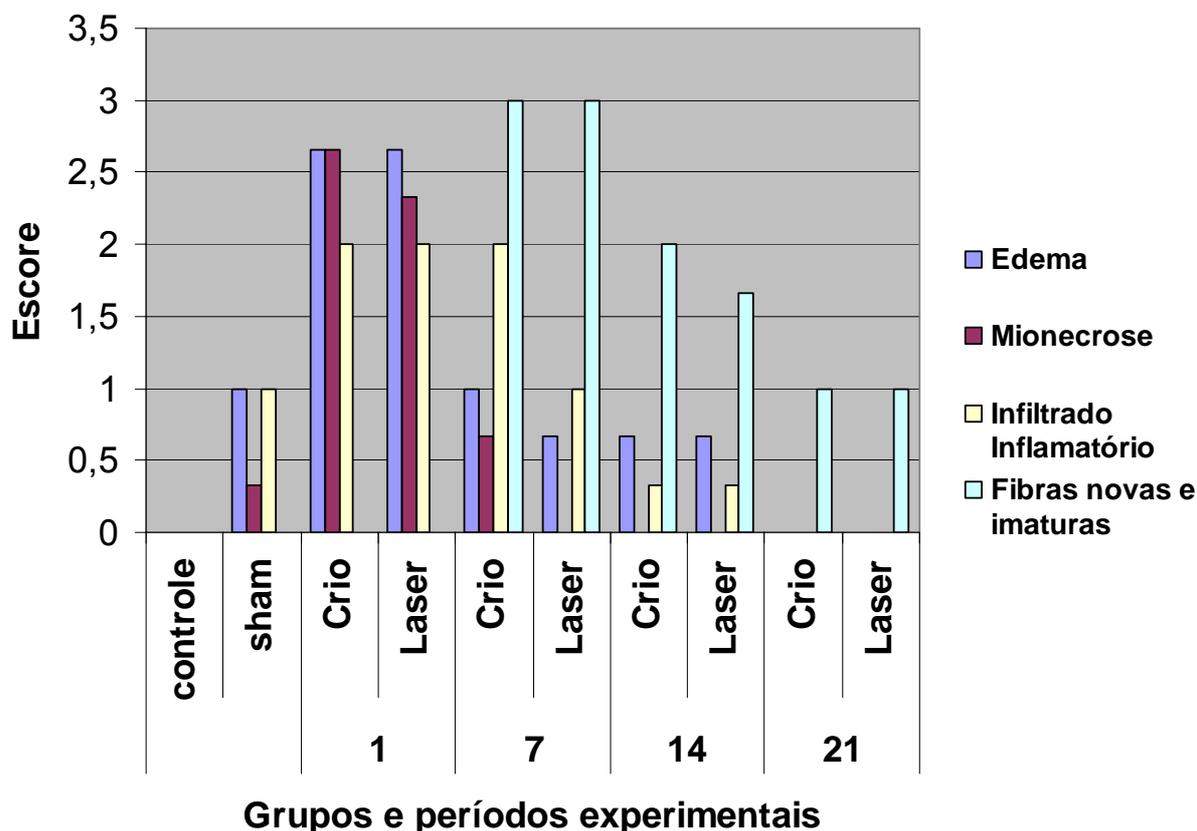


Gráfico 1. Média dos escores dos elementos teciduais analisados de acordo com o período e o grupo experimental.

Edema

A análise dos escores de edema mostrou que após o trauma cirúrgico (sham) e a criolesão houve um aumento do acúmulo de líquido intersticial, sendo que, houve uma redução estatisticamente significativa do edema tanto no grupo criolesionado ($p=0,0212$), como no laser ($p=0,0361$) ao longo do tempo mas, especialmente na análise entre o 1º e o 21º dia.

Quando realizada a análise comparativa entre os grupos pode-se observar diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e o sham ($p=0,0009$) indicando maior edema após o trauma cirúrgico. Tanto o

grupo criolesionado como o laser, quando comparados com o grupo controle, mostraram níveis superiores de edema sendo que, nos dias 1, 7 e 14 a diferença foi estatisticamente significativa. Não houve diferença significativa no edema entre o grupo criolesionado e o tratado com laser em nenhum dos tempos experimentais.

Mionecrose

A análise dos dados de mionecrose em cada grupo isoladamente mostrou haver diferenças significativas tanto no grupo criolesioando ($p=0,0228$) como no grupo laser ($p=0,00129$). Porém, no grupo criolesionado esta diferença foi demonstrada entre o 1º e 14º dia e entre o 1º e 21º dia. Estes dados indicam que, no grupo criolesionado, no 14º dia houve redução significativa da mionecrose. No grupo laser, as diferenças significativas foram observadas entre o 1º e 7º, 1º e 14º assim como, 1º e 21º dia. Estes dados indicam que no 7º dia houve redução significativa da mionecrose no grupo tratado com laser.

Quando comparado o grupo controle com o sham não foi observada diferença significativa ($p=0,1380$) quanto a presença de mionecrose.

O grupo criolesionado e o laser exibiram escores de mionecrose superiores ao grupo controle e mostraram diferença estatisticamente significativa no 1º e 7º dia após a criolesão.

Não houve diferença significativa no escore de mionecrose entre o grupo criolesionado e o tratado com laser em nenhum dos tempos experimentais.

Infiltrado inflamatório

Houve um aumento estatisticamente significativo do infiltrado inflamatório no grupo criolesionado ($p=0,0153$), porém, o teste de Dunn não revelou em quais tempos ele diferiu. O grupo laser não mostrou diferença do infiltrado inflamatório ao longo do tempo ($p=0,0512$).

Quando comparado o grupo controle com o sham foi observado maior escore de células inflamatórias no grupo sham com diferença significativa ($p=0,0009$).

Na análise entre o grupo controle com criolesionado e do controle com o laser foi observado aumento do infiltrado inflamatório sendo que, esta diferença foi, em ambos, estatisticamente significativa no 1º e 7º dia após agressão.

