



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE (CCBS)**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA**

**TERAPIA LASER DE BAIXA INTENSIDADE A 808 nm REDUZ A  
RESPOSTA INFLAMATÓRIA E FAVORECE A REGENERAÇÃO  
MUSCULAR**

**LÍVIA RIBEIRO DE ASSIS**

**SÃO CARLOS-SP**  
**2012**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE (CCBS)  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA**

**TERAPIA LASER DE BAIXA INTENSIDADE A 808 nm REDUZ A  
RESPOSTA INFLAMATÓRIA E FAVORECE A REGENERAÇÃO  
MUSCULAR**

**LÍVIA RIBEIRO DE ASSIS**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Fisioterapia.**

**Orientador: Prof. Dr. Nivaldo Antônio Parizotto (UFSCar)**

**Co-orientadora: Profa. Dra. Ana Iochabel Soares Moretti (FM-USP)**

**Apoio financeiro: CAPES**

**São Carlos-SP  
2012**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

A848tL

Assis, Lívia Ribeiro de.

Terapia laser de baixa intensidade a 808 nm reduz a resposta inflamatória e favorece a regeneração muscular / Lívia Ribeiro de Assis. -- São Carlos : UFSCar, 2012. 80 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2012.

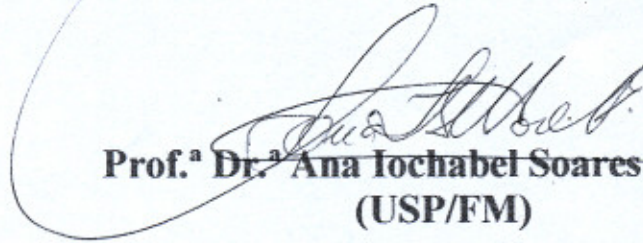
1. Fisioterapia. 2. Regeneração muscular. 3. Laser de baixa intensidade. 4. Lesão muscular. 5. Músculo estriado esquelético. 6. Reabilitação. I. Título.

CDD: 615.82 (20<sup>a</sup>)

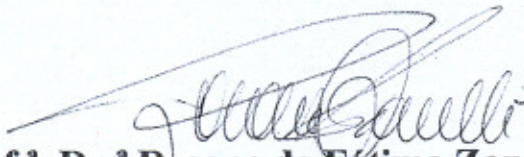
FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da banca examinadora para defesa de tese de doutorado de LIVIA RIBEIRO DE ASSIS, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos, em 02 de março de 2012

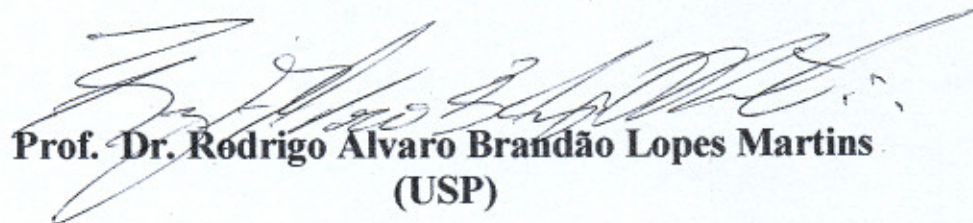
Banca Examinadora:



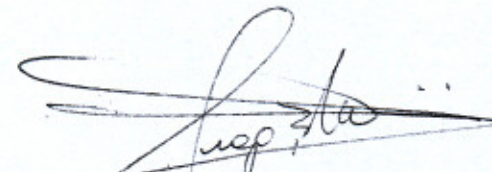
Prof.ª Dr.ª Ana Iochabel Soares Moretti  
(USP/FM)




Prof.ª Dr.ª Rosane de Fátima Zanirato Lizarelli  
(USP-São Carlos)



Prof. Dr. Rodrigo Alvaro Brandão Lopes Martins  
(USP)



Prof.ª Dr.ª Davilene Gigo Benato  
(UFSCar)



Prof.ª Dr.ª Sabrina Peviani Messa  
(UFSCar)

## ***Dedicatória***

*À minha mãe, Maria Aparecida Buck de Assis, por ser o alicerce de cada etapa sonhada e cumprida. Pela imensa compreensão, incentivo e auxílio em todos os momentos da minha vida, minha infinita gratidão!*

*Ao meu pai, Benedito Ribeiro de Assis, por tudo que você é e representa para mim.*

*Ao meu marido, Thiago Brino Garcia, que desde 25 de outubro de 2000, tem sido meu maior incentivador na busca dos meus objetivos. Mais do que marido, você é minha fortaleza, meu grande amigo e companheiro em todos os momentos. Obrigada por tudo!*

*Ao meu orientador, Nivaldo Antônio Parizotto, por ter me orientado e confiado em meu trabalho. Por respeitar minhas limitações e me ensinar a superá-las; por me mostrar o caminho da pesquisa, pelos conselhos, e principalmente pela grande amizade. O meu crescimento profissional e pessoal certamente se deve à sua competência e exemplo. Homem admirável! Muito Obrigada!*

*À minha co-orientadora, Ana Iochabel Moretti (Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, FM/USP). Minhas palavras por você são de gratidão, pelos constantes ensinamentos, pela orientação, paciência e companheirismo. Pelas críticas construtivas e palavras de incentivo que me fizeram enxergar longe. Pela atenção e conversas em momentos inoportunos (quantos finais de semanas). Admiro-te pela competência e sabedoria. Obrigada por tudo!*

## *Agradecimentos*

*À Deus, "Por me dar a serenidade para aceitar as coisas que não posso mudar, a coragem para modificar as coisas que posso e a sabedoria para distinguir a diferença".*

*A toda minha família, pelo apoio, amor e carinho. Obrigada por fazerem parte da minha vida.*

*Ao Prof. Dr. Heraldo Possolo Souza, o qual me recebeu em seu laboratório (Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, FM-USP, LIM-51) e disponibilizou-me a estrutura necessária para que os experimentos desta tese pudessem ser realizados. Agradeço também à sua valiosa equipe de trabalho, a qual me acolheu com maior carinho e dedicação, em especial: Vivian, Cristiane, Ester, Flavinha, Mariana, Ana Lídia, Ricardo, Kelly, Sueli, Márcia, Geraldo, Thais, Hermes e Denise.*

*Ao Prof. Dr. Hermes Pretel, pelas contribuições na avaliação final deste trabalho, pela troca de experiência, sugestões, conversas e amizade.*

*À Profa. Dra. Luciana Almeida Lopes e a toda equipe DMC por me fornecerem o equipamento laser utilizado durante toda pesquisa.*

*À Profa. Dra. Thalita Abrahão e Prof. Dr. Michael R. Hamblim pelo auxílio na tradução dos manuscritos e pela troca de experiência profissional.*

*Ao Prof. Dr. Charles Taciro, pela amizade, atenção e carinho ao longo de todo esse tempo.*

*À amiga Maria Luiza e aos meus amados primos Uildner e Elaine, por terem me acolhido em suas casas no período inicial deste trabalho, sempre com muita atenção e carinho. Muito Obrigada!*

*Aos companheiros e amigos do Laboratório de Eletrotermofototerapia da Universidade Federal de São Carlos, pela agradável convivência.*

*Aos Professores: Profa. Dra. Rosane Lizarelli, Prof. Dr. Rodrigo Alvaro B. Lopes Martins, Profa. Dra. Davilene Gigo-Benatto, Profa. Dra. Sabrina Messa Peniavi, Prof. Dr. Thiago Luiz Russo, Prof. Dr. Hermes Pretel e Prof. Dr. João Luis Durigan, que aceitaram o*

*convite como membros de minha banca. As preciosas sugestões propostas serão com certeza de grande valia para a execução final deste trabalho.*

*À Kelly, secretária da Pós Graduação em Fisioterapia da UFSCar, por sempre me auxiliar nas questões burocráticas.*

*À CAPES, CNPQ e FAPESP, pelo apoio financeiro do projeto.*

*A todas as pessoas que contribuíram diretamente ou indiretamente para a realização deste trabalho.*

*Muito obrigada!*

*"O mundo está nas mãos daqueles que tem  
coragem de sonhar, e correr o risco de viver os  
seus sonhos. Cada qual com seus talentos"*

**Paulo Coelho**



## **APRESENTAÇÃO**

A presente tese foi motivada pela pretensão de responder à seguinte questão: o tratamento com a terapia laser de baixa intensidade (808 nm) é capaz de reduzir a resposta inflamatória e modular marcadores moleculares envolvidos na regeneração e/ou fibrose presentes durante a regeneração muscular? A busca pela resposta conduziu ao desenvolvimento de ensaios experimentais durante o período do doutorado junto ao laboratório de pesquisa da disciplina de Emergências Clínicas, Departamento de Clínica Médica da Universidade de São Paulo (FM-USP), sob orientação do Prof. Dr. Nivaldo Antônio Parizotto (UFSCar) e co-orientação da Prof. Dra. Ana Iochabel Soares Moretti (FM-USP). Assim, o conteúdo da presente tese é apresentado em três partes.

A primeira parte abrange um resumo, uma breve introdução e os objetivos gerais e específicos do presente trabalho.

A segunda parte é apresentada em formato de dois manuscritos. O primeiro manuscrito verifica os efeitos da terapia laser de baixa intensidade sobre o estresse oxidativo/nitrativo e mediadores inflamatórios produzidos durante a regeneração muscular, denominado: “Terapia Laser de Baixa Intensidade (808 nm) reduz a resposta inflamatória e o estresse oxidativo do músculo tibial anterior de ratos após criolesão”, o qual foi submetido ao periódico *"Lasers in Surgery and Medicine"* (Anexos). O segundo manuscrito relata experimentos conduzidos a fim de averiguar os efeitos da terapia laser de baixa intensidade em marcadores moleculares envolvidos na regeneração e/ou fibrose muscular após criolesão muscular em ratos, denominado: “Terapia Laser de Baixa Intensidade (808 nm) favorece a regeneração muscular e previne a fibrose do músculo tibial anterior de ratos após criolesão”, o qual foi submetido ao periódico *"Lasers in Medical Science"* (Anexos).

A terceira parte da tese é composta das considerações finais obtidas a partir dos resultados experimentais, anexos e as referências bibliográficas utilizadas na introdução da tese.

## ABREVIACES

AsGa: Arseneto de Gálio

AsGaAl: Arseneto de Gálio e Alumneo

AsGaInP: Arseneto de Gálio ndio e Fosforo

ATP: Adenosina trifosfato

CK: Creatina quinase (*creatina kinase*)

cm: centímetro

cm<sup>2</sup>: centímetro quadrado

COX-2: Ciclo-oxigenase do tipo 2

CS: Células satélites

DMI: Dor muscular de início tardio

EGF: Fator de crescimento epidermal (do inglês: *Epidermal growth factor*)

FA: Fosfatase cida

FGF: Fator de crescimento de fibroblastos (do inglês: *Fibroblastic grow factor*)

J: Joule

J/cm<sup>2</sup>: Joule por centímetro quadrado

HeNe: Hélio Neônio

HGF: Fator de crescimento do hepatócito (do inglês: *Hepatocyte growth factor*)

IGF-1: Fator de crescimento semelhante  insulina (do inglês: *Insulin like growth factor*)

IL-1: Interleucina 1 beta

IL-6: Interleucina 6

iNOS: xido nítrico sintase induzida (do inglês: *inducible nitric oxide synthase*)

Ik: Inibidor kappa-é (do inglês: *inhibitor kinase kappa beta*)

Ik: Inibidor kappa quinase (do inglês: *inhibitor kappa kinase*)

LLLT: Terapia laser de baixa intensidade (do inglês: *Low Level Laser Therapy*)

MAPK/ERK: Proteína quinase ativada por mitógeno/quinase regulada por sinal extracelular  
(do inglês: *Mitogen-Activated Protein kinases/Extracellular regulated kinase*)

MEC: Matriz extracelular

mim: minutos

MRF4: Fator regulatório miogênico 4 (do inglês: *Myogenic regulatory factor 4*)

MRFs: Fatores regulatórios miogênicos (do inglês: *Myogenic regulatory factor*)

mRNA: Ácido ribonucléico (RNA) mensageiro

myf5: Fator miogênico 5 (do inglês: *Myogenic regulatory factor 5*)

myoD: Fator miogênico de diferenciação-1 (do inglês: *Myogenic regulatory factor 1*)

NF- $\kappa$ B: fator de transcrição nuclear kappa- $\beta$  (do inglês: *factor nuclear kappa beta*)

NO: Óxido nítrico (do inglês: *Nitric Oxide*)

NOS: Óxido nítrico sintase

O<sub>2</sub><sup>·-</sup>: Radical ânion superóxido

ONOO<sup>-</sup>: Peroxinitrito

PO: Pós-operatório

PG: Prostaglandina

RNS: Espécies reativas de nitrogênio (do inglês: *reactive nitrogen species*)

ROS: Espécies reativas de oxigênio (do inglês: *reactive oxygen species*)

RT-PCR: reação em cadeia de polimerase com transcrição reversa (do inglês: *reverse transcriptase polymerase chain reaction*)

s: segundos

SOD: Superóxido dismutase (do inglês: *superoxido dismutase*)

t: tempo

TA: Tibial anterior

TB: Azul de Toluidina/1% borax (do inglês: *Toluidine Blue*)

TGF- $\beta$ : Fator de transformação do crescimento- $\beta$ 1 (do inglês: *Transforming growth factor- $\beta$* )

TNF- $\alpha$ : Fator de necrose tumoral alfa (do inglês: *Tumor necrosis factor-alpha*)

VEGF: Fator de crescimento do endotélio vascular (do inglês: *Vascular endothelial growth factor*)

> : Maior que

< : Menor que

$\lambda$ : Lambida (determina o comprimento de onda)

---

---

## *Sumário*

---

---

<b>PARTE I</b> .....	<b>1</b>
<b>1</b> <b>Resumo</b> .....	<b>2</b>
<b>2</b> <b>Introdução</b> .....	<b>3</b>
<b>3</b> <b>Objetivo</b> .....	<b>10</b>
<b>3.1</b> <b>Objetivo Geral</b> .....	<b>10</b>
<b>3.2</b> <b>Objetivo Específico</b> .....	<b>10</b>
<b>PARTE II</b> .....	<b>11</b>
<b>4</b> <b>Manuscrito I</b>	
<b>Terapia Laser de Baixa Intensidade reduz a resposta inflamatória e o estresse oxidativo do músculo tibial anterior de ratos após criolesão</b> .....	<b>12</b>
<b>5</b> <b>Manuscrito II</b>	
<b>Terapia Laser de Baixa Intensidade favorece a regeneração muscular e previne a fibrose do músculo tibial anterior de ratos após criolesão</b> .....	<b>43</b>
<b>PARTE III</b> .....	<b>69</b>
<b>6</b> <b>Considerações finais</b> .....	<b>70</b>
<b>7</b> <b>Referencias Bibliográficas</b> .....	<b>71</b>
<b>8</b> <b>Anexos</b> .....	<b>77</b>

*Parte I*

---

---

## RESUMO

A regeneração muscular é uma adaptação que ocorre em resposta ao traumatismo e envolve ações integradas entre células, matriz e mensageiros químicos, visando restaurar o equilíbrio biológico e a integridade funcional e estrutural do tecido. Durante o período de reabilitação, existe uma crescente preocupação em modular estes processos a fim de prevenir complicações indesejáveis e favorecer a recuperação funcional do músculo lesado. A constatação terapêutica das aplicações do laser de baixa intensidade (LLLT- *Low Level Laser Therapy*) no tratamento clínico de afecções que acometem o tecido músculo esquelético é atualmente bastante conhecida, contudo as vias de sinalização acionadas pela LLLT permanecem incertas. O objetivo desta tese foi avaliar os efeitos da terapia laser de baixa intensidade sobre a resposta inflamatória e regenerativa/cicatrizial após criolesão do músculo tibial anterior em ratos. Foi utilizado um laser AsGaAl (contínuo;  $\lambda = 808$  nm;  $P = 30$  mW; área do feixe =  $0.00785$  cm<sup>2</sup>;  $t = 47$  s;  $D = 180$  J/cm<sup>2</sup>;  $E = 1.4$  J; irradiância =  $3.8$  mW/cm<sup>2</sup>) em um único ponto, durante 4 dias consecutivos. Técnicas de histoquímica foram usadas para averiguar a morfologia e a morfometria dos músculos lesados e submetidos ao tratamento com laserterapia. Além disso, foram realizadas análises de peroxidação lipídica (TBARS), formação de nitrotirosina (Dot blot), produção de NO tecidual (Reação de Griess), citocinas inflamatórias (ELISA), expressão protéica de iNOS e colágeno I (western blot) e expressão gênica de myoD, miogenina, VEGF, NF- $\kappa$ B, TGF- $\beta$ , VEGF, COX-2 e SOD (qRT-PCR). A LLLT, nos parâmetros utilizados, foi capaz de reduzir a resposta inflamatória e o estresse oxidativo/nitrativo, favorecer a regeneração muscular e prevenir a fibrose muscular em modelo de criolesão. Os resultados desta tese trouxeram significativa contribuição para o entendimento dos mecanismos de ação acionados pela LLLT durante o processo de regeneração muscular, otimizando assim, sua utilização na reabilitação de desordens músculo-esqueléticas.

**Palavras-chave:** Terapia a laser de baixa intensidade; músculo esquelético; lesão muscular; regeneração muscular; reabilitação.

## *Introdução*

A busca por recursos terapêuticos que possam estimular o processo regenerativo e favorecer a recuperação estrutural e funcional do tecido lesado é a atual procura nas mais diversas áreas da saúde. Entender como reparar um tecido lesado, compreende primeiramente o estudo dos mecanismos envolvidos na adaptação tecidual frente aos diferentes estímulos utilizados durante a reabilitação. Por este motivo, a linha de pesquisa experimental liderado pelo Prof. Nivaldo Antônio Parizotto, do Departamento de Fisioterapia da UFSCar, esta focada em esclarecer as vias de interações acionadas durante a utilização de recursos eletrotermofototerapêutico no tecido lesado, contribuindo desta forma para solidificar os conhecimentos que regem a nossa profissão em prol dos pacientes.