Foi observada diferença significativa entre o grupo sham e o criolesionado analisado após 7 dias ($p=0,0047$) sendo que, o grupo criolesionado exibiu escores maiores, indicando processo inflamatório mais intenso. Não houve diferença significativa no escore do infiltrado inflamatório entre o grupo criolesionado e o tratado com laser em nenhum dos tempos experimentais.

Fibras musculares novas e imaturas

A presença de fibras musculares novas e imaturas, que se caracteriza por fibras de diâmetro menor e com núcleo centralizado, foi analisada em cada tempo experimental e houve diferença estatisticamente significativa tanto no grupo criolesionado ($p=0,0017$) como no laser ($p= 0,0147$). A diferença em ambos os grupos experimentais foi observada entre o 1º e 7º dia após a criolesão. Estes dados mostram que no 1º dia estas células estavam ausentes e no 7º dia encontravam-se de forma abundante na área do músculo em reparação.

A avaliação entre o grupo controle e o criolesionado, assim como entre o controle e o laser mostrou que houve diferença significativa na quantidade destas fibras entre os tempos 7, 14 e 21 dias.

Foi observada maior quantidade de células novas e imaturas, com diferença estatística, no grupo criolesionado ($p=0,0047$) e no grupo laser ($p=0,0047$) quando comparados ao grupo sham. Não houve diferença significativa na análise deste tipo de fibra entre o grupo criolesionado e o laser em nenhum dos tempos experimentais.

Análise histomorfométrica quantitativa da imunomarcção de colágeno I e colágeno III

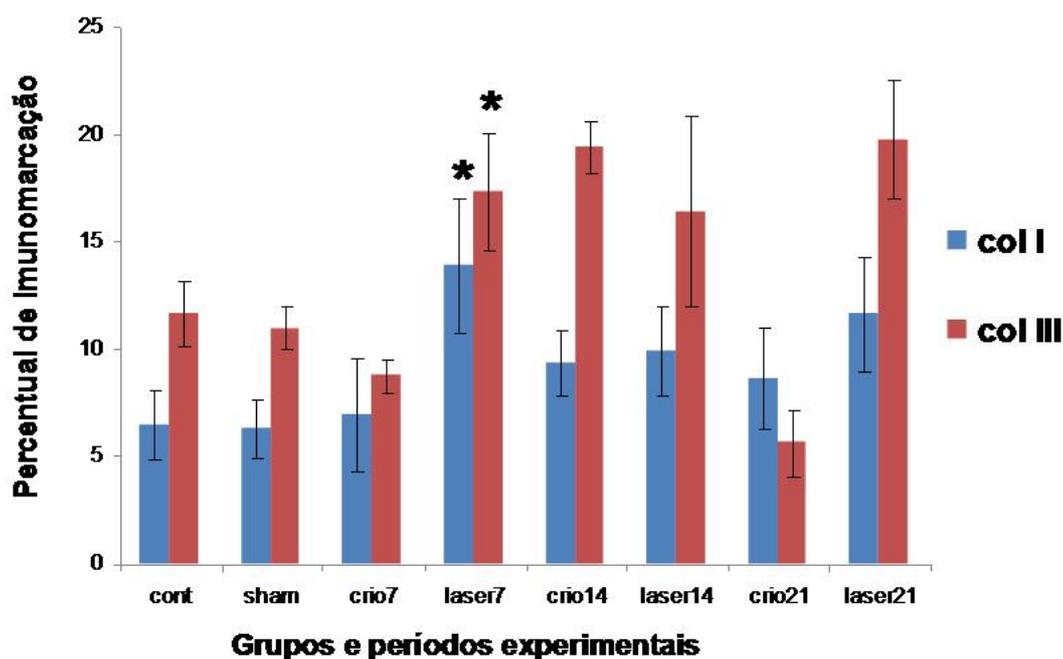
O gráfico 2 demonstra o percentual de MEC imunomarcada para o colágeno I e III obtido pela histomorfometria de acordo com o período e o grupo experimental.

A avaliação quantitativa da MEC positiva para colágeno I e colágeno III mostrou resultado semelhante, não tendo sido encontradas diferenças significativas nos grupos criolesionado e laser nos tempos avaliados de forma individualizada.

A imunomarcção de colágeno I e III entre o grupo controle x criolesionado aos 14 dias mostrou diferença estatisticamente significativa, com um aumento na presença destas proteínas no grupo criolesionado.

Ao compararmos o grupo controle com o grupo laser pode-se notar uma alteração estatisticamente significativa na deposição de colágeno em todos os tempos experimentais. O grupo laser também mostrou aumento dos colágenos em relação ao grupo sham. A análise do grupo criolesionado com o laser mostrou que, tanto para o colágeno I, como para o III, houve um aumento estatisticamente significativo aos 7 dias no grupo tratado com laser. As demais comparações não foram significativamente diferentes.

Gráfico 2 Média dos percentuais de colágeno I e III obtidos pela histomorfometria quantitativa.



Discussão

Os resultados deste estudo mostram que o LBP aplicado após trauma agudo, induzido por meio de criolesão em animais, tem efeito bioestimulador do reparo do músculo esquelético de rato, principalmente no diz respeito ao remodelamento do colágeno I e III.

O processo de reparo muscular pode ser dividido em três fases denominadas de destruição, regeneração e remodelamento tecidual. Na primeira, observa-se a formação de hematomas, necrose tecidual, degeneração e resposta inflamatória celular que ocorre nos primeiros dias após a agressão. Na segunda nota-se fagocitose do tecido degenerado, regeneração das fibras musculares, produção tecidual e crescimento vascular. Esta por sua vez, ocorre por volta de 7 a 10 dias, com pico máximo na 2ª semana diminuindo na 3ª semana. Na última fase denominada de remodelamento ocorrem os processos de maturação das fibras regeneradas e reorganização tecidual. Ao longo de todas estas etapas existe uma íntima relação entre interações entre célula-célula e célula-MEC com o objetivo de restabelecer morfológica e funcionalmente o tecido¹⁻⁴. Em nosso estudo, todas as fases do reparo muscular foram claramente observadas e, tanto no grupo criolesionado como no tratado com laser, elas ocorreram dentro do prazo esperado, que culminou com o reparo aos 21 dias. O uso do laser, portanto, não modificou temporalmente o reparo do músculo esquelético.

Na análise morfológica qualitativa e semiquantitativa do edema, da mionecrose, do infiltrado inflamatório e das fibras musculares novas buscou-se estabelecer parâmetros para melhor analisar o reparo tecidual. A comparação destes quesitos, entre o grupo criolesionado e o criolesionado tratado com laser, mostrou não haver uma diferença significativa entre eles, porém, o grupo laser mostrou uma redução na presença de mionecrose no 7º dia associado a uma intensa angiogênese, o que por sua vez, favorece a formação de novas fibras no local. Estes dados corroboram evidências da literatura de que a bioestimulação causada pelo laser produz seu principal efeito durante a fase de proliferação celular e síntese protéica (regeneração). Em alguns estudos o laser, principalmente em baixas doses e com comprimento de onda menor parece atuar como estimulador da formação de fibras musculares jovens

sugerindo ação sob as células satélites^{26,27}. Porém, em outros estudos como o de Ferreira *et al.*²⁸ o laser de diodo com diferentes parâmetros não demonstrou ação sobre a proliferação de mioblastos C2C12 em cultura celular.

Nossos principais achados foram relacionados com a imunodeteção do componente colagênico da MEC, onde foi verificado um aumento significativo no percentual de colágeno I e III na área em reparo dos músculos irradiados com laser de diodo, principalmente no dia 7 após agressão. Visto que o colágeno é um dos principais componentes da MEC do músculo e possui papel fundamental na manutenção da integridade funcional das fibras e na transmissão adequada da força durante a contração muscular, pode-se inferir que o grupo irradiado após 7 dias possui maior resistência na área lesada do que o não irradiado. Outro dado relevante é que após 14 e 21 dias o grupo criolesionado e o tratado com laser mostraram padrão semelhante na imunodeteção dos colágenos. Este fato é bastante positivo, pois, o excesso de colágeno ao final do reparo muscular indica áreas de fibrose tecidual e, assim, em nosso estudo ficou evidenciado que o laser melhora a resistência da ferida nos primeiros dias do reparo sem ocasionar fibrose tecidual ao final do reparo.

A imunomarcagem para ambos os tipos de colágeno foi intensa no 1º dia, porém, optamos por não realizar a análise quantitativa destas proteínas, pois estas proteínas teciduais, no sítio lesado não apresentam arranjo normal e estavam em processo de degradação juntamente com as células musculares lesadas. Portanto, a imunomarcagem seria referente a uma MEC em decomposição.

Estudos utilizando diferentes tipos celulares mostram que o laser pode estimular a síntese de colágeno²⁹⁻³² atuando como bioestimulador tecidual. Acredita-se que este efeito esteja baseado na ação fotoquímica do laser alterando a cadeia respiratória celular, as propriedades de oxiredução da célula que resultam em proliferação, diferenciação celular ou síntese protéica (33,34) bem como, na liberação de fatores de crescimento de células e de estimulação dos linfócitos e macrófagos.

O laser de diodo vermelho visível atinge uma profundidade de aproximadamente 1,5 cm em modo de contato^{34,35} e em nosso estudo sob os parâmetros utilizados não demonstrou ter ação antiinflamatória e sim um papel

maior na organização do estroma muscular tendo em vista sua ação no acúmulo de colágeno no local.

Acreditamos que em nosso estudo, o laser de diodo nas condições utilizadas promoveu aos 7 dias uma maior diferenciação dos mioblastos, seguido de síntese de colágeno I e III o que ocasiona uma melhor resistência ao tecido em reparo. Entretanto, o aumento tecidual destes colágenos pode estar associado a uma maior síntese destas proteínas ou a uma redução na atividade das metaloproteinases de matriz (MMPs) que não foram avaliadas neste estudo.

Os efeitos do laser no músculo variam muito entre os trabalhos previamente publicados e dependem do tipo de laser utilizado, do comprimento de onda e de todos demais parâmetros assim como, se a irradiação foi direta no músculo ou sobre a pele.

Acreditamos que novos estudos devem ser realizados com tipos de laser e parâmetros diferentes para melhor compreender a distribuição e a quantidade dos colágenos, assim como , de outros componentes da MEC durante o reparo muscular e frente ao uso do LBP para auxiliar no estabelecimento de protocolos terapêuticos que auxiliem na reabilitação muscular pós agressão.

Conclui-se que a irradiação com laser de diodo, nas condições descritas, acarretou um efeito bioestimulador, principalmente do componente colagênico em fases iniciais do reparo muscular.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de IC (processo nº 07/55439-6).

Referências Bibliográficas

1. Huard J, Li Y, Fu FH. Muscle injuries and repair: current trends in research. *J Bone Joint Surg Am.* 2002; 84-A:822-32.
2. Carmeli E, Moas M, Reznick AZ, Coleman R. Matrix metalloproteinases and skeletal muscle: a brief review. *Muscle Nerve.* 2004; 29:191-197.
3. Kjaer M. Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. *Physiol Rev.* 2004; 84:649-98.