O envolvimento de lesões do tecido muscular são rotineiramente encontradas em centros de reabilitação. Esse fenômeno está principalmente associado à práticas esportivas (contusões ou ações excêntricas do movimento) ou atividades laborais (movimentos repetitivos) que provocam lesões e/ou microlesões, afetando a organização estrutural das unidades contráteis do músculo (JARVIEN *et al.*, 2005). De acordo com Tatsumi *et al.* (2001), mais de 30% das consultas médicas em emergências estão relacionadas à afecções que acometem a musculatura esquelética. Essas lesões são capazes de afetar o funcionamento do músculo como um todo, favorecer o aparecimento da dor muscular de início tardio (DMIT), reduzir a capacidade de produção de força além de aumentar as chances de recidiva da lesão (PROSKE e ALLEN, 2005).

A gravidade do dano muscular e o tempo de recuperação podem variar em relação às dimensões do evento traumático (HUARD *et al.*, 2002). Assim, a reabilitação precoce do tecido músculo esquelético se faz importante, pois contribuirá para a restauração global da integridade funcional do tecido lesado (PRISK & HUARD, 2003).

Classicamente, o processo de regeneração muscular consiste em uma sequência altamente controlada de eventos bioquímicos e celulares, envolvendo três fases interdependentes: degeneração e/ou inflamação, regeneração e remodelamento e/ou fibrose (JARVINEN *et al.*, 2005; TIDBALL, 2005).

Imediatamente após a lesão muscular, desencadeia-se uma resposta degenerativa e/ou inflamatória caracterizada pela integração do sistema imunológico com o tecido lesado, formação de hematoma e fagocitose do tecido necrosado (PRISK & HUARD, 2003). Células inflamatórias tais como, neutrófilos e macrófagos, infiltram-se no sítio de



lesão e ativam citocinas (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ), fatores de crescimento, moléculas de adesão e proteases. A expressão destas substâncias influencia na remoção do tecido necrótico e propagação da resposta inflamatória (JARVINEN 2005; SHI & GARRY, 2006; FILLIPIN *et al.*, 2011a).

A fase inflamatória está associada à produção excessiva de radicais livres, espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS), acompanhado por uma redução da concentração de enzimas que compõe o sistema de defesa antioxidante (JACKSON *et al.*, 2007). Este desequilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes em favor dos pró-oxidantes, conduz ao estresse oxidativo e nitrativo tecidual. Nestas condições, há alterações em vários mediadores que fazem parte do processo inflamatório, com destaque para a ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B, produção de citocinas inflamatórias, aumento da expressão de COX-2, da isoforma óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e produção de óxido nítrico (NO) tecidual (HENSLEY *et al.*, 2000; DROGE, 2002; ADAMS *et al.*, 2002). A produção excessiva de mediadores pró-inflamatórios pode ser prejudicial para o processo normal de regeneração muscular, uma vez que amplificam o quadro inflamatório e dificultam a miogênese (LANGER *et al.*, 2001).

A fase regenerativa consiste na ativação e proliferação das células satélites adultas (células precursoras miogênicas) e angiogênese (desenvolvimento de novos vasos). A ativação das células satélites é regulada por diversos fatores de crescimento (IGF-1, FGF, HGF e TGF- $\beta$ ), com subsequente aumento da expressão de fatores regulatórios miogênicos, tais como, myoD e miogenina, cujo objetivo principal é restabelecer a estrutura e a função da área danificada (CHARGE & RUDNICK, 2004; SHI & GARRY, 2006). A angiogênese é regulada pelo fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), o qual exerce múltiplos efeitos sobre o endotélio vascular, incluindo a sua proliferação, conexão de novos segmentos vasculares com a circulação pré-existentes e o remodelamento da matriz extracelular (MEC) (OLSSON *et al.*, 2006; BOTUSAN *et al.*, 2008; WAGATSUMA *et al.* 2007). Este evento desempenha um importante papel no sucesso da formação de novas fibras musculares durante a fase regenerativa, pois facilita o acesso de células e mediadores inflamatórios ao local da lesão tecidual, assim como leva nutrientes e oxigenação adequada para o músculo em regeneração.

Por fim, ocorre a fase de fibrose e/ou remodelamento do tecido muscular. Neste período é esperado a reconstituição estrutural das fibras danificadas, de forma que a capacidade funcional do músculo seja restabelecida. Por outro lado, pode ocorrer

formação de tecido cicatricial ou fibroso, prejudicando a regeneração muscular. Sabe-se que a expressão elevada do fator de crescimento TGF- $\beta$  durante este evento, desempenha um papel crucial na formação de tecido cicatricial fibroso, visto que o mesmo estimula a proliferação e a síntese de colágeno, inibe a diferenciação e fusão de mioblastos, além de reduzir a expressão de proteínas músculo-específicas (FILLIPIN *et al.*, 2011b). Estudos em modelos de lesão muscular mostram que a superexpressão de TGF- $\beta$  pode levar à formação de tecido fibroso não funcional, o qual compromete a regeneração da fibra e interfere na capacidade funcional do tecido acometido (LI *et al.*, 2004; FILLIPIN *et al.*, 2011b).

Assim, deve-se considerar que o sucesso da regeneração muscular é dependente do tipo e da extensão da lesão, vascularização tecidual, equilíbrio entre os processos de regeneração muscular (inflamação, regeneração e fibrose), bem como a modalidade de tratamento utilizada durante a reabilitação.

Vários recursos terapêuticos vêm sendo estudados na tentativa de favorecer a recuperação muscular e reduzir complicações advindas do processo anormal de regeneração muscular. Dentre esses, as técnicas de mobilização e imobilização (VENOJARVI *et al.*, 2004), crioterapia (SALVINI *et al.*, 1997), ultrassom de baixa intensidade (FREITAS *et al.*, 2004) e uso de anti-inflamatórios não esteróides podem ser citados (LAPOINTE *et al.*, 2003).

A fim de modular o processo inflamatório e estimular a regeneração muscular, o LASER (Luz Amplificada por Emissão Estimulada da Radiação) surge como alternativa no tratamento conservador do músculo lesado.

A terapia laser de baixa intensidade (LLLT- *Low Level Laser Therapy*) tem sido utilizada com fins terapêuticos, desde 1960, e atualmente é considerada uma técnica segura e eficaz no tratamento clínico de uma variedade de doenças e lesões teciduais (HAMBLIN *et al.*, 2010; GIGO-BENATTO *et al.*, 2010; DEMIDOVA-RICE *et al.*, 2007). Embora as vias de interação laser-tecido ainda necessitem ser melhor compreendidas, a absorção da energia luminosa por parte dos cromóforos específicos (especialmente localizados na mitocôndria) parece ser o evento chave para inicializar os processos celulares responsáveis pelos efeitos terapêuticos (HUANG *et al.*, 2009).

Os primeiros relatos já evidenciaram que a luz monocromática não invasiva auxilia a modulação de processos biológicos relacionados ao equilíbrio da homeostasia celular, bioestimulando a recuperação do tecido lesado (MESTER *et al.*, 1985; KARU *et al.*, 1995). As propriedades analgésicas, bioestimulante celular e de modulação do

processo inflamatório, qualificam a irradiação eletromagnética laser como uma modalidade efetiva na busca da reparação tecidual (PRETEL *et al.*, 2007; VLADIMIROV *et al.*, 2004). Claramente, o potencial terapêutico desta modalidade é dependente da aplicação de parâmetros de tratamento adequados, em especial, comprimento de onda, densidade de energia, potência, irradiância, número e tempo da sessão, entre outros, assumindo a existência dosimetrias ótimas para suas ações biomoduladora (AMARAL *et al.* 2001; ALMEIDA-LOPES *et al.* 2001).

A aplicação da LLLT na estimulação da regeneração muscular, por meio de suas propriedades fotoquímicas e fotobiológicas, tem sido objeto de intenso estudo científico nos últimos anos (AMARAL *et al.*, 2001; MESQUITA-FERRARI *et al.*, 2011; RAMOS *et al.*, 2011). Nesses trabalhos, observa-se a utilização de lasers de diodo ocupando as faixas destinadas à luz visível e/ou infravermelho próximo e densidades de energia variáveis (entre  $< 2,6 - 321 \text{ J/cm}^2$ ). Para mais informações, *vide* tabela 1.

A principal ação do laser no tecido muscular está relacionada com o efeito de modular o processo inflamatório e estimular a proliferação de células satélites responsáveis pela miogênese. Uma vez que a inflamação é controlada e as células miogênicas estimuladas, principalmente nos períodos iniciais pós-trauma, há possibilidade maior de ocorrer regeneração muscular.

Estudos em diversos modelos laborais e clínicos mostram que esta abordagem terapêutica é capaz de induzir a expressão de proteínas reguladoras do ciclo celular e conseqüentemente induzir a ativação das células satélites (BEN-DOV *et al.*, 1999; SHEFER *et al.*, 2001; NAKANO *et al.*, 2009), estimular formação de miotubos (BIBIKOVA e ORON, 1993), promover a angiogênese (IYOMASSA *et al.*, 2009), aumentar o número e de fibras em regeneração e a densidade e atividade mitocondrial (NAKANO *et al.*, 2009; AMARAL *et al.* 2001; SILVEIRA *et al.*, 2009), além de melhorar a organização de fibras musculares regeneradas (CRESSONI *et al.*, 2008).

Redução do infiltrado inflamatório, da peroxidação lipídica, da concentração de CK e da expressão de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ ) também foram observadas após lesão muscular (LIU *et al.*, 2009; MESQUITA-FERRARI *et al.*, 2010). Rennó *et al.* (2011) evidenciaram que o laser com comprimento de onda infra-vermelho (AsGaAl; 830 nm; 30 mW;  $50 \text{ J/cm}^2$ ; 47 s; 1.4 J) promoveu uma redução significativa da imunexpressão de COX-2 na área muscular lesado em modelo de criolesão de ratos. No trabalho de Rizzi *et al.* (2006) foi relatado que a LLLT (AsGa; 904 nm; 45mW;  $5 \text{ J/cm}^2$ ; 35 s) reduziu a peroxidação lipídica, a expressão de iNOS e a ativou o fator de

transcrição NF- $\kappa$ B após modelo de trauma muscular, sugerindo que a modulação de NF- $\kappa$ B poderia ser a via de sinalização envolvida na patogênese da lesão muscular.

Além disso, Servetto *et al.*, (2010) observaram que diferentes tipos de protocolos de tratamento com LLLT reduziram marcadores inflamatórios e do estresse oxidativo e aumentaram a atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) em modelos de lesão muscular (HeNe; 632.8; 5 mW; 9.5 J/cm<sup>2</sup>; 1 min / AsGa; 904 nm; 12 mW; 9.5 J/cm<sup>2</sup>; 47 s), evidenciando um efeito de equilíbrio entre o sistema pró e anti-oxidante.

Recentemente, inovadores campos de atuação da LLLT têm sido propostos na área da fadiga e dano muscular induzido pelo exercício físico. Pesquisas com animais submetidos a protocolos de exercícios extenuantes e tratados com LLLT obtiveram menores índices de dano muscular, mensurados através de evidências bioquímicas (redução da CK, peroxidação lipídica e aumento da SOD) e histológicas (redução do infiltrado inflamatório e apoptose) (LOPES-MARTINS *et al.*, 2006 [GaAlAs, 655 nm, 0.5, 1.0, 2.5 J/cm<sup>2</sup>, 34.25mW/cm<sup>2</sup>]; LEAL JUNIOR *et al.*, 2010 [AsGa, 904nm, 0.1,0.3,1.0,3.0 J, 75 mW]; LIU *et al.*, 2009 [HeNe ; 632.8 nm; 12, 28 e 43 J/cm<sup>2</sup>; 4, 9, 14 mW]; SUSSAI *et al.*, 2010 [AsGaLnP, 660nm, 100mW, 3.3 W/cm<sup>2</sup>]).

Como foi possível notar, durante as últimas décadas, grandes avanços ocorreram sobre a compreensão da aplicação da LLLT nos tecidos biológicos. As evidências científicas somadas à evolução da indústria tecnológica fizeram com que os profissionais de diversas áreas da saúde tivessem hoje acesso facilitado a esta terapia. Entretanto, os mecanismos de ação pelos quais a LLLT age durante a regeneração muscular ainda não estão completamente esclarecidos. Acredita-se na necessidade de estudos complementares com a finalidade de identificar ações do laser em nível molecular e celular, os quais contribuirão significativamente para elucidar seus efeitos e otimizar sua utilização durante a reabilitação de distúrbios que acometem o tecido músculo esquelético. Assim, esta tese teve a intenção de investigar o efeito fotobiomodulador da LLLT, em um modelo de criolesão, identificando biomarcadores associados à inflamação, regeneração e fibrose muscular.

O modelo de criolesão tem a capacidade de induzir uma lesão homogênea e de fácil reprodutibilidade. Caracteristicamente, observa-se dano importante às células satélites, lâmina basal, vasos sanguíneos e terminações nervosas, induzindo uma rápida e extensa necrose das miofibrilas, seguida por um processo de regeneração relativamente lento (MIYABARA *et al.*, de 2006; DURIGAN *et al.*, 2008). A escolha do modelo

animal foi realizada devido aos problemas éticos relacionados com a retirada de amostras musculares (biópsias) de indivíduos com lesão muscular, cujo prognóstico é geralmente de recuperação lenta e com tendências a cicatrização.

A irradiação foi realizada utilizando uma unidade de laser de baixa intensidade (Photon laser II, DMC<sup>®</sup> equipamentos Ltda, SP, São Carlos, Brasil) com as seguintes características: semicondutor Diodo de Arsenieto de Gálio-Alumínio (GaAlAs), comprimento de onda de 808 nm, potência óptica de saída de 30 mW, tempo de irradiação de 47 s, área da secção transversal do feixe de 0.00785 cm<sup>2</sup>, dose de 180 J/cm<sup>2</sup>, energia total de 1.4 J e emissão em modo contínuo. Os parâmetros de tratamento selecionados foram baseados em tabelas normativas recomendadas para reabilitação clínica de condições inflamatórias (WALT, 2010- *vide* anexo) e os mesmos foram previamente testados em um estudo piloto (dados não mostrados) com resultados positivos. Todos os procedimentos com o laser foram realizados seguindo todas as normas de segurança NBR/IEC 601.2.22 e IEC 60825-1/2001-8.

O primeiro manuscrito deste trabalho verificou se a LLLT seria capaz de reduzir mediadores inflamatórios e o estresse oxidativo/ nitrativo que dificultam o processo de regeneração após lesão muscular, intitulado “Terapia laser de baixa intensidade (808 nm) reduz a resposta inflamatória e o estresse oxidativo do músculo tibial anterior de ratos após criolesão” (Assis L, Moretti AI, Cury V, Abrahão TB, Souza HP, Hamblin MR, Parizoto NA). Este trabalho mostrou que a LLLT (808 nm, 30 mW, 180 J/cm<sup>2</sup>, 1.4 J, 47s, 3.8 mW/cm<sup>2</sup>), aplicada em um único ponto, durante 4 dias consecutivos, reduziu a resposta inflamatória e o estresse oxidativo/nitrativo presente durante a regeneração muscular.

Fundamentado nos resultados evidenciado no primeiro estudo, o segundo objetivo foi investigar os efeitos da LLLT sobre fatores regulatórios miogênicos, responsáveis pela miogênese, além de verificar se o tratamento seria capaz de prevenir a formação do tecido fibroso não funcional no tecido muscular lesado. Para tal, foi realizado o segundo manuscrito intitulado “Terapia laser de baixa intensidade (808 nm) favorece a regeneração muscular e previne a fibrose do músculo tibial anterior de ratos após criolesão” (Assis L, Moretti AI, Abrahão TB, Souza HP, Hamblin MR, Parizoto NA). Este trabalho, mostrou que a LLLT é capaz de regular a expressão de quatro importantes genes relacionados com a regeneração muscular (myoD, miogenina, VEGF e TGF-β1) e a produção de colágeno do tipo I, promovendo a regeneração do tecido músculo esquelético e prevenindo a fibrose muscular.

A biomodulação de moléculas pró-inflamatórias, regenerativas e de cicatrização presentes no processo de regeneração muscular pela LLLT apresentada neste trabalho, caracteriza este recurso como uma abordagem terapêutica eficiente e inovadora em reabilitação muscular.