4. Chiquet M, Matthison M, Koch M, Tannheimer M, Chiquet-Ehrismann R. Regulation of extracellular matrix synthesis by mechanical stress. *Biochem Cell Biol.* 1996; 74:737-744.
5. Foidart M, Foidart JM, Engel WK. Collagen localization in normal and fibrotic human skeletal muscle. *Arch Neurol.* 1981; 38:152-157.
6. Myllyla R, Myllyla VV, Tolonen U, Kivirikko KI. Changes in collagen metabolism in diseased muscle. I. Biochemical studies. *Arch Neurol.* 1982; 39:752-755.
7. Han XY, Wang W, Komulainen J, Koskinen SO, Kovanen V, Vihko V, Trackman PC, Takala TE. Increased mRNAs for procollagens and key regulating enzymes in rat muscle following downhill running. *Pflugers Arch.* 1999; 437:857-864.
8. Kovanen V, Suominen H, Risteli J, Risteli L. Type IV collagen and laminin in slow and fast skeletal muscle in rats--effects of age and life-time endurance training. *Coll Relat Res.* 1988; 8:145-53.
9. Zimmerman SD, McCormick RJ, Vadlamudi RK & Thomas DP. Age and training alter collagen characteristics in fast-and slow-twitch rat limb muscle. *J Appl Physiol.* 1993; 75:1670-1674.
10. Koskinen SOA, Wang W, Ahtikoski AM, Kjaer M, Han XY, Komulainen J, Kovanen V & Takala TES. Acute exercise induced changes in rat skeletal muscle mRNAs and proteins regulating type IV collagen content. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2001; 280:R1292-R1300.
11. Ahtikoski AM, Tuominen H, Korpelainen JT, Takala TE, Oikarinen A. Collagen synthesis and degradation in polyneuropathy and myopathies. *Muscle Nerve.* 2004; 30:602-8.
12. Almeida-Lopes L, Rigau J, Zângaro RA, Guiduli-Neto J, Jaeger MMM. Comparison of the low level therapy effects on cultured gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and fluence. *Lasers Surg Med.* 2001; 29:179-184.
13. Pereira AN, Eduardo CP, Matson E, Marques MM. Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. *Lasers Surg Med.* 2002; 31:263-267.

14. Marques MM, Pereira AN, Fujihara NA, Nogueira FN, Eduardo CP. Effect of low-power laser irradiation on protein synthesis and ultrastructure of human gingival fibroblasts. *Lasers Surg Med.* 2004; 34:260-265.
15. Mester E, Mester AF, Mester A. The biomedical effects of laser application. *Lasers Surg Med.* 1985; 5:31-39.
16. Longo L, Evangelista S, Tinacci G, Sesti AG. Effect of diodes-laser silver arsenide–aluminium (Ga–Al–As) 904 nm on healing of experimental wounds. *Lasers Surg Med.* 1987; 7:444-447.
17. Liu XG, Zhou YJ, Liu TC, Yuan JQ. Effects of Low-Level Laser Irradiation on Rat Skeletal Muscle Injury after Eccentric Exercise. *Photomed Laser Surg.* 2009 Aug 21.
18. Sato K, Li Y, Foster W, Fukushima K, Badlani N, Adachi N, Usas A, Fu FH, Huard J. Improvement of muscle healing through enhancement of muscle regeneration and prevention of fibrosis. *Muscle Nerve.* 2003; 28:365-372.
19. Lopes-Martins RA, Marcos RL, Leonardo PS, Prianti AC Jr, Muscará MN, Aimbire F, Frigo L, Iversen VV, Bjordal JM Effect of low-level laser (Ga-Al-As 655 nm) on skeletal muscle fatigue induced by electrical stimulation in rats. *J Appl Physiol.* 2006; 101:283-8.
20. Sussai DA, Carvalho Pde T, Dourado DM, Belchior AC, dos Reis FA, Pereira DM. Low-level laser therapy attenuates creatine kinase levels and apoptosis during forced swimming in rats. *Lasers Med Sci.* 2010; 25:115-20.
21. Miyabara EH, Aoki MS, Soares AG, Moriscot AS. Expression of tropism-related genes in regenerating skeletal muscle of rats treated with cyclosporin-A. *Cell Tissue Res.* 2005; 319:479-489.
22. Amaral AC, Parizotto NA, Salvini TF. Dose-dependency of low-energy HeNe laser effect in regeneration of skeletal muscle in mice. *Lasers Med Sci.* 2001; 16:44-51.
23. Oliveira NM, Parizzotto NA, Salvini TF. GaAs (904-nm) laser radiation does not affect muscle regeneration in mouse skeletal muscle. *Lasers Surg Med.* 1999; 25:13-21.
24. Silveira PC, Silva LA, Fraga DB, Freitas TP, Streck EL, Pinho R. Evaluation of mitochondrial respiratory chain activity in muscle healing by low-level laser therapy. *J Photochem Photobiol B.* 2009; 95:89-92.

25. Walker R A. Quantification of immunohistochemistry-issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment I. *Histochemistry* 2006; 49: 406-410.
26. Weiss N, Oron U. Enhancement of muscle regeneration in the rat gastrocnemius muscle by low energy laser irradiation. *Anat. Embryol.* 1992; 186:497-503.
27. Bibikova A, Oron U. Regeneration in denervated toad (*bufoviridis*) gastrocnemius muscle and the promotion of the process by low energy laser irradiation. *Anal. Rec.* 1995; 241:123-128.
28. Ferreira MP, Ferrari RA, Gravalos ED, Martins MD, Bussadori SK, Gonzalez DA, Fernandes KP. Effect of Low-Energy Gallium-Aluminum-Arsenide and Aluminium Gallium Indium Phosphide Laser Irradiation on the Viability of C2C12 Myoblasts in a Muscle Injury Model. *Photomed Laser Surg.* 2009 Aug 21.
29. Van Breugel HHFI, Dop Ba'r PR. Power density and exposure time of He-Ne-laser irradiation are more important than total energy dose in photobiomodulation of human fibroblasts in vitro. *Lasers Surg Med* 1992; 12:528-537.
30. Yamamoto Y, Kono T, Kotani H, Kasai S, Mito M. Effect of low-power laser irradiation on procollagen synthesis in human fibroblasts. *J Clin Laser Med Surg* 1996; 14(3):129-132;
31. Reddy GK, Stehno-Bittel L, nwemeka CS. Laser photostimulation of collagen production in healing rabbit Achilles tendons. *Lasers Surg Med* 1998;22:187-281;
32. Medrado AR, Pugliese LS, Reis SR, Andrade ZA. Influence of low level laser therapy on wound healing and its biological action upon myofibroblasts. *Lasers Surg Med* 2003; 32:239-244
33. Gutknecht N, Franze R. O laser: função , interação e segurança. IN: Gutknecht N, Eduardo CP. *Odontologia e o Laser. Atuação do laser na especialidade odontológica.* São Paulo: Quintessence; 2004.
34. Karu TI, Kolyakov SF. Exact action spectra for cellular responses relevant to phototherapy. *Photomed Laser Surg.* 2005; 23:355-61.