**Tabela 1: Síntese de dados obtidos em publicações referente ao uso da LLLT na regeneração muscular em modelos animais.**

Autor	Ano	Tipo de lesão	Modelo experimental	Parâmetros de dosimetria (informado pelos autores)	Número de sessões	Resultados referentes aos grupos tratados com LLLT
Oliveira <i>et al.</i>	1999	Miotoxina	Tibial Anterior	AsGa; 904 nm; 1.5 mW; 7.5 mW/cm <sup>2</sup> ; 0.2 cm <sup>2</sup> ; (3 e 10 J/cm <sup>2</sup> ); (2.2 e 8 mim)	21 dias PO ( 5 sessões nos 5 primeiros dias PO)	Não houve nenhuma alteração morfológica
Amaral <i>et al.</i>	2001	Trauma	Tibial Anterior	HeNe; 632.8 nm; 2.6 mW; 0.007 cm <sup>2</sup> ; (2.6, 8.4, 25 J/cm <sup>2</sup> ); (7, 22 e 67 s)	5 dias, 5 sessões	Dose de 2.6 J/cm <sup>2</sup> aumentou o número de fibras e densidade de mitocôndria da fibra regenerada
Dourado <i>et al.</i>	2003	Veneno de cobra ( <i>B.moojeni</i> )	Gastrocnêmio	GaAs; 904 nm; 45 mW; 0.0176 cm <sup>2</sup> ; 4 J/cm <sup>2</sup> ; 0.04 J; 62 s	3h PO (2 sessões.- 0 e 3h PO) 12h PO (4 sessões.-0, 3, 6 e 12 h PO) 24h PO (8 sess.- 0,3,6,12,15,18,21 e 24h PO)	Diminuiu CK, edema, infiltrado inflamatório e a mionecrose
Rizzi <i>et al.</i>	2006	Trauma	Gastrocnêmio	AsGa; 904 nm; 45 mW; 0.7 mm; 5 J/cm <sup>2</sup> ; 35s	12h PO (1 sessão); 7 dias PO (7 sessões); 14 dias PO (14 sessões)	Reduziu a resposta inflamatória, peroxidação lipídica; ROS; expressão de iNOS e NF-κβ
Cressoni <i>et al.</i>	2008	Indução cirúrgica	Tibial anterior	AlGaInP; 785 nm; 75 mW; 0.3 cm <sup>2</sup> ; 0.9 J; 12 s; contínuo; 3 pontos	2 dias PO (1 sessão- 24h PO) 4 dias PO (2 sessões) 8 dias PO (3 sessões)	Diminuiu leucócitos, melhorou a organização e alinhamento das fibras
Silveira <i>et al.</i>	2009	Trauma	Gastrocnêmio	AsGa; 904 nm; 15-30 mW; 5 J/cm <sup>2</sup> ;	5 dias PO (7 sessões-2h, 12h, 24h, 48h, 72h, 96h e120h )	Aumentou atividade de alguns complexos da cadeia mitocondrial, induzindo aumento de ATP e acelerando a regeneração muscular
Nakano <i>et al.</i>	2009	Atrofia (2 semanas)	Gastrocnêmio	AsGaAl; 830 nm; 60 mW; 0.3 cm <sup>2</sup> ; 180 s	2 semanas PO (2 sessões)	Reduziu a atrofia, aumentou o diâmetro da fibra
Iyomassa <i>et al.</i>	2009	Trauma	Tibial Anterior	HeNe; 632.8 nm; 4 mW; 1 mm; 5 e 10J/cm <sup>2</sup> ; 20 e 40 mim	7 dias PO (7 sessões)	Aumentou a atividade mitocondrial da fibra, ativou fibroblastos, macrófagos e angiogênese
Liu <i>et al.</i>	2009	Exercício extenuante	Gastrocnêmio	HeNe ; 632.8 nm; 0.5 cm; (12, 28 e 43 J/cm <sup>2</sup> ), (4, 9, 14 mW); 10 mim	24h após exercício (3 sessões 0, 18h) 48h após exercício (3 sessões 0, 12 e 28h)	Reduziu CK, peroxidação lipídica e infiltrado inflamatório; aumento da SOD
Servetto <i>et al.</i>	2010	Injeção de adrenalina	Gastrocnêmio	HeNe-( 632.8; 5 mW; 9.5 J/cm <sup>2</sup> ;1 min) AsGa-(904 nm ; 12 mW; 9.5 J/cm <sup>2</sup> ;47 s)	7 dias PO (7 sessões)	Reduziu marcadores inflamatórios e estresse oxidativo: fibrinogênio, L-citrullina, SOD, aumentou NO e a recuperação muscular
Lakyova <i>et al.</i>	2010	Isquemia/reperfusão	Grácil	AsGalnP; 670 nm; 40 mW/cm <sup>2</sup> ; 4 mn (distância 5cm- 1cm <sup>2</sup> ); 4 J/cm <sup>2</sup>	12h PP (4 sessões diárias) 336h PO (4 sessões diárias)	Efeito protetor contra resposta inflamatória, atrofia e necrose; estimula vascularização
Rennó <i>et al.</i>	2011	Criolesão	Tibial anterior	AsGaAl; 830 nm; 0.028 cm <sup>2</sup> ; 30 mW; 1.07 W/cm <sup>2</sup> ; 50 J/cm <sup>2</sup> ; 1.41 J; 47 s.	13 dias PO (6 sessões)	Diminuiu a imunexpressão de COX-2
Mesquita-Ferrari <i>et al.</i>	2011	Criolesão	Tibial anterior	AlGaln, 660 nm, 20 mW, 0.3 cm <sup>2</sup> ; 5 J/cm <sup>2</sup>	1,7 e 14 dias	Diminuiu a expressão de TNF-α e TGF-β
Ramos <i>et al.</i>	2011	Estiramento	Tibial anterior	AsGaAl; 810 nm; 100 mW; 0.028 cm <sup>2</sup> ; 3.57 W/cm <sup>2</sup> ; (1,3,6 e9 J); (35.7, 107.14, 214.29 e 321.43 J/cm <sup>2</sup> ); (10, 30, 60 e 90 s)	6 e 12h (1 sessão 1 hora após lesão)	Melhora funcional do músculo (caminhar), sendo a dose de 3J a mais eficiente.

## Objetivos

### Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da terapia laser de baixa intensidade (*Low Level Laser Therapy*- LLLT) sobre a resposta inflamatória e regenerativa/cicatrizial após criolesão do músculo tibial anterior de ratos.

### Objetivos Específicos

- Determinar alterações morfológicas e morfométricas após criolesão do músculo tibial anterior e a influência do tratamento com a terapia laser de baixa intensidade;
- Verificar a ação da LLLT sobre o estresse oxidativo e nitrativo, bem como a produção de mediadores inflamatórios, citocinas e fatores de crescimento expressos durante a inflamação e regeneração muscular;
- Analisar o efeito da LLLT sobre os fatores transcricionais miogênicos (myoD e miogenina) e o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) ;
- Investigar o efeito da LLLT sobre a fibrose muscular analisando a expressão gênica de TGF- $\beta$  e sua relação com a expressão de colágeno do tipo I após criolesão.





*Manuscrito I*

---

**Terapia Laser de Baixa Intensidade (808 nm) reduz a resposta inflamatória e o estresse oxidativo do músculo tibial anterior de ratos após criolesão**

*Submetido  
Lasers in Surgery and Medicine  
LSM-12-0021*

---

**TERAPIA LASER DE BAIXA INTENSIDADE (808 nm) REDUZ A RESPOSTA  
INFLAMATÓRIA E O ESTRESSE OXIDATIVO DO MÚSCULO TIBIAL  
ANTERIOR DE RATOS APÓS CRIOLESÃO**

Lívia Assis, MS, PhD<sup>1</sup>, Ana Iochabel Soares Moretti, MS, PhD<sup>2\*</sup>, Thalita Balsamo Abrahão, PhD<sup>3</sup>, Vivian Cury, MS<sup>1</sup>, Heraldo Possolo de Souza, MD, PhD<sup>2</sup>, Michael R Hamblin, PhD<sup>4</sup> and Nivaldo Antonio Parizotto, MS, PhD<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Eletrotermofototerapia, Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil. <sup>2</sup>Laboratório da Disciplina de Emergências Clínicas, Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil. <sup>3</sup>Laboratório de Biologia Vascular, Departamento de Cardiopneumologia, Instituto do Coração, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil. <sup>4</sup> Wellman Center for Photomedicine, Massachusetts General Hospital, Boston MA.

**Correspondente:** Nivaldo Antonio Parizotto. Tel.: (0055-16) 3351-8630 / Fax: (0055-16) 3351-2081. Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos, Rodovia Washington Luís, km 235, CEP 13565-905, São Carlos, SP, Brasil. E-mail: parizotto@power.ufscar.br

**Título resumido:** LLLT reduz a resposta inflamatória muscular.

## RESUMO

**Introdução e Objetivo:** A regeneração muscular é um processo complexo que envolve a coordenada ativação de várias respostas celulares. Neste período pode ocorrer sobrecarga orgânica oxidativa, com conseqüente lesão tecidual, cuja magnitude parece ser dependente da intensidade e da duração da resposta inflamatória. Dentre as abordagens terapêuticas que visam atenuar a inflamação e favorecer a reparação tecidual, a terapia laser de baixa intensidade (LLLT) tem sido apontada como uma modalidade clínica segura e eficiente. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da LLLT sobre o estresse oxidativo/nitrativo e mediadores inflamatórios produzidos durante a regeneração do músculo tibial anterior (TA) em modelo de criolesão em ratos.

**Materiais e Métodos:** Sessenta ratos da linhagem Wistar foram separados em três grupos (n=20): (BC) grupo controle; (IC) músculo TA direito criolesado sem tratamento; (IRI) músculo TA direito criolesado submetido à irradiação laser. As regiões lesadas receberam irradiação local e em contato, por quatro dias consecutivos, iniciando o tratamento imediatamente após a indução da criolesão, utilizando um laser AsGaAl (contínuo;  $\lambda = 808$  nm; P=30 mW; área do feixe =  $0.00785$  cm<sup>2</sup>; t=47 s; D=180 J/cm<sup>2</sup>; E=1.4 J; irradiância=3.8 mW/cm<sup>2</sup>). Os animais foram sacrificados quatro dias após lesão. As áreas lesadas foram processadas e submetidas às análises de: peroxidação lipídica (TBARS), formação de nitrotirosina (Dot blot), produção de NO tecidual (Reação de Griess) e citocinas inflamatórias (ELISA), expressão protéica de iNOS (western blot) e níveis de mRNA (RNA mensageiro) de SOD, COX-2 e NF-k $\beta$  (qRT-PCR).

**Resultados:** A LLLT reduziu o estresse oxidativo e nitrativo no músculo lesado, diminuiu a peroxidação lipídica, a formação de nitrotirosina e a produção de NO provavelmente devido à redução na expressão protéica de iNOS. Além disso, LLLT aumentou a expressão gênica de SOD e diminuiu a resposta inflamatória, avaliada pela expressão gênica de NF-k $\beta$  e COX-2 e pela concentração de TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$  no tecido lesado.

**Conclusão:** Estes resultados sugerem que a LLLT pode ser utilizada como uma abordagem terapêutica efetiva para biomodular o estresse oxidativo e nitrativo e para reduzir resposta inflamatória, favorecendo assim o processo de regeneração muscular.

**Palavras-chave:** Terapia laser de baixa intensidade; fotobiomodulação, lesão muscular; mediadores inflamatórios; estresse oxidativo; estresse nitrativo.

## **ABSTRACT**

**Background and Objective:** Muscle regeneration is a complex phenomenon, involving coordinated activation of several cellular responses. During this process, oxidative stress, and consequent tissue damage occur with a severity that may depend on the intensity and duration of the inflammatory response. Among the therapeutic approaches to attenuate inflammation and increase tissue repair, low-level laser therapy (LLLT) may be a safe and effective clinical procedure. The aim of this study was to evaluate the effects of LLLT on oxidative/nitrative stress and inflammatory mediators produced during a cryolesion of the tibialis anterior (TA) muscle in rats.

**Material and Methods:** Sixty Wistar rats were randomly divided into three groups (n=20): control (BC), injured TA muscle without LLLT (IC), injured TA muscle submitted to LLLT (IRI). The injured region was irradiated daily for 4 consecutive days, starting immediately after the lesion using an AlGaAs laser (continuous wave, 808nm, tip area of 0.00785 cm<sup>2</sup>, power 30 mW, application time 47 s, fluence 180 J/cm<sup>2</sup>; total energy 1.4J; irradiance 3.8 mW/cm<sup>2</sup>). The animals were sacrificed on the fourth day after injury.

**Results:** LLLT reduced oxidative and nitrative stress in injured muscle, decreased lipid peroxidation, nitrotyrosine formation and NO production, probably due to reduction in iNOS protein expression. Moreover, LLLT increased SOD gene expression, and decreased the inflammatory response as measured by gene expression of NF- $\kappa$ B and COX-2 and by TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  concentration.

**Conclusion:** These results suggest that LLLT could be an effective therapeutic approach to modulate oxidative and nitrative stress and to reduce inflammation in injured muscle and could therefore help muscle regeneration.

**Keywords:** low-level laser therapy; photobiomodulation; muscle cryolesion; inflammatory mediators; nitrative stress; oxidative stress; muscle regeneration.

## **INTRODUÇÃO**

Lesões musculares, incluindo contusão, estiramento, laceração ou por esforços repetitivos, são frequentes consequências de atividades esportivas e laborais. A alta prevalência é de certa forma, compensada pela organizada capacidade regenerativa do tecido muscular que envolve uma série de eventos interdependentes: degeneração das fibras musculares danificadas e inflamação; regeneração e formação de novas fibras através da miogênese; fibrose e reorganização do tecido cicatricial [1]. Porém, este processo geralmente tende a ser lento e incompleto [2,3], o que pode levar a uma redução significativa da função muscular, um possível quadro de atrofia e fibrose, e conseqüentemente, um tempo de recuperação mais prolongado do que o normal [2-5].

A ruptura da miofibrila imediatamente após o trauma se reflete clinicamente pela formação de edema, hematoma local e aumento significativo dos níveis séricos de creatina quinase (CK), das citocinas IL-1 $\beta$  e IL-6, e da enzima lactato desidrogenase [5]. Em resposta ao dano muscular, neutrófilos e macrófagos infiltram-se no sítio de lesão, ativando citocinas pró-inflamatórias e proteases intrínsecas responsáveis pela remoção do tecido necrótico e propagação da resposta inflamatória [4,6,7].

Na fase inflamatória do processo de regeneração muscular ocorre à produção de radicais livres, espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS), acompanhado por uma redução na atividade de enzimas que compõe o sistema de defesa antioxidante. Embora um número significativo de estudos demonstrarem que as espécies reativas são capazes de exercer um importante papel na homeostasia redox do músculo esquelético, tais como regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e ativação do sistema imunológico [8-11], quando produzidas em excesso, podem gerar estresse oxidativo e nitrativo tecidual, um processo caracterizado como um desequilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes em favor dos pró-oxidantes. Este desequilíbrio contribui para danos celular, uma vez que promove oxidação de lipídios, carbonilação de proteínas e danos em ácidos nucleotídicos. A gravidade deste processo parece ser dependente da intensidade e da duração da resposta inflamatória [12].

Um importante agente na produção de lesões ocasionadas pela liberação excessiva de ROS e RNS é o óxido nítrico (NO). No músculo esquelético, a ação do NO é dependente de sua concentração e da interação com biomoléculas, contribuindo tanto com ações pró e anti-inflamatória [13]. O NO em concentrações normais modulada a função contrátil do músculo e a regula o tônus vascular, entretanto, em excesso, pode ser um mediador de danos teciduais

[7,14]. Sabe-se que em lesões musculares, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  atuam sinergicamente aumentando a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e, conseqüentemente elevam os níveis de NO tecidual [15]. Em adição, o NO do sítio inflamatório reage com o radical ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), produzido por neutrófilos, formando o peroxinitrito (ONOO-) [15]. O peroxinitrito é um potente oxidante e pode causar modificações em proteínas via oxidação de grupos tiol ou via nitração de resíduos de tirosina [16], aumentar a peroxidação lipídica e lesões no DNA, além de inibir a cadeia respiratória mitocondrial [17]. Neste contexto, o peroxinitrito é considerado um importante mediador do estresse nitrativo durante o reparo muscular.

A presença de estímulos pró-inflamatórios e o desequilíbrio redox no tecido muscular lesado são capazes de ativar NF- $\kappa$ B, um fator de transcrição pleitrópico responsável por alterar a expressão gênica de moléculas que sinalizam o processo inflamatório [18,19]. O NF- $\kappa$ B é um fator de transcrição que pertence à família das proteínas Real/NF- $\kappa$ B, presente no citoplasma como um dímero em estado inativo, ligado a uma proteína de subunidade inibitória chamada inibidor kappa- $\beta$  (I $\kappa$ B) [19]. Quando ativado, ocorre a fosforilação do inibidor I $\kappa$ B pelo inibidor kappa quinase (I $\kappa$ K), com subsequente transcrição de um amplo grupo de genes reguladores da resposta inflamatória [15,20], incluindo citocinas pró-inflamatórias, fatores de crescimento, quimiocinas, moléculas de adesão e enzimas como a COX-2 e iNOS. A produção excessiva destes mediadores pode ser prejudicial para a regeneração muscular, visto que intensificam a inflamação e inibem a diferenciação e a fusão de mioblastos [21]. Assim, durante a reabilitação do músculo lesado, a utilização de recursos terapêuticos que visem amenizar os danos oxidativas e diminuir o processo inflamatório, pode ser útil para promover a reparação e restabelecer a homeostase do tecido lesado.

A terapia laser de baixa intensidade (*Low-level laser Therapy* - LLLT) é considerada uma técnica segura e eficaz para o tratamento de afecções que acometem o tecido músculo esquelético por apresentar propriedades anti-inflamatória, analgésica e reparativa. Acredita-se que estas propriedades possam estar relacionadas à ação do laser em reduzir mediadores inflamatórios produzidos durante a lesão, bem como por sua habilidade em modular os sistemas antioxidantes [22, 23]. A LLLT é capaz de inibir a síntese de prostaglandinas e citocinas inflamatórias [24] e aumentar os níveis de enzimas antioxidantes durante a inflamação em diferentes modelos experimentais [25, 26], favorecendo assim a recuperação tecidual.

Resultados relevantes foram alcançados com o uso da LLLT, onde a irradiação eletromagnética laser foi capaz de minimizar a inflamação e favorecer a regeneração do músculo esquelético lesado [26-29]. Embora o conhecimento sobre os mecanismos moleculares e biológicos envolvidos nesse processo tenha aumentado nos últimos anos, ainda são necessários mais estudos que determinem quais vias de sinalização são acionadas pela LLLT, com objetivo esclarecer seus efeitos e otimizar sua utilização na reabilitação de diferentes doenças musculares inflamatórias. Este estudo, portanto, teve o objetivo de analisar a ação da LLLT (808 nm) na inflamação do músculo lesado, avaliando seus efeitos sobre o estresse oxidativo/nitrativo e sobre mediadores inflamatórios locais produzidos durante a regeneração do músculo tibial anterior em modelo de criolesão em ratos.