35. Damante CA, De Micheli G, Miyagi SP, Feist IS, Marques MM. Effect of laser phototherapy on the release of fibroblast growth factors by human gingival fibroblasts. *Lasers Med Sci.* 2009; 24:885-91.
36. Xu X, Zhao X, Liu TC, Pan H. Low-intensity laser irradiation improves the mitochondrial dysfunction of C2C12 induced by electrical stimulation. *Photomed Laser Surg.* 2008; 26:197-202.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O nosso trabalho mostrou as etapas do reparo muscular e a organização do colágeno I e III durante o remodelamento do músculo esquelético em rato após criolesão e sob o efeito do laser de diodo. Estas proteínas teciduais sofrem modificações durante a organização da MEC nas diferentes etapas do remodelamento do músculo TA, especialmente após o tratamento com o LBP.

A análise da MEC foi realizada neste estudo pela técnica imunistoquímica que permite a observação da distribuição das proteínas teciduais juntamente com a análise da morfologia. Assim pode-se estabelecer uma correlação entre a imunomarcagem do colágeno I e III, as diferentes fases do reparo muscular e o efeito do LBP neste processo. Esta metodologia tem sido pouco utilizada em músculos esqueléticos, principalmente para avaliar a composição e distribuição da MEC.

A análise morfológica dos músculos depois da criolesão mostrou remodelamento completo após 3 semanas tanto nos grupos tratados como não tratados com laser. Assim sendo, o laser não acelerou o reparo muscular.

Na análise dos constituintes teciduais envolvidos no reparo como edema, mionecrose, infiltrado inflamatório e formação de fibras musculares novas pode-se observar que o laser influenciou na redução da mionecrose aos 7 dias e, portanto, de alguma forma estimulou a substituição das células lesadas no local. Nesta fase, foi observado maior acúmulo de colágeno I e III na MEC do grupo tratado com laser. Neste momento, morfológicamente há formação de novas fibras ainda imaturas e que quando tratadas com laser provavelmente resultou numa maior síntese de colágeno tecidual ou numa menor degradação do colágeno produzido.

Nas fases mais tardias (14 e 21 dias) houve gradativa maturação das fibras musculares e da MEC. Os colágenos I e III mostraram diminuição gradual da imunomarcagem e se localizaram em torno principalmente do perimísio e endomísio sem diferença entre os grupos tratados ou não com laser.

Aos 21 dias pode-se verificar tanto morfoloicamente, como do ponto de vista imunoistoquímico, que há um restabelecimento morfológico do tecido muscular e do colágeno I e III, pois se assemelhou ao músculo controle.

Neste contexto, estes dados são importantes para que condutas reabilitadoras sejam aplicadas de forma a não gerar maior dano tecidual e possam propiciar um remodelamento adequado da MEC, restabelecendo a integridade morfológica e funcional do músculo afetado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Goldspink G. Molecular mechanisms involved in the determination of muscle fibre mass and phenotype. *Adv. Exerc. Sports Physiol.* 1999; 5: 27-39
2. Takagi T, Kitano M, Masuda S, Tokuda H, Takakura Y, Hashida M. Augmented inhibitory effect of superoxide dismutase on superoxide anion release from macrophages by direct cationization. *Biochim Biophys Acta.* 1997; Apr 17; 1335(1-2):91-8.
3. Huard J, Li Y, Fu FH. Muscle injuries and repair: current trends in research. *J Bone Joint Surg Am* 2002; 84:822-32
4. Kjaer M. Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. *Physiol Rev* 2004; 84:649-98.
5. Chiquet M, Matthison M, Koch M, Tannheimer M, Chiquet-Ehrismann R. Regulation of extracellular matrix synthesis by mechanical stress. *Biochem Cell Biol* 1996; 74:737-744.
6. Fisher BD, Rathgaber M. An overview of muscle regeneration following acute injury. *J Phys Ther Sci* 2006; 18:57-66.
7. Koskinen SAO, Kjaer M, Mohr T, Sorensen FB, Suuronen T, Takala TES. Type IV collagen and its degradation in paralyzed human muscle: effect of functional electrical stimulation. *Muscle Nerve.* 2000; 23:580-589.
8. Koskinen SO, Ahtikoski AM, Komulainen J, Hesselink MK, Drost MR, Takala TE. Short-term effects of forced eccentric contractions on collagen synthesis and degradation in rat skeletal muscle. *Pflugers Arch* 2002; 444:59-72.
9. Mackey AL, Donnelly AE, Turpeenniemi-Hujanen T, Roper HP. Skeletal muscle collagen content in humans after high-force eccentric contractions. *J Appl Physiol* 2004; 97:197-203.
10. Myllylä R, Myllylä VV, Tolonen U, Kivirikko KI. Changes in collagen metabolism in diseased muscle. I. Biochemical studies. *Arch Neurol.* 1982; 39:752-755.
11. Foidart M, Foidart JM, Engel WK. Collagen localization in normal and fibrotic human skeletal muscle. *Arch Neurol.* 1981; 38:152-157.