## METODOLOGIA

### Grupos experimentais

Foram utilizados 60 ratos adultos Wistar (*Rattus norvegicus*) com massa corpórea média de 300 g, obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos. Os animais permaneceram em gaiolas apropriadas de polietileno padrão, em condições ambientais controladas (ciclo claro/escuro de 12/12 horas, temperatura na faixa de 22°-27°C e ambiente higienizado), recebendo ração própria comum e água *ad libitum*. Os experimentos foram conduzidos seguindo as recomendações éticas do Guide for Care and Use of Laboratory Animals (National Research Council, 1996) e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFSCar CEEA/UFSCar (Parecer 006/06).

Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos (n=20 por grupo):

(BC) *Basal control* - controle basal (normal)- músculo TA normal

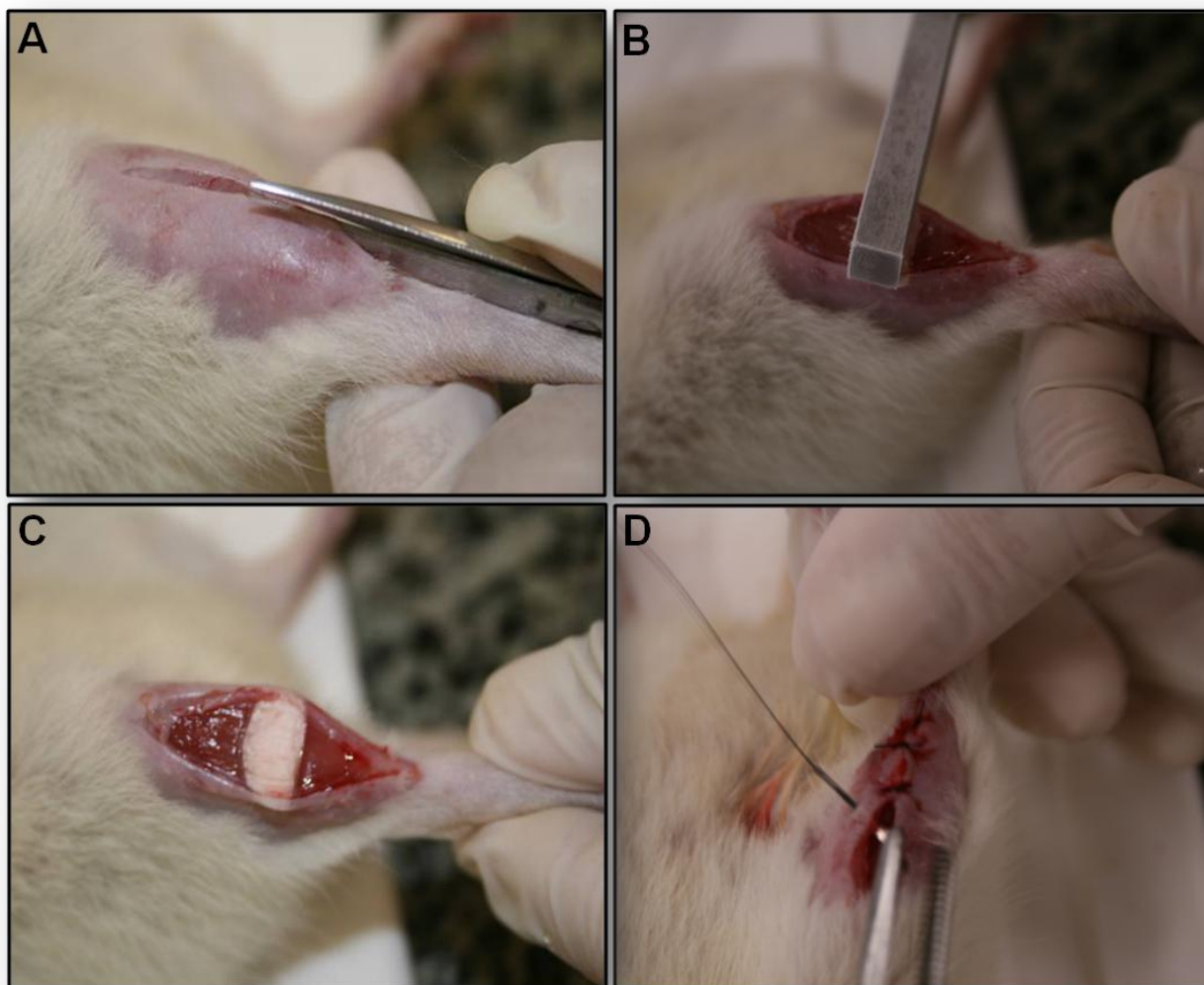
(IC) *Injury control* - músculo TA lesado sem tratamento;

(IRI) *Injured TA + Infrared irradiation* - músculo TA lesado e tratado com laser infravermelho.

### Procedimento Cirúrgico (Criolesão)

Os animais foram previamente pesados e submetidos à anestesia com uma solução contendo ketamina (95mg/kg- Dopalen; Vetbrands; São Paulo; Brazil) e xilazina (12mg/kg- Anasedan; Vetbrands; São Paulo; Brazil). Após anestesia, a pele que recobre o músculo TA direito foi tricotomizada e limpa. Após, uma incisão transversal (aproximadamente 1 cm) foi realizada na pele que recobre o músculo TA, com afastamento da fáscia na região correspondente ao ventre muscular.

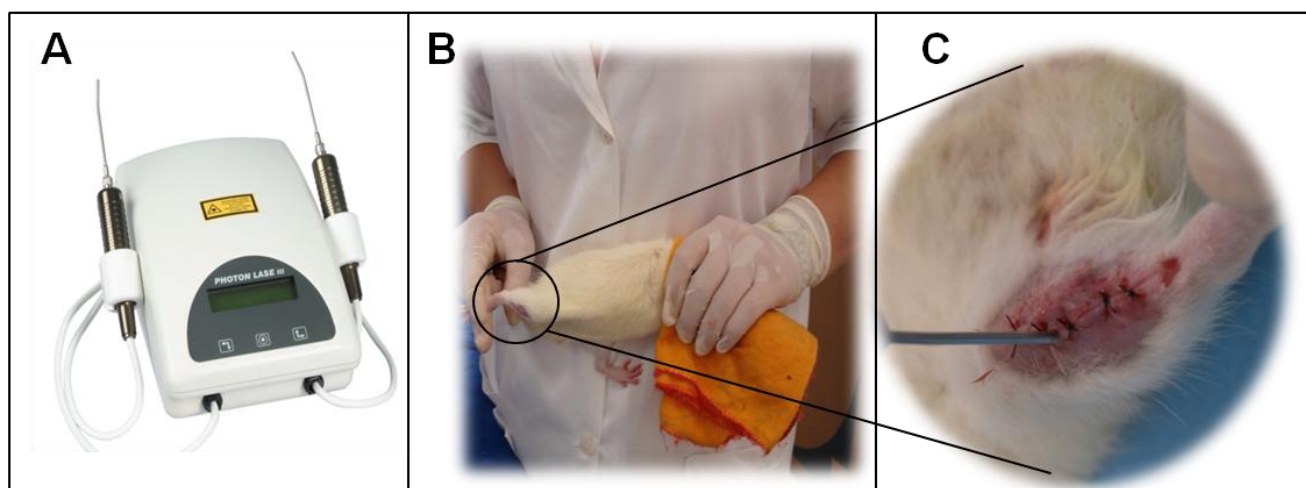
A lesão tecidual foi induzida utilizando-se um bastão de ferro com 6 mm de largura e 30 mm de comprimento, previamente imerso em nitrogênio líquido (10s) e pressionado transversalmente contra a porção central do ventre muscular por 10 s (Figura 1). Este procedimento foi repetido 2 vezes consecutivo, com intervalo de 30 s e em seguida a pele foi suturada (Fio Náilon 3-0 – Shalon Ltda). Este método gera uma lesão homogênea, sendo previamente testada e reproduzida em diferentes unidades experimentais [29,30].



**Figura 1: Esquema ilustrativo do modelo de criolesão realizado no ventre do músculo Tibial Anterior (TA) direito. (A) Incisão transversal e exposição do músculo TA direito; (B e C) Indução da criolesão; (D) Sutura após procedimento cirúrgico.**

## Protocolo LLLT

A irradiação foi realizada utilizando uma unidade de laser de baixa intensidade (Photon laser II, DMC<sup>®</sup> equipamentos Ltda, SP, São Carlos, Brasil) com as seguintes características: semicondutor Diodo de Arsenieto de Gálio-Alumínio (GaAlAs), comprimento de onda de 808 nm, potência óptica de saída de 30 mW, tempo de irradiação de 47 s, área da secção transversal do feixe de 0.00785 cm<sup>2</sup>, dose de 180 J/cm<sup>2</sup>, energia total de 1.4 J, irradiância de 3.8 mW/cm<sup>2</sup> e emissão em modo contínuo. O aparelho foi calibrado (Masterfield, Filter Coherent, Santa Clara, CA) antes e após os procedimentos experimentais, pelo Centro de Pesquisa em Óptica e Fotônica (Cepof) do Instituto de Física de São Carlos (IFSC), a fim de se obter uma alta confiabilidade na intensidade efetiva da emissão laser. As regiões lesadas receberam irradiação local (1 ponto) e em contato, por quatro dias consecutivos, iniciando o tratamento imediatamente após a indução da criolesão (Figura 2).

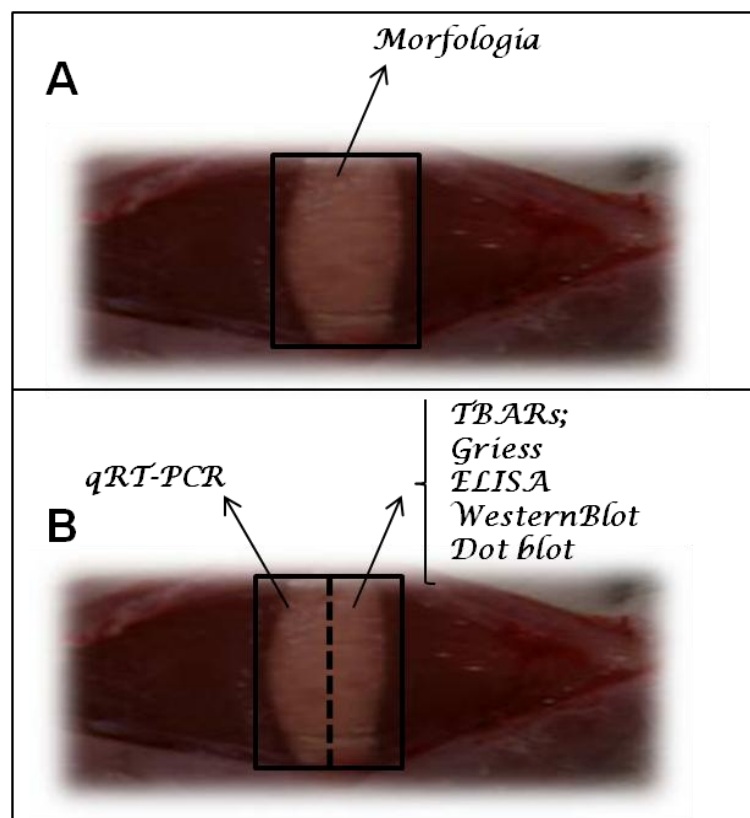


**Figura 2: Esquema ilustrativo da aplicação da LLLT.** (A) Photon laser II, DMC<sup>®</sup> equipamentos Ltda; (B) Técnica de aplicação; (C) Local de irradiação - pontual com contato.

## Retirada e Armazenamento das amostras

Os músculos TA direito foram retirados com os ratos anestesiados, sendo devidamente pesados, e em seguida submetidos à eutanásia com overdose de anestésico. Dez animais de cada grupo foram usados para análise morfológica e os outros dez para análise de PCR em tempo real (qRT-PCR), peroxidação lipídica (TBARS), produção de NO (Griess), dot blot,

western blot e ELISA. Para análise histológica, os músculos foram imediatamente congelados em isopentano pré-congelado em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C. Para as demais análises, a porção central do ventre muscular foi dividida em duas partes iguais, sendo o fragmento proximal utilizado para análise de RNAm e o distal para as demais análises (Figura 3). Os fragmentos foram pulverizados em nitrogênio líquido. Na região proximal foi realizado o protocolo de extração de RNA. A região distal foi homogeneizada em tampão de lise TX-100 (1% Triton X-100, 10% glicerol, 135 mM NaCl, 20 mM Tris pH 8.0) acrescido de inibidores de proteases (1mg/ml pepstatina A, 100mM PMSF). A concentração de proteínas foi quantificada pelo método de BCA<sup>TM</sup> Protein Assays (Pierce, Rockford, IL) e posteriormente conservadas em -80°C.



**Figura 3: Esquema ilustrativo da divisão e armazenamento do músculo Tibial Anterior direito.** (A) Dez músculos para análise morfológica; (B) Dez músculos subdivididos: fragmento proximal para análise de qRT-PCR e fragmento distal para análise de TBARs, griess, ELISA, western blot e dot blot.

### **Análise Morfológica**

Foram obtidos cortes histológicos transversais e seriados (uma seção de 10 µm a cada 100µm) em micrótomo criostato (Microm HE 505, Jena, Alemanha), ao longo do ventre do músculo TA. As lâminas com os cortes histológicos foram, alternadamente coradas com azul de toluidina (TB) e com reação enzimática para fosfatase ácida (FA). A coloração de TB foi usada para avaliar as características estruturais do músculo, pois permite a identificação de mionúcleos, área de mionecrose e as regiões basofílicas da fibra [31]. A reação de FA foi usada para identificar os sinais de necrose e fagocitose tecidual. As análises foram realizadas por meio de microscopia óptica (Axiolab, Carl Zeiss, Jena, Alemanha).

### **Peroxidação lipídica (TBARS)**

A quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) foi utilizada para determinar a taxa de peroxidação lipídica. A dosagem foi feita utilizando-se 100 µl de homogenato de tecido muscular, acrescidas de 100 µl de SDS a 8.1 %, 750 µl de ácido acético a 20 % e 750 µl de ácido tiobarbitúrico a 0.8 %. A mistura foi aquecida a 95°C por 40 min. A solução foi centrifugada e a absorbância do sobrenadante foi medida utilizando comprimento de onda de 532 nm no leitor de placa Spectramax (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Os resultados foram expressos em µM TBARS/µg de proteína.

### **Determinação de nitrotirosina (Dot Blot)**

A fim de analisar a formação de peroxinitrito, a nitração do resíduo de tirosina foi detectada no músculo lesado através da técnica de dot-blot. Aproximadamente 5 ug de proteínas totais foram aplicadas em uma membrana de nitrocelulose previamente umedecida com PBS, posteriormente bloqueadas com leite desnatado 5 % e incubadas com anticorpo primário anti-nitrotirosina 1:10000 (rabbit, monoclonal, ABcam) por 18 h. As membranas foram incubadas com anticorpo secundário 1:2500 (igG anti-rabbit, Sigma-Aldrich) por 2 h e em seguida, foram expostas ao substrato quimioluminescente Super Signal Detection Kit (Pierce, Rockford, IL) e expostas e fotografadas utilizando o sistema Syngene GBox Gel Document System (Syngene, Frederick, MD). A expressão de proteínas nitradas foi observada por densitometria de gel, utilizando-se o programa de domínio público “Image J” (Wayne

Rasband, National Institutes of Mental Health, NIH, USA). Os resultados foram representados pela média de 3 testes por grupo.

### **Produção de NO - Reação de Griess**

O método de detecção foi baseado na reação do nitrito com reagente de Griess produzindo uma reação colorimétrica que foi detectada por absorvância com leitura em comprimento de onda de 595 nm. Para a reação de Griess foi utilizado 100 µl de homogenato de tecido muscular, adicionado a 100 µl da solução de trabalho (solução A: 1% de sulfanilamida em ácido fosfórico a 5%; solução B: 0.1% de naftil-etilenodiamina em água destilada; misturadas em partes iguais das soluções A e B). Incubou-se por 10 min à temperatura ambiente foi feita a leitura em comprimento de 595 nm no leitor de placa Spextramax (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Os resultados foram expressos em µM /µg de proteína.

### **Análise da expressão protéica por wertern blotting**

Amostras de 25 µg de proteína foram acrescidas de tampão de amostra (2% SDS, 60 mM Tris pH 6.8, 5% de mercaptoetanol e 0.01% de azul de bromofenol) e submetidas à eletroforese em um sistema SDS-PAGE, gel 10% de poli(acrilamida) (1.5M Tris-HCl, 10% SDS, 30% bis-acrilamida, 10% de persulfato de amonia e TEMED). Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Bio-Rad) em aparelho semi-dry transfer (Bio-Rad). As membranas foram incubadas em solução de bloqueio 5% de leite desnatado em tampão TBST (50 mM de tampão Tris, pH 8.0, 100 mM NaCl, 1% Tween 20) por 1 h à temperatura ambiente e em seguida, foram lavadas em TBST durante 30 minutos e incubadas com o anticorpo primário contra as proteínas de interesse por 18 h, a 4 °C: iNOS (rabbit policlonal, diluição 1:1000, Santa Cruz Biotechnology, CA). Posteriormente, as membranas foram lavadas novamente com TBST e incubadas em solução contendo anticorpo secundário conjugado a peroxidase (HRP goat anti-rabbit policlonal, 1:2500, Sigma Aldrich, MO, USA) à temperatura ambiente por 1 h, em seguida, foram incubadas com substrato quimioluminescente Super Signal Detection Kit (Pierce, Rockford, IL) e expostas e fotografadas utilizando o sistema Syngene GBox Gel Document System (Syngene, Frederick, MD). A expressão da proteína foi comparada por densitometria de gel, utilizando-se o

programa de domínio público “Image J” (Wayne Rasband, National Institutes of Mental Health, NIH, USA). Os resultados foram representados pela média de 3 testes por grupo.

### **Quantificação de citocinas - ELISA**

As citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  foram dosadas a partir do homogenato tecidual. As dosagens foram feitas por ELISA, com kit da R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Placas de 96 poços foram adsorvidas com anticorpo de captura monoclonal anti-citocina de rato, diluído em PBS por 12 h. Em seguida, as placas foram lavadas com solução de PBS contendo 0.05% de Tween 20. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com PBS contendo 1% de BSA (soro albumina bovina – Sigma) por 1 h. A placa foi lavada para remoção da solução de bloqueio. Em seguida, as amostras (100  $\mu$ l) e os padrões foram colocados nos respectivos poços e incubados por 2 h. Ao final do período, as placas foram lavadas. O anticorpo de detecção foi adicionado, conjugado a peroxidase, e incubado por 2 h. As placas foram lavadas novamente. Ao final das lavagens, foi adicionado o substrato da peroxidase, tetrametilbenzidina, deixando reagir por 15 a 20 min. Ao final da incubação, foi adicionada solução de parada (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 2N). As citocinas foram quantificadas pela leitura da absorbância (450 nm) usando leitor de placas Spectramax (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Os resultados foram expressos em picograma de antígeno por  $\mu$ g de proteína.

### **Análise da expressão gênica - PCR (*Polimerase Chain Reaction*) em tempo real**

O RNA total foi extraído utilizando-se o reagente de RNA TRIzol® de acordo com as especificações do fabricante (Invitrogen Life Science, Carlsbad, CA). Para a quantificação do RNA foi utilizado espectrofotometro nos comprimentos de onda de 260 nm (correspondente ao pico de absorção de RNA) e 280 nm (correspondente ao pico de absorção de proteínas). Foi realizado também, eletroforese em gel de 1% de agarose com amostras (1  $\mu$ l) preparadas pela adição de tampão de amostra (63  $\mu$ L de água nanopura, 81  $\mu$ L de formaldeído, 48  $\mu$ L de glicerol – azul de bromofenol, 48  $\mu$ L de MOPS 10 X, 0,5  $\mu$ L de brometo de etídeo). Após a eletroforese, o aparecimento de bandas foi verificado por exposição do gel à luz ultravioleta.

Os níveis de transcritos de SOD, COX-2 e NF- $\kappa$ B foram determinados por PCR em tempo real (qRT-PCR), utilizando termociclador Step One Plus (Applied Biosystems StepOne™, Foster City, CA) com o kit SuperScript™ III Platinum® SYBR® Green One-Step

qRT-PCR (Invitrogen Life Science, Carlsbad, CA) que contém SYBR® Green I com fluoróforo. O kit realiza a síntese do cDNA e a amplificação da sequência de interesse ao mesmo tempo e foi utilizado de acordo com as especificações do fabricante.

A quantificação da expressão gênica foi realizada pelo método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , usando o gene housekeeping gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH). Esse gene foi escolhido após análise pelo software genorm (<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm>) de 5 genes housekeeping (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase ; tirosina 3-monooxigenase/triptofano 5-monooxigenase;  $\beta$ -2 microglobulina; hipozantina guanina fosforibosil tranferase 1 e ubiquitina C). Na tabela abaixo (Tabela1) encontram-se as sequências dos primers e condições de cada reação.

**Tabela 1: Sequência dos primers usados na reação de real-time PCR.**

<i>Gene</i>	<i>Primer</i>	<i>Annealing</i>
<b>SOD</b>	F: 5'- GGC AAG CGG TGA ACC AGT TG -3' R: 5'- TGC CCA GGT CTC CAA CAT GC -3'	56.3 °C
<b>COX-2</b>	F: 5'- TGT ATG CTA CCA TCT GGC TTC GG -3' R: 5'- GTT TGG AAC AGT CGC TCG TCA TC -3'	56.8 °C
<b>NF<math>\kappa</math>-<math>\beta</math></b>	F: 5'- TCC GAG ATA ATG ACA GCG TGT G -3' R: 5'- GGT CCA TCC TGC CCA TAA TTG -3'	55.1 °C
<b>GAPDH</b>	F: 5'-ATG ATT CTA CCC ACG GCA AG-3' R: 5'-CTG GAA GATGGT GAT GGG TT-3'	60.0 °C

### Análise Estatística

Os dados foram submetidos aos testes de Levene e Shapiro-Wilk para avaliar a homogeneidade e normalidade das amostras, respectivamente. Comparações entre os grupos experimentais foram feitas pela análise de variância utilizando ANOVA one-way, seguido pelo pos-teste de Tukey para comparação individual entre os grupos. Os dados expressam a média ( $\pm$ erro padrão da média). Foram considerados significantes valores de  $p < 0.05$ .



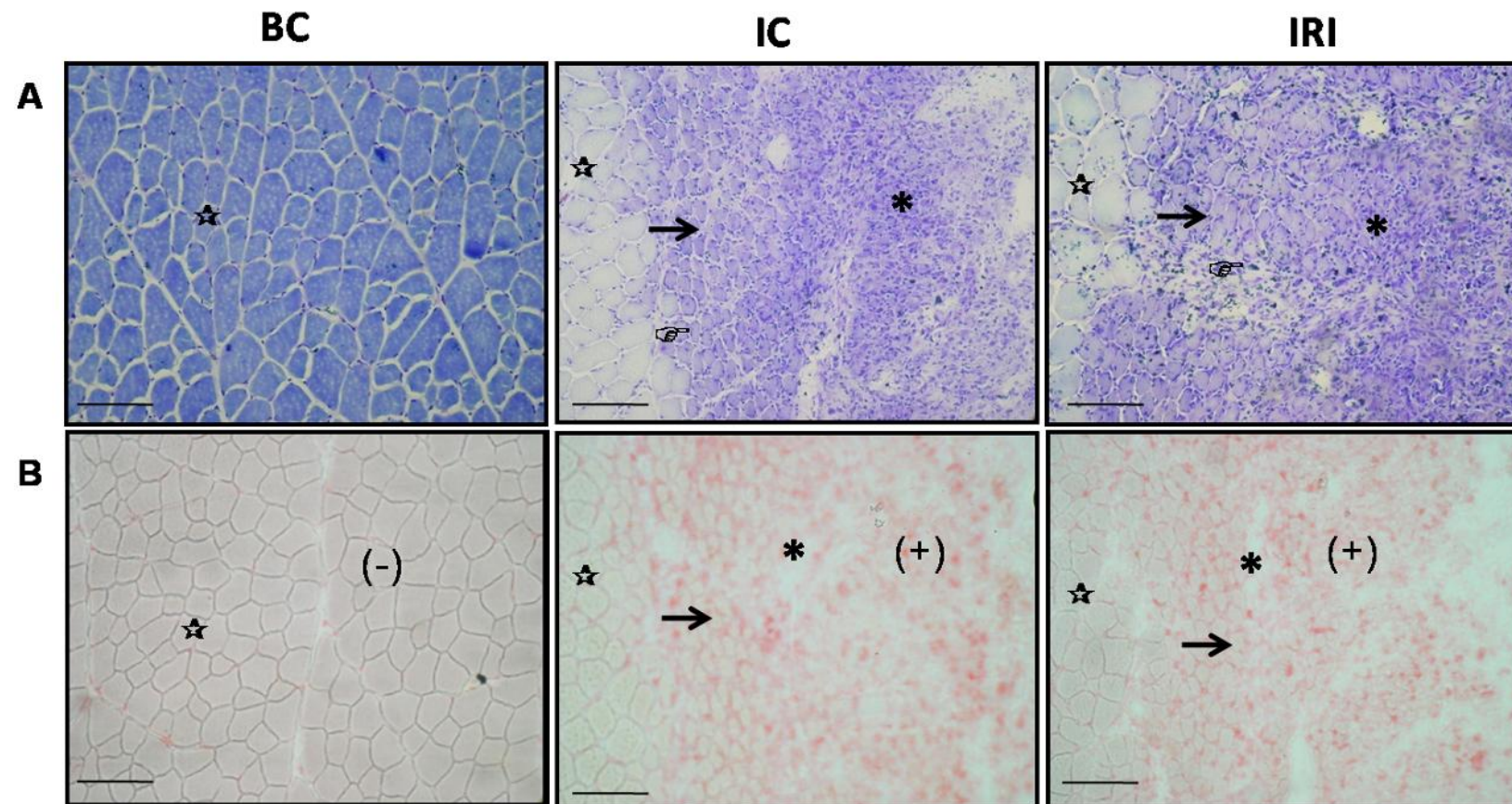
## RESULTADOS

### Análise Morfológica

Por meio de procedimentos histoquímicos realizados, foi possível analisar de forma qualitativa o processo de regeneração muscular, ocorrido tanto sob condições normais como sob influência da irradiação laser, e correlacioná-las ao modelo de indução de lesão utilizada (Figura 4 A e B).

As análises demonstraram que os aspectos morfológicos exibidos foram similares em todos os grupos experimentais lesados (IC e IRI). A região afetada pela criolesão, apresentou-se restrita à região superficial do músculo TA, podendo ser facilmente visualizada nos cortes corados com TB e FA (Figura 4 A e B). Uma demarcação bem definida delimita a interface entre a área intacta e o sítio da lesão (→). As fibras contidas na região intacta (☆) demonstram as características peculiares de um tecido muscular esquelético saudável apresentando um formato poligonal, núcleo periférico, organização fascicular e apresentaram reação negativa (-) à atividade da fosfatase ácida (Figura 4 A e B). Na região do sítio da lesão próximo à interface, são identificadas fibras jovens (☞), caracterizadas por núcleos centralizados e menor área de secção transversa. Já na região superficial da lesão (\*), pode-se indentificar uma elevada concentração de células mononucleadas (inflamatórias e/ou miogênicas), ausência de fibras musculares jovens, matriz extracelular abundante e alta concentração de lisossomos indicando necrose tecidual e fagocitose (+), reação positiva à fosfatase ácida.

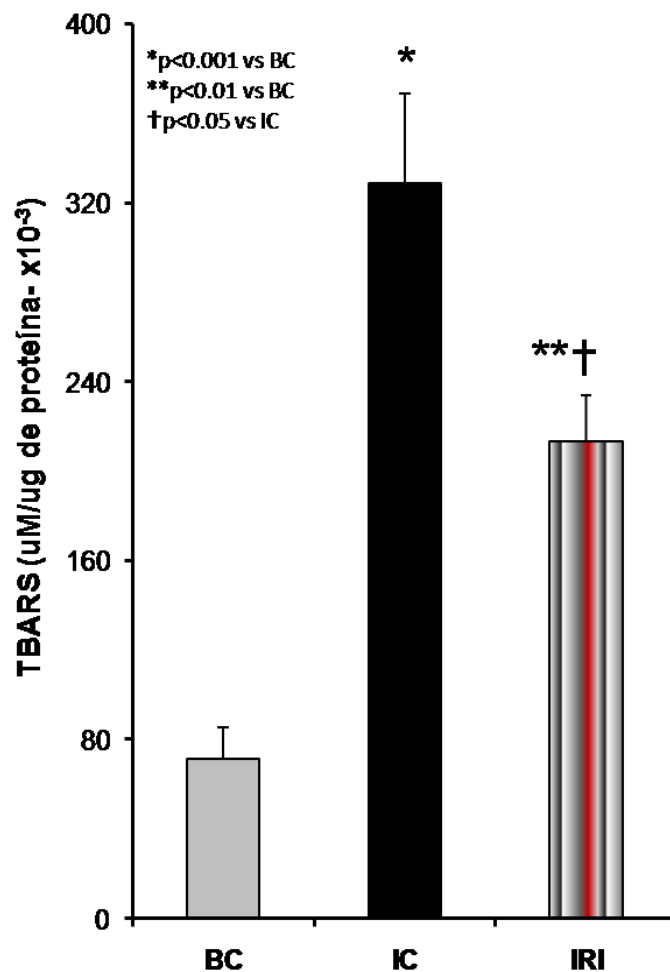
Com relação ao grupo em que não houve lesão (BC), não se encontrou nenhuma alteração na morfologia da fibra e apresentou uma reação negativa à atividade da fosfatase ácida.



**Figura 4: Secções transversais seriadas da região média do músculo TA direito.** (A) Coloração de Azul de Toluidina; (B) Colocação de Fosfatase Ácida ; Músculo TA Normal (BC); Músculo TA lesado (IC); Músculo TA lesado e tratado com laser infravermelho (IRI); Nota-se : (☆) tecido normal; (→) transição entre área normal e lesada; (\*) área lesada; (☞) fibra em regeneração; (-) reações negativa à coloração de fosfatase ácida; (+) reações positivas à coloração de fosfatase ácida caracterizando alta concentração de lisossomos considerados como prova da necrose tecidual. Barra: 100  $\mu$ m (aumento 200x).

### Peroxidação lipídica

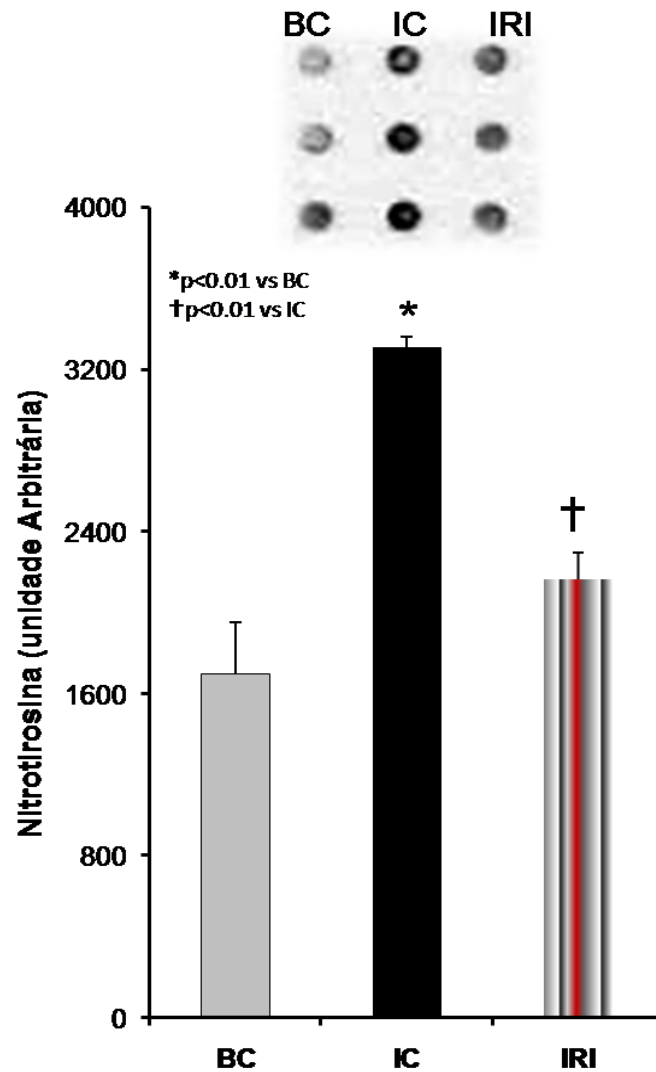
A peroxidação lipídica, avaliada indiretamente pelos níveis de substâncias reativas de ácido tiobarbitúrico (TBARS), aumentou nos grupos lesados (IC e IRI), quando comparado ao grupo controle ( $p < 0.01$ ; Figura 5). Os níveis de TBARS diminuíram significativamente após irradiação ( $p < 0.05$  vs IC).



**Figura 5: Peroxidação lipídica, observada indiretamente pelos níveis de substâncias reativas de ácido tiobarbitúrico (TBARS).** Músculo TA Normal (BC); Músculo TA lesado (IC); Músculo TA lesado e tratado com laser infravermelho (IRI); Nota-se que a LLLT diminuiu os níveis de peroxidação lipídica ( $\dagger p < 0.05$  vs IC).

### Expressão protéica de Nitrotirosina

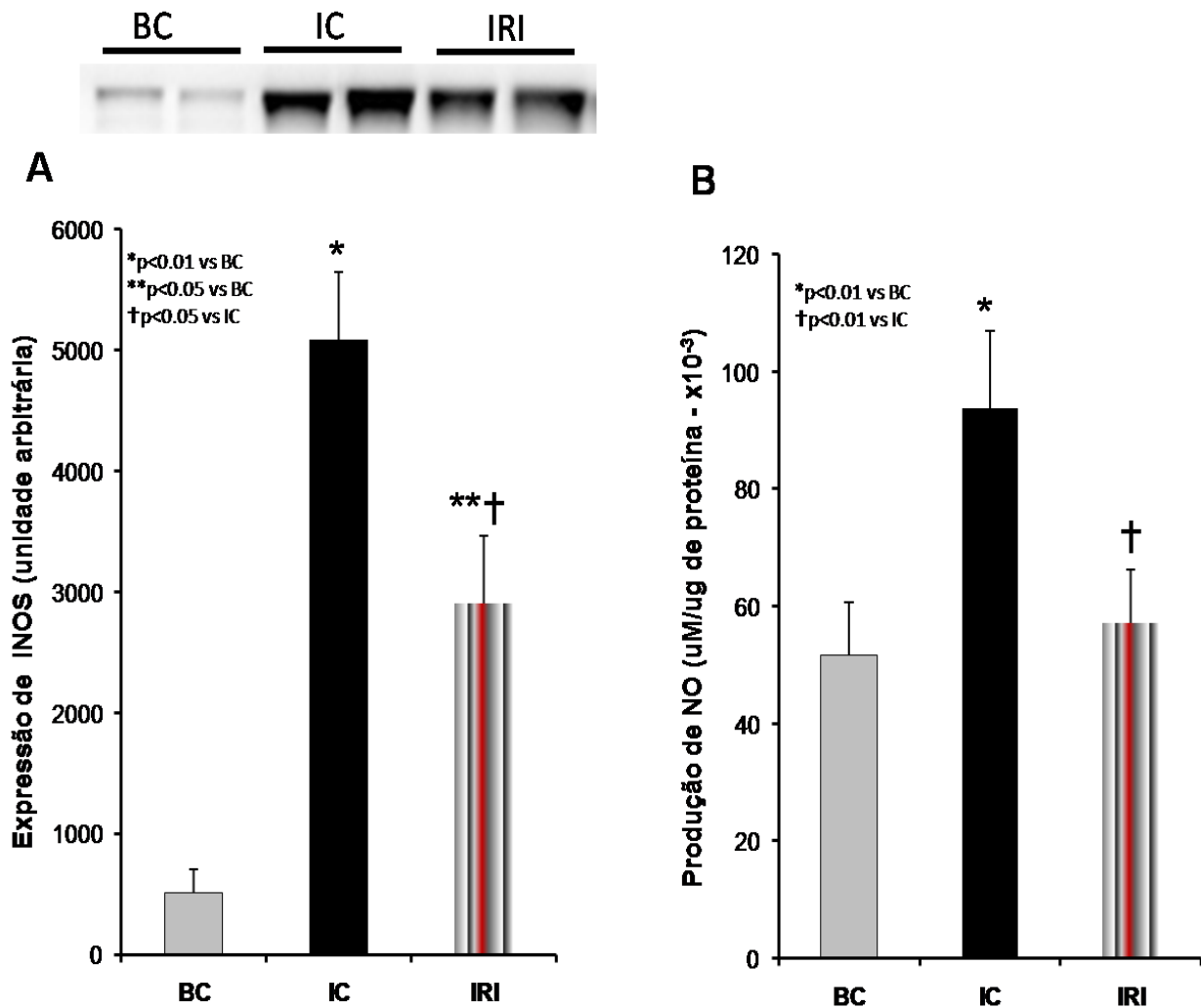
A nitração dos resíduos de tirosina foi evidenciada apenas nos grupos com lesão muscular (IC e IRI;  $p < 0.01$  vs BC). O tratamento com laser reduziu a formação de nitrotirosina no tecido lesado ( $p < 0.01$  vs IC; Figura 6).