12. Savolainen J, Väänänen K, Vihko V, Puranen J, Takala TES. Effect of immobilization on collagen synthesis in rat skeletal muscles. *Am J Physiol* 1987; 252:R883-R888
13. Sato K, Li Y, Foster W, Fukushima K, Badlani N, Adachi N, Usas A, Fu FH, Huard J. Improvement of muscle healing through enhancement of muscle regeneration and prevention of fibrosis. *Muscle Nerve* 2003; 28:365-372.
14. Rochkind S. Phototherapy in peripheral nerve injury for muscle preservation and nerve regeneration. *Photomed Laser Surg.* 2009 Apr; 27(2):219-20.
15. Lopes-Martins RA, Marcos RL, Leonardo PS, Prianti AC Jr, Muscará MN, Aimbire F, Frigo L, Iversen VV, Bjordal JM. Effect of low-level laser (Ga-Al-As 655 nm) on skeletal muscle fatigue induced by electrical stimulation in rats. *J Appl Physiol.* 2006 Jul;101(1):283-8
16. Douris P, Southard V, Ferrigi R, Grauer J, Katz D, Nascimento C, Podbielski P. Effect of phototherapy on delayed onset muscle soreness. *Photomed Laser Surg.* 2006 Jun; 24(3):377-82.
17. Liu XG, Zhou YJ, Liu TC, Yuan JQ. Effects of Low-Level Laser Irradiation on Rat Skeletal Muscle Injury after Eccentric Exercise. *Photomed Laser Surg.* 2009 Aug 21
18. Oliveira NM, Parizzotto NA, Salvini TF. GaAs (904-nm) laser radiation does not affect muscle regeneration in mouse skeletal muscle. *Lasers Surg Med.* 1999; 25(1):13-21.
19. Amaral AC, Parizzotto NA, Salvini TF. Dose-dependency of low-energy HeNe laser effect in regeneration of skeletal muscle in mice. *Lasers Med Sci.* 2001; 16(1):44-51.
20. Leal Junior EC, Lopes-Martins RA, Dalan F, Ferrari M, Sbabo FM, Generosi RA, Baroni BM, Penna SC, Iversen VV, Bjordal JM. Effect of 655-nm low-level laser therapy on exercise-induced skeletal muscle fatigue in humans. *Photomed Laser Surg.* 2008 Oct; 26(5):419-24
21. Sussai DA, Carvalho Pde T, Dourado DM, Belchior AC, dos Reis FA, Pereira DM. Low-level laser therapy attenuates creatine kinase levels

- and apoptosis during forced swimming in rats. *Lasers Med Sci.* 2010 Jan; 25(1):115-20.
22. Fisher BD, Rennie S, Warren S, Magee D, Koh J. The effects of low power laser therapy on muscle healing following acute blunt trauma. *J Phys Ther Sci* 2000; 12:49-55.
23. Medrado AR, Pugliese LS, Reis SR, Andrade ZA. Influence of low level laser therapy on wound healing and its biological action upon myofibroblasts. *Lasers Surg Med* 2003; 32:239-244.
24. Shefer G, Partridge TA, Heslop L, Gross JG, Oron U, Halevy O. Low-energy laser irradiation promotes the survival and cell cycle entry of skeletal muscle satellite cells. *J Cell Sci.* 2002; Apr 1; 115(Pt 7):1461-9.
25. Craig JA, Barron J, Walsh DM, Baxter GD. Lack of effect of combined low intensity laser therapy/phototherapy (CLILT) on delayed onset muscle soreness in humans. *Lasers Surg Med.* 1999; 24(3):223-30
26. Glasgow PD, Hill ID, McKeivitt AM, Lowe AS, Baxter D. Low intensity monochromatic infrared therapy: a preliminary study of the effects of a novel treatment unit upon experimental muscle soreness. *Lasers Surg Med.* 2001; 28(1):33-9.
27. Ferreira MP, Ferrari RA, Gravalos ED, Martins MD, Bussadori SK, Gonzalez DA, Fernandes KP. Effect of Low-Energy Gallium-Aluminum-Arsenide and Aluminium Gallium Indium Phosphide Laser Irradiation on the Viability of C2C12 Myoblasts in a Muscle Injury Model. *Photomed Laser Surg.* 2009 Aug 21.
28. Craig JA, Barlas P, Baxter GD, Walsh DM, Allen JM. Delayed onset muscle soreness: lack of effect of combined phototherapy/low intensity therapy at low pulse repetition rates. *J Clin Laser* 1996; 14:375-380.
29. Ben-Dov N, Shefer G, Irintchev A, Wernig A, Oron U, Halevy O. Low-energy laser irradiation affects satellite cell proliferation and differentiation in vitro. *Biochim Biophys Acta.* 1999 Jan 11; 1448(3):372-80.
30. Comelekoglu U, Bagis S, Buyukakilli B, Sahin G, Erdogan C. Electrophysiologic effect of gallium arsenide laser on frog gastrocnemius muscle. *Lasers Surg Med.* 2002; 30(3):221-6.

31. Pereira AN, Eduardo CP, Matson E, Marques MM. Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. *Lasers Surg Méd.* 2002; 31:263-267.
32. Marques MM, Pereira AN, Fujihara NA, Nogueira FN, Eduardo CP. Effect of low-power laser irradiation on protein synthesis and ultrastructure of human gingival fibroblasts. *Lasers Surg Med.* 2004; 34:260-265.

ANEXO 1

Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa – UNINOVE



Comitê de Ética em Pesquisa – CoEP – UNINOVE
Av. Francisco Matarazzo, 612 – Prédio C – Térreo
comitedeetica@uninove.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado **INFLUÊNCIA DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA NO REMODELAMENTO DO COLÁGENO IV DE MÚSCULOS DE RATO EM REGENERÇÃO APÓS CRIOLEÇÃO**, protocolo nº **AN013/2007** sob responsabilidade de **RAQUEL AGNELLI MESQUITA**, está de acordo com os princípios éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação em Animal (COBEA), e foi **APROVADO** pelo Comitê de Ética da UNINOVE.