**Figura 6: Expressão protéica de nitrotirosina.** Músculo TA Normal (BC); Músculo TA lesado (IC); Músculo TA lesado e tratado com laser infravermelho (IRI); Nota-se que a LLLT diminuiu a expressão de nitrotirosina ( $\dagger p < 0.01$  vs IC).

## Expressão protéica de iNOS e produção de NO

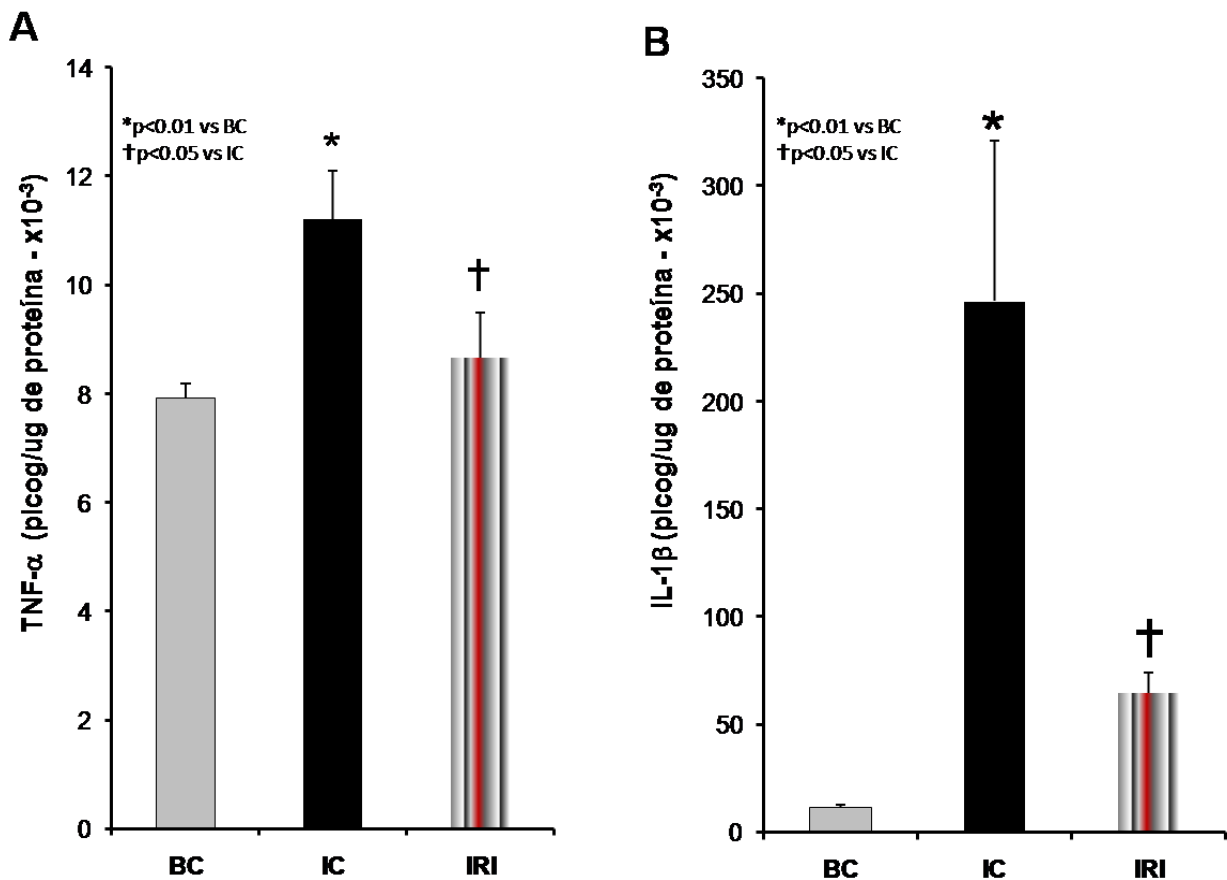
A indução da criolesão elevou a expressão protéica de iNOS e aumentou a produção de NO no homogenato muscular dos grupos IC e IRI ( $p < 0.01$  vs BC). A LLLT reduziu a expressão protéica de iNOS ( $p < 0.05$  vs IC; Figura 7A) no músculo lesado e consequentemente a produção de NO ( $p < 0.01$  vs IC; Figura 7B).



**Figura 7: Expressão protéica de iNOS (A) e Produção de NO (B).** Músculo TA Normal (BC); Músculo TA lesado (IC); Músculo TA lesado e tratado com laser infravermelho (IRI); Nota-se que a LLLT diminuiu a expressão de iNOS ( $\dagger p < 0.05$  vs IC) e de NO ( $\dagger p < 0.01$  vs IC).

## Citocinas musculares

As concentrações das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  quantificadas no homogenato do músculo apresentaram-se aumentadas em todos os grupos lesados ( $p < 0.01$  vs BC; Figura 8 A e B). No grupo tratado com LLLT houve uma diminuição nos níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  ( $p < 0.05$  vs IC).



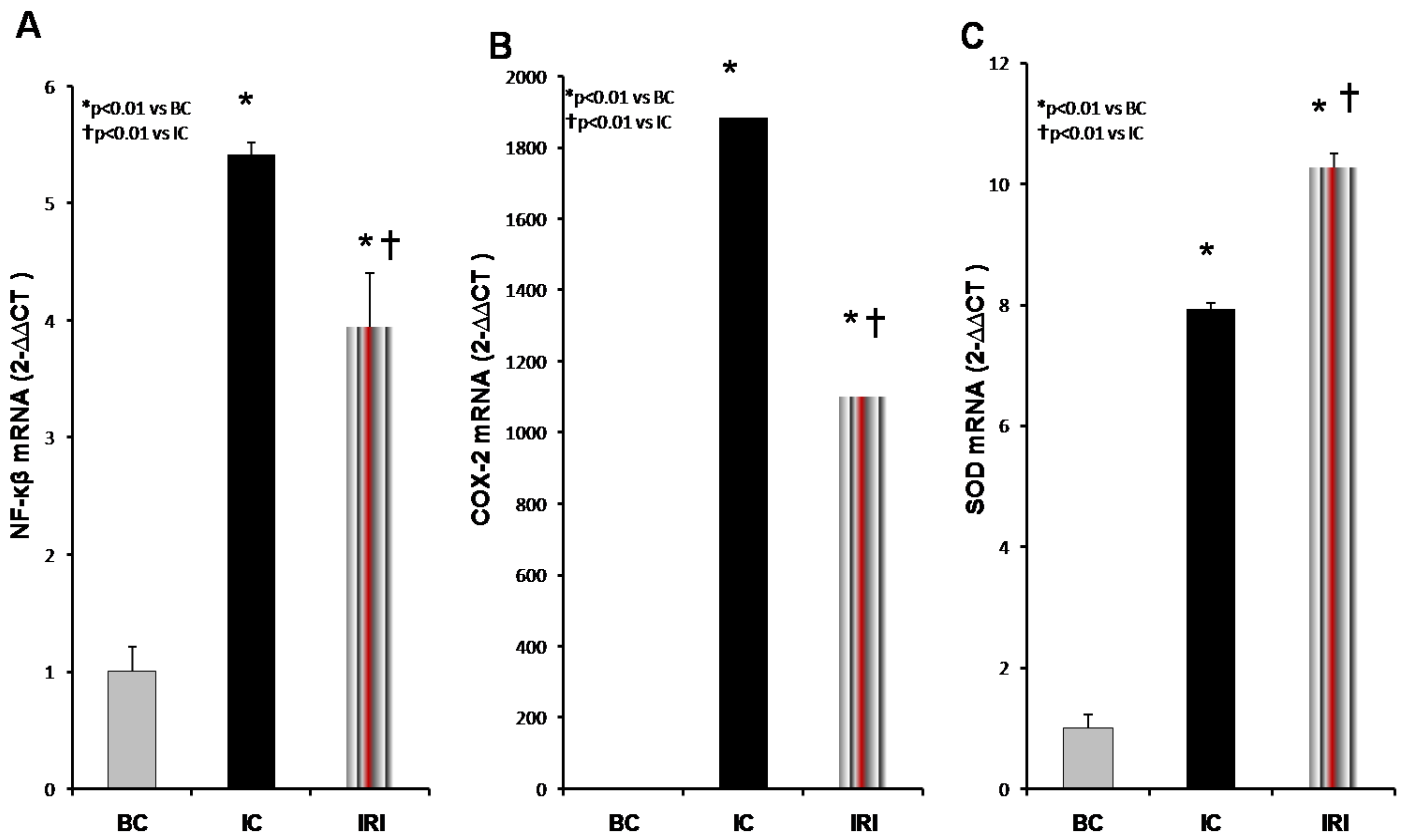
**Figura 8: Concentração de citocinas Inflamatória: TNF- $\alpha$  (A) e IL-1 $\beta$  (B).** Músculo TA Normal (BC); Músculo TA lesado (IC); Músculo TA lesado e tratado com laser infravermelho (IRI); Nota-se que a LLLT diminuiu a concentração de citocinas inflamatórias ( $\dagger p < 0.05$  vs IC).

### Expressão gênica de NFκβ , COX-2 e SOD

A expressão gênica de NF-κβ, avaliadas pelo mRNA foi aumentada nos grupos com lesão muscular (IC e IRI;  $p < 0.01$  vs BC; Figura 9A). A LLLT diminuiu a expressão gênica de NF-κβ ( $p < 0.01$  vs IC) do músculo lesado.

A expressão gênica de COX-2 apresentou o mesmo padrão observado para o mRNA de NF-κβ (Figura 9B). Os níveis de COX-2 aumentaram nos grupos lesados (IC e IRI) comparado ao grupo controle (BC;  $p < 0.01$ ). O grupo IRI apresentou redução no mRNA de COX-2 após irradiação ( $p < 0.01$  vs IC)

Quanto à expressão gênica da enzima SOD, uma enzima do sistema antioxidante, foi aumentada nos grupos criolesados (IC e IRI;  $p < 0.01$  vs BC; Figura 9C). LLLT potencializou o aumento do mRNA da SOD neste modelo ( $p < 0.01$  vs IC).



**Figura 9: Expressão gênica de NFκβ (A); COX-2 (B); SOD (C).** Músculo TA Normal (BC); Músculo TA lesado (IC); Músculo TA lesado e tratado com laser infravermelho (IRI); Nota-se que a LLLT diminuiu a expressão gênica de NF-κβ e COX-2 ( $†p < 0.01$  vs IC) e aumentou a expressão gênica de SOD ( $†p < 0.01$  vs IC).

## DISCUSSÃO

A LLLT tem demonstrado efeitos favoráveis em biomodular a resposta inflamatória, promover o reparo tecidual, diminuir a dor e reduzir a fadiga muscular em diversos modelos de pesquisa laboratorial e clínica [29,31,33]. Embora muitos trabalhos demonstrem os mecanismos biológicos e consequentes efeitos terapêuticos da LLLT, faz-se necessário mais estudos que determinem de que forma a energia eletromagnética interage com biomarcadores presentes durante o processo inflamatório e quais são as vias de sinalização envolvidas neste processo. Assim, no presente estudo, foi utilizado um modelo de criolesão em ratos, a fim de avaliar a influência da LLLT sobre o estresse oxidativo/nitrativo e mediadores inflamatórios presentes no local da lesão.

Os resultados mostraram que a LLLT reduz o estresse oxidativo e nitrativo por aumentar a expressão de SOD e reduzir a expressão de iNOS e a produção de NO. Como consequência desta modulação, observamos menores níveis de peroxidação lipídica e formação de nitrotirosina no tecido muscular. Além disso, houve uma redução na resposta inflamatória, evidenciada por níveis mais baixos de mRNA de NF- $\kappa$ B e COX-2, e reduzida concentração de citocinas (TNF- $\alpha$  e IL1- $\beta$ ) no tecido lesado, inferindo uma melhor regeneração muscular.

Diversos modelos experimentais têm sido utilizados para avaliar a influência da irradiação em diferentes fases do processo de regeneração muscular [34-36]. No presente estudo, a análise morfológica demonstrou que a indução da criolesão no músculo tibial anterior gerou uma resposta inflamatória caracterizado por alterações na estrutura muscular, aumento de edema intercelular e presença de infiltrado inflamatório associados a altas concentrações de lisossomos, considerado como marcador de fagocitose e mionecrose [29,30,32]. Neste modelo não observamos diferenças morfológicas entre os grupos lesados irradiado e não irradiado. Como a microscopia de luz é uma técnica que limita a análise morfológica, estudos adicionais utilizando microscopia eletrônica de transmissão podem ser necessários para uma análise mais completa. Apesar desta limitação, fomos capazes de confirmar uma menor área de lesão nos grupos irradiados e aumento nos níveis de fatores regulatórios miogênicos (Assis *et al.* manuscrito submetido).

No presente estudo, foi investigado também, o estresse oxidativo e nitrativo, avaliado pela peroxidação lipídica, produção de NO e presença de nitrotirosina. O aumento da peroxidação lipídica, da produção de NO, da expressão protéica de iNOS e da formação de nitrotirosina nos músculos criolesados, sugere que o estresse oxidativo e nitrativo local poderia



amplificar a gravidade da lesão, e modificar tanto funcionalmente quanto estruturalmente proteínas e lipídeos da membrana celular, promovendo alterações nas vias de sinalização, o que contribui para aumentar a resposta inflamatória tecidual [6,7,12].

A peroxidação lipídica das membranas celulares altera sua permeabilidade e consequentemente sua seletividade para a entrada e saída de nutrientes e substâncias tóxicas da célula, levando à danos em diferentes organelas e componentes celulares. A peroxidação lipídica pode ocorrer por via enzimática, ou seja, pela ativação de ciclooxigenases e lipoxigenases sobre os ácidos graxos poliinsaturados e/ou via peroxidação não enzimática causada por ROS, RNS, metais de transição e outros radicais [12,17]. Neste contexto, observamos que a LLLT reduziu a peroxidação lipídica mantendo-a próximo aos níveis basais. Embora o mecanismo desta redução seja desconhecido, é relevante ressaltar que houve uma menor expressão gênica de COX-2 e um aumento na expressão de SOD após a LLLT neste modelo.

Adicionalmente, o NO também pode estar envolvido com as alterações locais decorrentes da lesão muscular. Neste estudo, a LLLT exerceu um importante efeito na redução da expressão proteica de iNOS. Observamos também menor produção de NO, o que pode ser consequência de uma reduzida expressão de iNOS. Vários estudos evidenciaram que os efeitos do NO e seus subprodutos são complexos e ambíguos. Sabe-se que o NO é um importante mediador da inflamação pois contribui para a ativação e inativação de diferentes moléculas envolvidas no processo inflamatório. Além disso, ele também pode reagir com o ânion superóxido, gerando peroxinitrito [17], o qual causa o estresse nitrativo [37].

O peroxinitrito é um forte oxidante e agente promotor de nitração, capaz de reagir com ácidos graxos poliinsaturados, intensificando o processo de peroxidação lipídica e a formação de mediadores pró-inflamatórios. Em adição, este ânion é capaz de induzir a nitração do resíduos de tirosina, contribuindo para necrose e/ou apoptose celular [17]. Mihm et al (2001) mostraram que a nitração de creatina quinase miofibrilar induzida por peroxinitrito pode conduzir à disfunção contrátil devido à lesão de DNA e/ou apoptose [38].

O aumento na produção de NO observado no presente estudo, correlaciona-se com o aumento da peroxidação lipídica e formação de nitrotirosina nos grupos lesado, indicando provável aumento de lesões oxidativas e nitrativas. No grupo irradiado, a diminuição da expressão de iNOS e da concentração de NO, gera uma menor produção de peroxinitrito, indiretamente verificada pela reduzida expressão de nitrotirosina. Neste caso, o laser infravermelho (808 nm) nos parâmetros selecionados, foi capaz de reduzir o estresse oxidativo e nitrativo, sugerindo um menores efeitos deletérios ao tecido lesado. Estes achados sugerem

que o laser pode ser usado para diminuir os efeitos citotóxicos de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio produzidas na lesão muscular.

Com relação aos efeitos antioxidantes da irradiação, observamos um aumento na expressão gênica da enzima antioxidante SOD, responsável por catalizar a reação de dismutação do radical anion superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio. O provável aumento da atividade de SOD previne a formação adicional de peroxinitrito e outras espécies reativas [25]. Desta forma, os resultados observados em nosso modelo sugerem que a LLLT teve um efeito biológico positivo no balanço redox, pois reduziu o estresse oxidativo e nitrativo, diminuindo danos oxidativos que atrasam a recuperação do tecido lesado.

A LLLT foi capaz de atenuar a liberação de mediadores que auxiliam a produção de espécies reativas e aumentar a capacidade de defesa orgânica contra lesões oxidativas teciduais. Rizzi et al. (2006), usando laser infravermelho (AsGa; 904 nm; 45 mW; 5 J/cm<sup>2</sup>; 35 s), mostraram que a LLLT promoveu efeitos benéficos sobre a regeneração muscular, reduzindo a resposta inflamatória, o estresse oxidativo e a expressão de iNOS e NF- $\kappa$ B e elevando o conteúdo de antioxidantes tecidual [26]. Tem sido sugerido que a LLLT em diferentes comprimentos de onda (638.8 e 904 nm) diminuem o radical superóxido disponível e a produção de peroxinitrito como resultado do aumento da expressão de SOD [39,40]. Vladimirov et al. (2004) explicam que a energia eletromagnética laser é capaz de fotoreativar a enzima SOD por deslocar o resíduo de histidina do centro ativo da enzima, ativando-a [41].

Ainda que não se conheça o exato mecanismo do efeito biomodulatório sobre o balanço redox, cabe salientar que a fase inflamatória da regeneração muscular é dependente de vários mediadores inflamatórios. Portanto, torna-se útil a abordagem direta da influência da fototerapia sobre mediadores inflamatórios, em especial o NF- $\kappa$ B, presente durante este processo. O NF- $\kappa$ B é um fator de transcrição nuclear rapidamente ativado em resposta ao estresse oxidativo [19,42,43], e que participa da transcrição de diversos genes responsáveis pela regulação do processo inflamatório. Os produtos desta indução gênica incluem mediadores inflamatórios, tais como COX-2, iNOS, citocinas pró-inflamatórias, moléculas de adesão, dentre outros [19].

A liberação excessiva de mediadores pró-inflamatórios induzidos pela ativação de NF- $\kappa$ B podem dificultar o processo normal de reparo muscular. Sabe-se que o aumento da atividade de COX-2 resulta na produção de prostaglandinas, contribuindo para a dor, edema e destruição tecidual [45]. A elevada produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  contribuem para amplificar o processo inflamatório [29,45] e inibir a diferenciação e fusão de mioblastos [45] prejudicando o restabelecimento funcional e estrutural do músculo. Existem

evidências de que o aumento de TNF- $\alpha$  esta associado com a diminuição de myoD (fator de transcrição miogênica responsável pela diferenciação das células satélites), o que poderia explicar o comprometimento na regeneração muscular [44,46].

Thaloor et al (1999) descreveram o NF- $\kappa\beta$  como um importante regulador da transcrição de genes pró-inflamatórios presentes durante a lesão muscular [47]. A inibição deste fator de transcrição estimula a regeneração muscular [48]. No presente estudo, encontramos que o trauma foi capaz de induzir a transcrição do mRNA de NF- $\kappa\beta$ , aumentando a produção de mediadores inflamatórios, como COX-2, iNOS, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Entretanto, a LLLT diminuiu a expressão gênica de NF- $\kappa\beta$ , sugerindo que este efeito poderia ser o responsável pela produção reduzida de mediadores pró-inflamatórios neste modelo. Como discutido acima, os efeitos anti-inflamatórios mediados pela LLLT durante o reparo muscular, pode ser uma consequência de uma redução e ou inativação do NF- $\kappa\beta$  [49-52].

Em conclusão, nossos dados indicam que o laser infravermelho (808 nm), potência óptica de saída de 30 mW, densidade de energia de 180 J/cm<sup>2</sup>, energia total de 16 J por sessão, irradiância de 3.8 mW/cm<sup>2</sup> aplicado por 4 dias consecutivos, foi capaz de atenuar o estresse oxidativo e nitrativo no músculo esquelético, diminuir a produção de NO, a peroxidação lipídica, a formação de nitrotirosina e a expressão protéica de iNOS, assim como, pode aumentar a expressão gênica de SOD. Além disso, a expressão de NF- $\kappa\beta$ , COX-2 e a produção de TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$  foram reduzidas na área da lesão do grupo tratado, levando a um efeito anti-inflamatório. Assim, estes dados experimentais trazem significativa contribuição para a compreensão adicional dos efeitos da LLLT em humanos, inferindo assim, o uso desta terapia como uma modalidade terapêutica inovadora e eficiente no tratamento de lesões musculares. No entanto, investigações complementares sobre os mecanismos moleculares são necessárias para esclarecer a influência da LLLT em doenças inflamatórias em geral.

## **REFERÊNCIAS**

1. Tidball JG. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 2005; 288(2):R345-353.
2. Huard J, Li Y, Fu FH. Muscle injuries and repair: current trends in research. *The Journal of bone and joint surgery American volume* 2002; 84-A(5):822-832.
3. Li Y, Cummins J, Huard J. Muscle injury and repair. *Current Opinion in Orthopedics* 2001; 12:6.
4. Jarvinen TA, Jarvinen TL, Kaariainen M, Kalimo H, Jarvinen M. Muscle injuries: biology and treatment. *The American journal of sports medicine* 2005; 33(5):745-764.
5. Buford TW, Cooke MB, Shelmadine BD, Hudson GM, Redd L, Willoughby DS. Effects of eccentric treadmill exercise on inflammatory gene expression in human skeletal muscle. *Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme* 2009; 34(4):745-753.
6. Shi X, Garry DJ. Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. *Genes & development* 2006; 20(13):1692-1708.
7. Filippin LI, Cuevas MJ, Lima E, Marroni NP, Gonzalez-Gallego J, Xavier RM. Nitric oxide regulates the repair of injured skeletal muscle. *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society* 2011; 24(1):43-49.
8. Jackson MJ, Pye D, Palomero J. The production of reactive oxygen and nitrogen species by skeletal muscle. *Journal of applied physiology* 2007; 102(4):1664-1670.
9. Lecarpentier Y, Blanc FX, Quillard J, Hebert JL, Krokidis X, Coirault C. Statistical mechanics of myosin molecular motors in skeletal muscles. *Journal of theoretical biology* 2005; 235(3):381-392.
10. Reid MB, Khawli FA, Moody MR. Reactive oxygen in skeletal muscle. III. Contractility of unfatigued muscle. *Journal of applied physiology* 1993; 75(3):1081-1087.
11. Reid MB. Invited Review: redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. *Journal of applied physiology* 2001; 90(2):724-731.
12. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews* 2002; 82(1):47-95.
13. Kaminski HJ, Andrade FH. Nitric oxide: biologic effects on muscle and role in muscle diseases. *Neuromuscular disorders : NMD* 2001; 11(6-7):517-524.

14. Filippin LI, Moreira AJ, Marroni NP, Xavier RM. Nitric oxide and repair of skeletal muscle injury. *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society* 2009; 21(3-4):157-163.
15. Adams V, Nehrhoff B, Spate U, Linke A, Schulze PC, Baur A, Gielen S, Hambrecht R, Schuler G. Induction of iNOS expression in skeletal muscle by IL-1beta and NFkappaB activation: an in vitro and in vivo study. *Cardiovascular research* 2002; 54(1):95-104.
16. El-Remessy AB, Al-Shabrawey M, Platt DH, Bartoli M, Behzadian MA, Ghaly N, Tsai N, Motamed K, Caldwell RB. Peroxynitrite mediates VEGF's angiogenic signal and function via a nitration-independent mechanism in endothelial cells. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2007; 21(10):2528-2539.
17. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *The American journal of physiology* 1996; 271(5 Pt 1):C1424-1437.
18. Tang JB, Xu Y, Ding F, Wang XT. Expression of genes for collagen production and NF-kappaB gene activation of in vivo healing flexor tendons. *The Journal of hand surgery* 2004; 29(4):564-570.
19. Van den Berg R, Haenen GR, van den Berg H, Bast A. Transcription factor NF-kappaB as a potential biomarker for oxidative stress. *The British journal of nutrition* 2001; 86 Suppl 1:S121-127.
20. Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *The New England journal of medicine* 1997; 336(15):1066-1071.
21. Langen RC, Schols AM, Kelders MC, Wouters EF, Janssen-Heininger YM. Inflammatory cytokines inhibit myogenic differentiation through activation of nuclear factor-kappaB. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2001; 15(7):1169-1180.
22. Maiya GA, Kumar P, Rao L. Effect of low intensity helium-neon (He-Ne) laser irradiation on diabetic wound healing dynamics. *Photomedicine and laser surgery* 2005; 23(2):187-190.
23. Campana V, Moya M, Gavotto A, Juri H, Palma JA. Effects of diclofenac sodium and He:Ne laser irradiation on plasmatic fibrinogen levels in inflammatory processes. *Journal of clinical laser medicine & surgery* 1998; 16(6):317-320.
24. Bradley P, Hughes F, Sattayut S. 820 nm Gallium Aluminium Arsenide laser modulation of Prostaglandin E 2 production in Interleukin-1. *Laser Therapy* 1999; 11(2):7.

25. Dourado DM, Favero S, Baranauskas V, da Cruz-Hofling MA. Effects of the Ga-As laser irradiation on myonecrosis caused by Bothrops Moojeni snake venom. *Lasers in surgery and medicine* 2003; 33(5):352-357.
26. Rizzi CF, Mauriz JL, Freitas Correa DS, Moreira AJ, Zettler CG, Filippin LI, Marroni NP, Gonzalez-Gallego J. Effects of low-level laser therapy (LLLT) on the nuclear factor (NF)-kappaB signaling pathway in traumatized muscle. *Lasers in surgery and medicine* 2006; 38(7):704-713.
27. Renno AC, Toma RL, Feitosa SM, Fernandes K, Bossini PS, de Oliveira P, Parizotto N, Ribeiro DA. Comparative effects of low-intensity pulsed ultrasound and low-level laser therapy on injured skeletal muscle. *Photomedicine and laser surgery* 2011; 29(1):5-10.
28. 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. *Biochimica et biophysica acta* 1999; 1448(3):372-380.
29. Mesquita-Ferrari RA, Martins MD, Silva JA, Jr., da Silva TD, Piovesan RF, Pavesi VC, Bussadori SK, Fernandes KP. Effects of low-level laser therapy on expression of TNF-alpha and TGF-beta in skeletal muscle during the repair process. *Lasers in medical science* 2011; 26(3):335-340.
30. Miyabara EH, Martin JL, Griffin TM, Moriscot AS, Mestril R. Overexpression of inducible 70-kDa heat shock protein in mouse attenuates skeletal muscle damage induced by cryolesioning. *American journal of physiology Cell physiology* 2006; 290(4):C1128-1138.
31. Lopes-Martins RA, Marcos RL, Leonardo PS, Prianti AC, Jr., Muscara MN, Aimbire F, Frigo L, Iversen VV, Bjordal JM. Effect of low-level laser (Ga-Al-As 655 nm) on skeletal muscle fatigue induced by electrical stimulation in rats. *Journal of applied physiology* 2006; 101(1):283-288.
32. Salvini TF, Belluzzo SS, Selistre de Araujo HS, Souza DH. Regeneration and change of muscle fiber types after injury induced by a hemorrhagic fraction isolated from *Agkistrodon contortrix laticinctus* venom. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* 2001; 39(5):641-649.
33. Leal Junior EC, Lopes-Martins RA, de Almeida P, Ramos L, Iversen VV, Bjordal JM. Effect of low-level laser therapy (GaAs 904 nm) in skeletal muscle fatigue and biochemical markers of muscle damage in rats. *European journal of applied physiology* 2010; 108(6):1083-1088.

34. Vasilenko T, Slezak M, Kovac I, Bottkova Z, Jakubco J, Kostelnikova M, Tomori Z, Gal P. The effect of equal daily dose achieved by different power densities of low-level laser therapy at 635 and 670 nm on wound tensile strength in rats: a short report. *Photomedicine and laser surgery* 2010; 28(2):281-283.
35. Lakyova L, Toporcer T, Tomeckova V, Sabo J, Radonak J. Low-level laser therapy for protection against skeletal muscle damage after ischemia-reperfusion injury in rat hindlimbs. *Lasers in surgery and medicine* 2010; 42(9):665-672.
36. 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. *Photomedicine and laser surgery* 2009; 27(6):901-906.
37. Kroncke KD, Fehsel K, Suschek C, Kolb-Bachofen V. Inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide in gene regulation, cell death and cell survival. *International immunopharmacology* 2001; 1(8):1407-1420.
38. Mihm MJ, Yu F, Carnes CA, Reiser PJ, McCarthy PM, Van Wagoner DR, Bauer JA. Impaired myofibrillar energetics and oxidative injury during human atrial fibrillation. *Circulation* 2001; 104(2):174-180.
39. Liu XG, Zhou YJ, Liu TC, Yuan JQ. Effects of low-level laser irradiation on rat skeletal muscle injury after eccentric exercise. *Photomedicine and laser surgery* 2009; 27(6):863-869.
40. Servetto N, Cremonezzi D, Simes JC, Moya M, Soriano F, Palma JA, Campana VR. Evaluation of inflammatory biomarkers associated with oxidative stress and histological assessment of low-level laser therapy in experimental myopathy. *Lasers in surgery and medicine* 2010; 42(6):577-583.
41. Vladimirov YA, Osipov AN, Klebanov GI. Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation. *Biochemistry Biokhimiia* 2004; 69(1):81-90.
42. Mauriz JL, Matilla B, Culebras JM, Gonzalez P, Gonzalez-Gallego J. Dietary glycine inhibits activation of nuclear factor kappa B and prevents liver injury in hemorrhagic shock in the rat. *Free radical biology & medicine* 2001; 31(10):1236-1244.
43. Moreira AJ, Fraga C, Alonso M, Collado PS, Zettler C, Marroni C, Marroni N, Gonzalez-Gallego J. Quercetin prevents oxidative stress and NF-kappaB activation in gastric mucosa of portal hypertensive rats. *Biochemical pharmacology* 2004; 68(10):1939-1946.

44. Langen RC, Van Der Velden JL, Schols AM, Kelders MC, Wouters EF, Janssen-Heininger YM. Tumor necrosis factor-alpha inhibits myogenic differentiation through MyoD protein destabilization. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2004; 18(2):227-237.
45. Pereira MC, de Pinho CB, Medrado AR, Andrade Zde A, Reis SR. Influence of 670 nm low-level laser therapy on mast cells and vascular response of cutaneous injuries. *Journal of photochemistry and photobiology B, Biology* 2010; 98(3):188-192.
46. Kollias HD, McDermott JC. Transforming growth factor-beta and myostatin signaling in skeletal muscle. *Journal of applied physiology* 2008; 104(3):579-587.
47. Thaloor D, Miller KJ, Gephart J, Mitchell PO, Pavlath GK. Systemic administration of the NF-kappaB inhibitor curcumin stimulates muscle regeneration after traumatic injury. *The American journal of physiology* 1999; 277(2 Pt 1):C320-329.
48. Lille ST, Lefler SR, Mowlavi A, Suchy H, Boyle EM, Jr., Farr AL, Su CY, Frank N, Mulligan DC. Inhibition of the initial wave of NF-kappaB activity in rat muscle reduces ischemia/reperfusion injury. *Muscle & nerve* 2001; 24(4):534-541.
49. Fillipin LI, Mauriz JL, Vedovelli K, Moreira AJ, Zettler CG, Lech O, Marroni NP, Gonzalez-Gallego J. Low-level laser therapy (LLLT) prevents oxidative stress and reduces fibrosis in rat traumatized Achilles tendon. *Lasers in surgery and medicine* 2005; 37(4):293-300.
50. Bjordal JM, Lopes-Martins RAB, Joensen J, Iversen VV. The anti-inflammatory mechanism of low level laser therapy and its relevance for clinical use in physiotherapy *Physical Therapy Reviews* 2010; 15(4 ):7.
51. Aimbire F, Ligeiro de Oliveira AP, Albertini R, Correa JC, Ladeira de Campos CB, Lyon JP, Silva JA, Jr., Costa MS. Low level laser therapy (LLLT) decreases pulmonary microvascular leakage, neutrophil influx and IL-1beta levels in airway and lung from rat subjected to LPS-induced inflammation. *Inflammation* 2008; 31(3):189-197.
52. Pallotta RC, Bjordal JM, Frigo L, Leal Junior EC, Teixeira S, Marcos RL, Ramos L, de Moura Messias F, Lopes-Martins RA. Infrared (810-nm) low-level laser therapy on rat experimental knee inflammation. *Lasers in medical science* 2012; 27(1):71-78.



***Manuscrito II***

---

**Terapia Laser de Baixa Intensidade (808 nm) favorece a regeneração muscular e previne a fibrose do músculo tibial anterior de ratos após criolesão**

*Submetido  
Lasers in Medical Science  
LIMS-1234*

---

**TERAPIA LASER DE BAIXA INTENSIDADE (808 nm) FAVORECE A  
REGENERAÇÃO MUSCULAR E PREVINE A FIBROSE DO MÚSCULO TIBIAL  
ANTERIOR DE RATOS APÓS CRIOLEÇÃO**

Lívia Assis, MS, PhD<sup>1</sup>, Ana Iochabel Soares Moretti, MS, PhD<sup>2\*</sup>, Thalita Balsamo Abrahão, PhD<sup>3</sup>,  
Heraldo Possolo de Souza, MD, PhD<sup>2</sup>, Michael R Hamblin, PhD<sup>4</sup> and Nivaldo Antonio Parizotto,  
MS, PhD<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Eletrotermofototerapia, Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil. <sup>2</sup> Laboratório da Disciplina de Emergências Clínicas, Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil. <sup>3</sup> Laboratório de Biologia Vascular, Departamento de Cardiopneumologia, Instituto do Coração, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil. <sup>4</sup> Wellman Center for Photomedicine, Massachusetts General Hospital, Boston MA.