São Paulo, 04 de Dezembro de 2007

Profa. Dra. Daniela Ap. Biasotto-Gonzalez
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa
Centro Universitário Nove de Julho

ANEXO 2

Média da gradação dos elementos teciduais analisados no processo de reparo muscular, de acordo com o período e o grupo experimental.

Tempos e grupos			1		7		14		21	
experimentais	controle	sham	Crio	Laser	Crio	Laser	Crio	Laser	Crio	Laser
			Edema	0	1	2,66	2,66	1	0,667	0,667
Mionecrose	0	0,33	2,66	2,33	0,67	0	0	0	0	0
Infiltrado Inflamatório	0	1	2	2	2	1	0,33	0,33	0	0
Fibras novas e imaturas	0	0	0	0	3	3	2	1,66	1	1

Análise semiquantitativa- Resultado do teste de Kruskal-Wallis para o grupo criolesionado comparando os tempos pelo teste de Dunn.

Variável	Teste	Estatística do teste	p-valor	
Edema	Kruskal-Wallis	9,706	0,0212	
	Teste de Comparação múltipla de Dunn	Diferenças	p-valor	
	Tempo 1 x Tempo 2	4	P > 0.05	ns
	Tempo1 x Tempo 3	5,5	P > 0.05	ns
	Tempo1 x Tempo 4	8,5	P < 0.05	*
	Tempo 2 x Tempo 3	1,5	P > 0.05	ns
	Tempo 2 x Tempo 4	4,5	P > 0.05	ns
	Tempo 3 x Tempo 4	3	P > 0.05	ns
mionecrose	Kruskal-Wallis	9,553	0,0228	
	Teste de Comparação múltipla de Dunn	Diferenças	p-valor	
	Tempo 1 x Tempo 2	4	P > 0.05	ns
	Tempo1 x Tempo 3	7	P < 0.05	*
	Tempo1 x Tempo 4	7	P < 0.05	*
	Tempo 2 x Tempo 3	3	P > 0.05	ns
	Tempo 2 x Tempo 4	3	P > 0.05	ns
	Tempo 3 x Tempo 4	0	P > 0.05	ns
Infiltrado	Kruskal-Wallis	10,43	0,0153	
	Teste de Comparação múltipla de Dunn	Diferenças	p-valor	
	Tempo 1 x Tempo 2	0	P > 0.05	ns
	Tempo1 x Tempo 3	5,5	P > 0.05	ns
	Tempo1 x Tempo 4	6,5	P > 0.05	ns
	Tempo 2 x Tempo 3	5,5	P > 0.05	ns
	Tempo 2 x Tempo 4	6,5	P > 0.05	ns
	Fibras musculares novas	Kruskal-Wallis	11	0,0017

Teste de Comparação múltipla de Dunn	Diferenças	p-valor	
Tempo 1 x Tempo 2	-9	P < 0.05	*
Tempo1 x Tempo 3	-6	P > 0.05	ns
Tempo1 x Tempo 4	-3	P > 0.05	ns
Tempo 2 x Tempo 3	3	P > 0.05	ns
Tempo 2 x Tempo 4	6	P > 0.05	ns
Tempo 1 x Tempo 2	3	P > 0.05	ns

Análise semiquantitativa- Resultado do teste de Kruskal-Wallis para o grupo laser comparando os tempos pelo teste de Dunn.

Variável	Teste	Estatística do teste	p-valor
Edema	Kruskal-Wallis	8,541	0,0361
	Teste de Comparação múltipla de Dunn	Diferenças	p-valor
	Tempo 1 x Tempo 2	5	P > 0.05 ns
	Tempo1 x Tempo 3	5	P > 0.05 ns
	Tempo1 x Tempo 4	8	P < 0.05 *
	Tempo 2 x Tempo 3	0	P > 0.05 ns
	Tempo 2 x Tempo 4	3	P > 0.05 ns
	Tempo 1 x Tempo 2	3	P > 0.05 ns
Mionecrose	Kruskal-Wallis	10,8	0,00129
	Teste de Comparação múltipla de Dunn	Diferenças	p-valor
	Tempo 1 x Tempo 2	6	P < 0.05 *
	Tempo1 x Tempo 3	6	P < 0.05 *
	Tempo1 x Tempo 4	6	P < 0.05 *
	Tempo 2 x Tempo 3	0	P > 0.05 ns
	Tempo 2 x Tempo 4	0	P > 0.05 ns
	Tempo 1 x Tempo 2	0	P > 0.05 ns
Infiltrado	Kruskal-Wallis	7,761	0,0512
	Teste de Comparação múltipla de Dunn	Diferenças	p-valor
	Tempo 1 x Tempo 2	3	P > 0.05 ns
	Tempo1 x Tempo 3	6	P > 0.05 ns
	Tempo1 x Tempo 4	7	P > 0.05 ns
	Tempo 2 x Tempo 3	3	P > 0.05 ns
	Tempo 2 x Tempo 4	4	P > 0.05 ns
	Tempo 1 x Tempo 2	1	P > 0.05 ns
Fibras musculares novas	Kruskal-Wallis	10,51	0,0147
	Teste de Comparação múltipla de Dunn	Diferenças	p-valor
	Tempo 1 x Tempo 2	-9	P < 0.05 *
	Tempo1 x Tempo 3	-5,5	P > 0.05 ns

Tempo1 x Tempo 4	-3,5	P > 0.05	ns
Tempo 2 x Tempo 3	3,5	P > 0.05	ns
Tempo 2 x Tempo 4	5,5	P > 0.05	ns
Tempo 1 x Tempo 2	2	P > 0.05	ns

Comparações entre grupos estratificados por tempo pelo teste da mediana.

Variável	Tempo	1		7		14		21	
		Comparaçã	teste	p-valor	teste	p-valor	teste	p-valor	teste
Edema	Cont x Sham	-	-	0,0	0,0009*	-	-	-	-
	Cont x Crio	3,0	0,0023*	3,0	0,0047*	2,2857	0,0325*	1,3333	1,000
	Cont x laser	3,0	0,0047*	2,2857	0,0325*	2,2857	0,0325*	1,333	1,000
	Sham x crio	-	-	1,3333	1,000	-	-	-	-
	Sham x laser	-	-	1,0	0,1573	-	-	-	-
	Crio x laser	1,5	1,000	1,8	0,3173	1,5	1,000	1,5	1,000
Mio	Cont x Sham	-	-	2,4	0,1380	-	-	-	-
	Cont x Crio	3,0	0,0047*	2,2857	0,0325*	1,3333	1,0000	1,3333	1,000
	Cont x laser	3,0	0,0047*	2,2857	0,0325*	1,75	1,0000	1,3333	1,000
	Sham x crio	-	-	2,0	0,3211	-	-	-	-
	Sham x laser	-	-	0,8571	0,2850	-	-	-	-
	Crio x laser	1,5	1,000	2,25	0,1138	1,5	1,000	1,5	1,000
Infiltrado	Cont x Sham	-	-	0,0	0,0009*	-	-	-	-
	Cont x Crio	3,0	0,0047*	3,0	0,0047*	1,75	0,1573	1,3333	1,000
	Cont x laser	3,0	0,0047*	2,2857	0,0325*	1,75	0,1573	1,3333	1,000
	Sham x crio	-	-	3,0	0,0047*	-	-	-	-
	Sham x laser	-	-	1,4286	0,7893	-	-	-	-
	Crio x laser	1,5	1,000	2,25	0,1138	1,5	1,000	1,5	1,000
Fibras Novas	Cont x Sham	-	-	3,0	1,0	-	-	-	-
	Cont x Crio	1,3333	1,0	3,0	0,0047	3,0	0,0047*	3,0	0,0047*
	Cont x laser	1,333	1,0	3,0	0,047	3,0	0,047*	3,0	0,047*
	Sham x crio	-	-	3,0	0,0047*	-	-	-	-
	Sham x laser	-	-	3,0	0,0047*	-	-	-	-
	Crio x laser	1,5	1,000	1,5	1,000	1,8	0,3173	1,5	1,000

*Diferença estatisticamente significativa

Análise quantitativa- Teste de Kruskal-Wallis para 3 tempos para o grupo criolesionado

Variável	Teste	Estatística	p-valor
Col 1	Kruskal-Wallis	2,667	0,2636
	Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	P value
	Tempo 7 x Tempo 14	-1,5	P > 0.05
	Tempo 7 x Tempo 21	-3	P > 0.05
	Tempo 14 x Tempo 21	-1,5	P > 0.05
Col3	Kruskal-Wallis	4,413	0,1101
	Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	P value
	Tempo 7 x Tempo 14	-3,833	P > 0.05
	Tempo 7 x Tempo 21	-2,667	P > 0.05
	Tempo 14 x Tempo 21	1,167	P > 0.05

Análise quantitativa- Teste de Kruskal-Wallis para 3 tempos para o grupo tratado com laser

Variável	Teste	Estatística	p-valor		
Col 1	Kruskal-Wallis	0,8	0,6703		
	Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	P value	Summary	
	Tempo 7 x Tempo 14		-1,5	P > 0.05	ns
	Tempo 7 x Tempo 21		-1,5	P > 0.05	ns
	Tempo 14 x Tempo 21		0	P > 0.05	ns
Col3	Kruskal-Wallis	5,6	0,0608		
	Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	P value	Summary	
	Tempo 7 x Tempo 14		1,5	P > 0.05	ns
	Tempo 7 x Tempo 21		4,5	P > 0.05	ns
	Tempo 14 x Tempo 21		3	P > 0.05	ns

Análise quantitativa- Comparações das medianas da análise quantitativa da imunomarcação do colágeno I e III entre os grupos experimentais e estratificados pelo tempo.

Variável	Comparação	T7		T14		T21	
		teste	p-valor	teste	p-valor	teste	p-valor
Colag 1	Cont x Sham	4,0	0,6469	-	-	-	-
	Cont x Crio	4,0	0,6270	7,0	0,0220*	6,0	0,1693
	Cont x laser	7,0	0,0220*	7,0	0,0220*	8,0	0,0013*
	Sham x crio	4,0	0,6469	-	-	-	-
	Sham x laser	8,0	0,0007*	-	-	-	-
	Crio x laser	2,0	0,0220*	4,0	0,6469	3,0	0,1693
Colag 3	Cont x Sham	4,0	0,6469	-	-	-	-
	Cont x Crio	4,0	0,6270	7,0	0,0220*	6,0	0,1693
	Cont x laser	7,0	0,0220*	7,0	0,0220*	8,0	0,0013*
	Sham x crio	4,0	0,6469	-	-	-	-
	Sham x laser	8,0	0,0007*	-	-	-	-
	Crio x laser	2,0	0,0220*	4,0	0,6469	3,0	0,1693

*Diferença estatisticamente significativa

ANEXO 3



Página inicial > Usuário > Autor > **Submissões Ativas**

Submissões Ativas

<ul style="list-style-type: none"> • ATIVO • ARQUIVO 				
ID	MM-DD ENVIAR SEC	AUTORES	TÍTULO	STATUS
RBFIS- 446	12-07	ARTORIG MARTINS	EFEITO DA FOTOTERAPIA COM LASER DE BAIXA INTENSIDADE NO...	Aguardando designação

1 a 1 de 1 Itens

Iniciar Nova Submissão

[CLIQUE AQUI](#) para iniciar os cinco passos do processo de Submissão.

Revista Brasileira de Fisioterapia
Rodovia Washington Luís, km 235 - SP-310
São Carlos - São Paulo - Brasil - CEP 13565-905
Telefone: +55-16-3351-8755