**Correspondente:** Nivaldo Antonio Parizotto. Tel.: (0055-16) 3351-8630 / Fax: (0055-16) 3351-2081. Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos, Rodovia Washington Luís, km 235, CEP 13565-905, São Carlos, SP, Brasil. E-mail: parizotto@power.ufscar.br

**Título resumido:** LLLT favorece a regeneração muscular e previne a fibrose muscular

## RESUMO

**Introdução e Objetivo:** A regeneração muscular é um fenômeno complexo que envolve a substituição de fibras danificadas por novas fibras musculares. Durante este processo, há uma tendência de formação de tecido cicatricial ou fibroso, por deposição de colágeno na região lesada, prejudicando a estrutura e a função muscular. Assim, o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento capazes de modular a fibrose e favorecer o processo regenerativo torna-se importante para a Fisioterapia. A terapia laser de baixa intensidade (LLLT) tem sido estudada para o tratamento clínico de lesões e desordens que acometem o tecido músculo esquelético, contudo seus mecanismos moleculares e biológicos ainda não foram esclarecidos. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da LLLT em marcadores moleculares envolvidos na regeneração e fibrose muscular após criolesão do músculo tibial anterior (TA) em ratos.

**Materiais e Métodos:** Sessenta ratos da linhagem Wistar foram separados em três grupos (n=20): (BC) grupo controle; (IC) músculo TA direito criolesado sem tratamento; (IRI) músculo TA direito criolesado submetido à irradiação laser. As regiões lesadas receberam irradiação local e em contato, por quatro dias consecutivos, iniciando o tratamento imediatamente após a indução da criolesão, utilizando um laser AsGaAl (contínuo;  $\lambda = 808$  nm; P=30 mW; área do feixe =  $0.00785$  cm<sup>2</sup>; t=47 s; D=180 J/cm<sup>2</sup>; E=1.4 J; irradiância=3.8 mW/cm<sup>2</sup>). Os animais foram sacrificados quatro dias após lesão. As áreas lesadas foram quantificadas por análise morfométrica. Os níveis de mRNA (RNA mensageiro) de MyoD, miogenina, TGF- $\beta$  e VEGF foram analisadas pela técnica de PCR em tempo real (qRT-PCR) e a expressão de colágeno tipo I foi avaliada por western blot.

**Resultados:** A LLLT reduziu a porcentagem de área lesada do músculo lesado, aumentou os níveis de mRNA dos fatores transcricionais MyoD e miogenina, e do fator de crescimento vascular pró-angiogênico (VEGF). Além disso, a LLLT diminuiu a expressão do mRNA de TGF- $\beta$  e reduziu a deposição de colágeno tipo I.

**Conclusão:** Estes resultados sugerem que a LLLT pode ser uma abordagem terapêutica efetiva, pois promove a regeneração do músculo esquelético e previne a fibrose tecidual após lesão muscular.

**Palavras-chave:** Terapia laser de baixa intensidade; fotobiomodulação; lesão muscular; regeneração muscular; MyoD; miogenina; VEGF; TGF- $\beta$ 1; colágeno tipo I.

## **ABSTRACT**

**Background and Objective:** Muscle regeneration is a complex phenomenon, involving replacement of damaged fibers by new muscle fibers. During this process, there is a tendency to form scar tissue or fibrosis by deposition of collagen that could be detrimental to muscle function. New therapies that could regulate fibrosis and favor muscle regeneration would be important for physical therapy. Low-level laser therapy (LLLT) has been studied for clinical treatment of skeletal muscle injuries and disorders. The positive effects of LLLT on injured muscle are known, even though the molecular and biological mechanisms have not yet been clarified. The aim of this study was to evaluate the effects of LLLT on molecular markers involved in muscle fibrosis and regeneration after a cryolesion of the tibialis anterior (TA) muscle in rats.

**Material and Methods:** Sixty Wistar rats were randomly divided into three groups (n=20): control (BC), injured TA muscle without LLLT (IC), injured TA muscle treated with LLLT (IRI). The injured region was irradiated daily for 4 consecutive days, starting immediately after the lesion using an AlGaAs laser (continuous wave, 808nm, tip area of 0.00785 cm<sup>2</sup>, power 30 mW, application time 47 s, fluence 180 J/cm<sup>2</sup>; total energy 1.4J, irradiance =3.8 mW/cm<sup>2</sup>). The animals were sacrificed on the fourth day after injury.

**Results:** LLLT reduced the lesion percentage area in the injured muscle, increased mRNA levels of the transcription factors MyoD and myogenin and the pro-angiogenic vascular endothelial growth factor (VEGF). Moreover, LLLT decreased the expression of the profibrotic transforming growth factor (TGF)- $\beta$  mRNA and reduced type I collagen deposition.

**Conclusion:** These results suggest that LLLT could be an effective therapeutic approach for promoting skeletal muscle regeneration while preventing tissue fibrosis after muscle injury.

**Keywords:** low-level laser therapy; photobiomodulation; muscle cryolesion; MyoD, myogenin, VEGF, TGF- $\beta$ 1, type I collagen; muscle regeneration; rat model.

## INTRODUÇÃO

Lesões musculares esqueléticas são rotineiramente encontradas em centros de reabilitação. Em virtude da intensidade da lesão e/ou tempo de recuperação, pode ocorrer a formação de tecido cicatricial, reduzindo significativamente a capacidade funcional do músculo e aumentando a possibilidade de recidiva de lesão, atrofia, contraturas e dores crônicas [1,2].

A regeneração muscular envolve uma série de processos moleculares e celulares altamente organizados que contribuem para a recuperação estrutural e funcional do músculo lesado [3]. A fase inicial deste processo é caracterizada por presença da resposta inflamatória, necrose do tecido lesado, seguida de ativação e proliferação de células satélite (CS) adultas [1,2,4]. As células satélites são células precursoras miogênicas (células tronco) que se encontram em estado quiescente na fibra muscular normal entre a lâmina basal e o sarcolema e, sob ativação, entram no ciclo celular, dividem, diferenciam e se fundem com fibras musculares para reparar regiões danificadas [5,6].

As células satélites ativadas aumentam a expressão da *myoD* e *myf5*, que fazem parte de uma superfamília de fatores de transcrição hélice-alça-hélice (*helix-loop-helix*) denominados fatores regulatórios miogênicos (MRFs) [7,8]. A *myoD* é expressa 12 horas após lesão [9], e seu pico de expressão ocorre no terceiro dia após a lesão muscular [10]. Posteriormente, ocorre um aumento de expressão dos MRFs secundários, miogenina e MRF4, que induzem a diferenciação dos mioblastos em miócitos [4], com objetivo de restabelecer a estrutura e função do tecido muscular. Portanto, *myoD* e miogenina desempenham um importante papel na regeneração do músculo esquelético.

O desenvolvimento de novos vasos sanguíneos (angiogênese) desempenha um importante papel para uma regeneração muscular bem-sucedida [11]. Este processo é regulado pelo fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), o qual exerce múltiplos efeitos sobre o endotélio vascular, incluindo a proliferação, migração e adesão das células endoteliais, rápida indução da permeabilidade microvascular e subsequentes conexões entre novos segmentos vasculares com a circulação pré-existente [12-14]. Desta forma, o VEGF é considerado um excelente biomarcador angiogênico, uma vez que sua expressão está relacionada com a recuperação do músculo esquelético.

A regeneração do músculo esquelético é regulada por fatores de crescimento, tais como, fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1), fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento do hepatócito (HGF), fator de crescimento epidermal (EGF) e fator de transformação do crescimento- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) [4,6]. O TGF- $\beta$  é uma citocina

multifuncional, produzida por fibroblastos, células epiteliais e macrófagos no sítio da lesão. Esta citocina estimula a proliferação e a síntese de colágeno e fibronectina, desempenhando um papel crucial na formação de fibrose em várias doenças [15]. A expressão elevada de TGF- $\beta$  no músculo esquelético poder ser prejudicial para a regeneração do tecido muscular, visto que o mesmo está associado à formação de um tecido cicatricial fibroso não funcional e à inibição da diferenciação e fusão de mioblastos [15,16]. Assim, o uso de abordagens terapêuticas que possuam dupla ação, ou seja, capazes de reduzir a formação de tecido fibroso e favorecer a regeneração muscular, podem ser úteis na reabilitação da função muscular.

A terapia laser de baixa intensidade (*Low-level laser Therapy, LLLT*) é considerada uma técnica segura e eficaz para o tratamento de uma variedade de doenças e lesões teciduais [17,18]. Resultados positivos têm sido relatado com o uso da LLLT em diversos modelos experimentais de lesão e regeneração do tecido músculo esquelético [19-22]. Esta modalidade terapêutica é capaz de induzir a expressão de proteínas reguladoras do ciclo celular e conseqüentemente acarretar na ativação das células satélites [19,20], promover a angiogênese [23,24] estimular formação de miotubos [25,26], aumentar o número de fibras em regeneração e da densidade e atividade mitocondrial [25-27] além de melhorar a organização das fibras musculares regeneradas [28].

Ainda que o conhecimento sobre os mecanismos moleculares e biológicos da LLLT esteja em ascensão, são necessários mais estudos que determinem quais vias de sinalização são acionadas pela LLLT durante a regeneração muscular, elucidando seus efeitos e otimizando seu uso durante a reabilitação do músculo lesado. Neste contexto, o presente estudo teve o objetivo de avaliar o efeito da LLLT (808 nm) na regeneração do músculo esquelético, avaliando marcadores moleculares envolvidos na regeneração e na fibrose muscular produzidos neste processo.

## METODOLOGIA

### Grupos experimentais

Foram utilizados 60 ratos adultos Wistar (*Rattus norvegicus*) com massa corpórea média de 300 g, obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos. Os animais permaneceram em gaiolas apropriadas de polietileno padrão, em condições ambientais controladas (ciclo claro/escuro de 12/12 horas, temperatura na faixa de 22°-27°C e ambiente higienizado), recebendo ração própria comum e água *ad libitum*. Os experimentos foram conduzidos seguindo as recomendações éticas do Guide for Care and Use of Laboratory Animals (National Research Council, 1996) e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFSCar CEEA/UFSCar (Parecer 006/06).

Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos (n=20 por grupo):

(BC) *Basal control* - controle basal (normal)- músculo TA normal

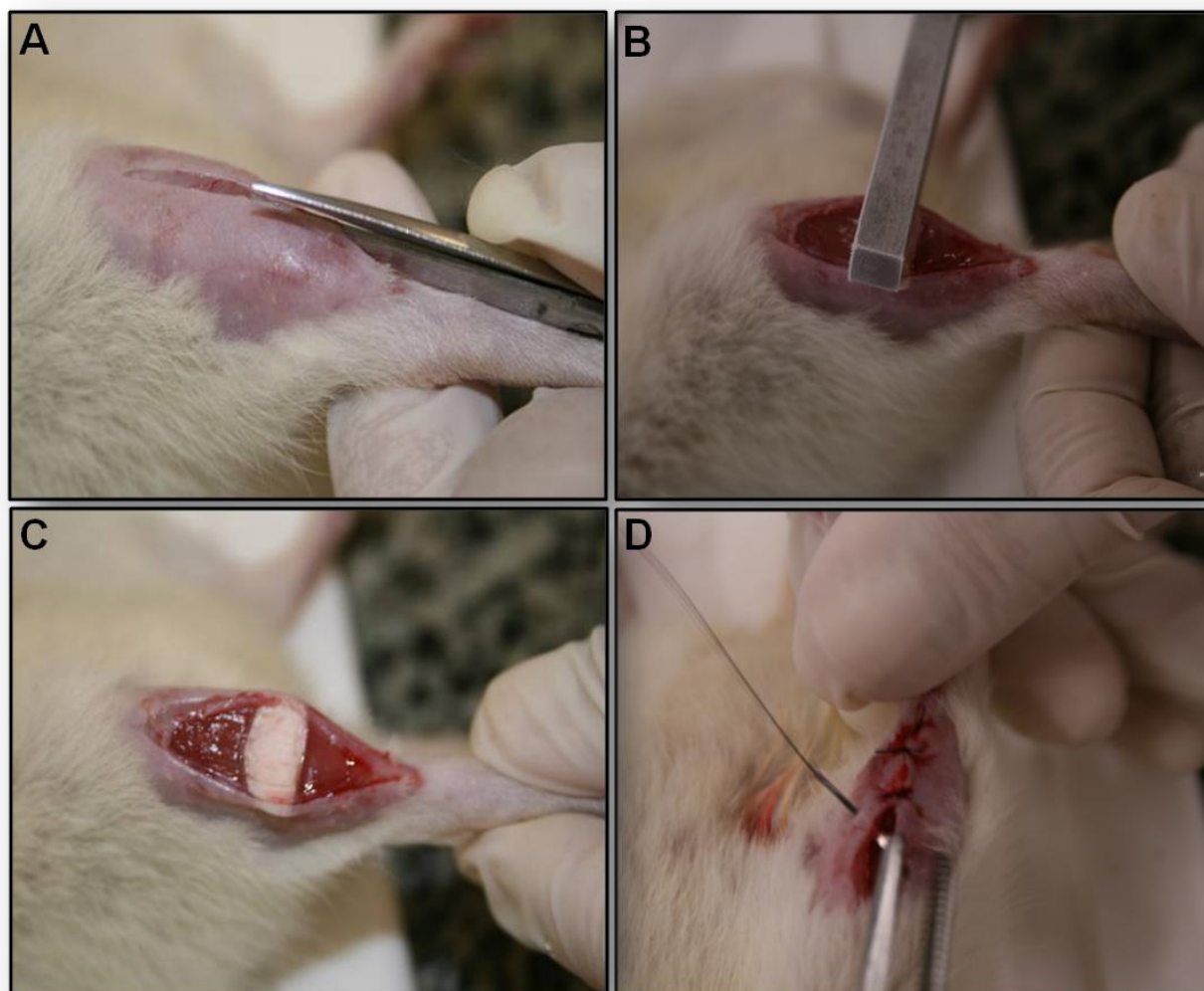
(IC) *Injury control* - músculo TA lesado sem tratamento;

(IRI) *Injured TA + Infrared irradiation* - músculo TA lesado e tratado com laser infravermelho.

### Procedimento Cirúrgico (Criolesão)

Os animais foram previamente pesados e submetidos à anestesia com uma solução contendo ketamina (95mg/kg- Dopalen; Vetbrands; São Paulo; Brazil) e xilazina (12mg/kg- Anasedan; Vetbrands; São Paulo; Brazil). Após anestesia, a pele que recobre o músculo TA direito foi tricotomizada e limpa. Após, uma incisão transversal (aproximadamente 1 cm) foi realizada na pele que recobre o músculo TA, com afastamento da fáscia na região correspondente ao ventre muscular.

A lesão tecidual foi induzida utilizando-se um bastão de ferro com 6 mm de largura e 30 mm de comprimento, previamente imerso em nitrogênio líquido (10s) e pressionado transversalmente contra a porção central do ventre muscular por 10 s (Figura 1). Este procedimento foi repetido 2 vezes consecutivo, com intervalo de 30 s e em seguida a pele foi suturada (Fio Náilon 3-0 – Shalon Ltda). Este método gera uma lesão homogênea, sendo previamente testada e reproduzida em diferentes unidades experimentais [29].

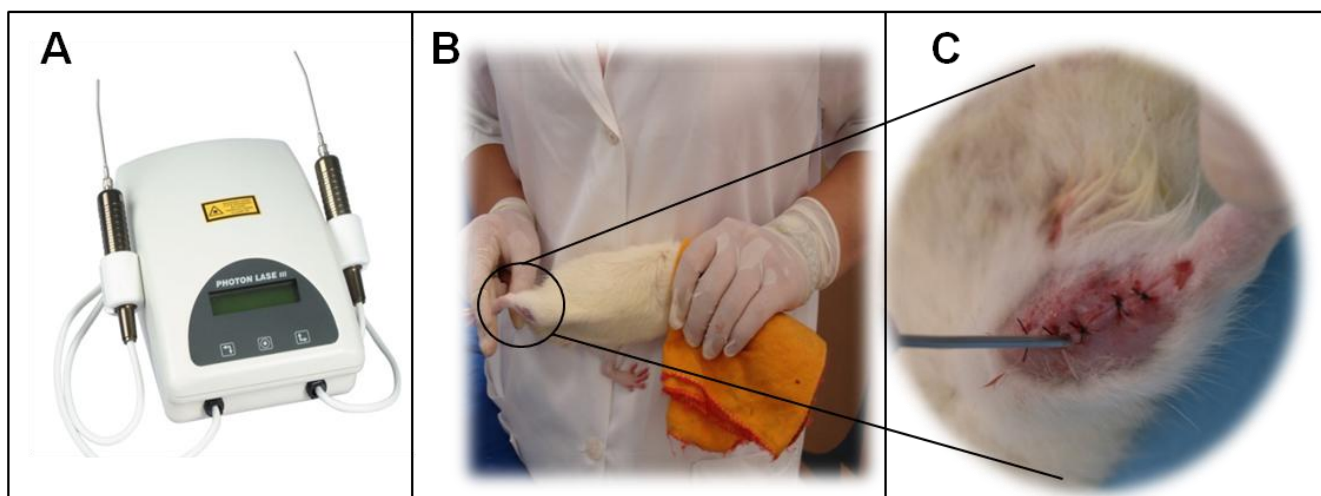


**Figura 1: Esquema ilustrativo do modelo de criolesão realizado no ventre do músculo Tibial Anterior (TA) direito. (A) Incisão transversal e exposição do músculo TA direito; (B e C) Indução da criolesão; (D) Sutura após procedimento cirúrgico.**



## Protocolo LLLT

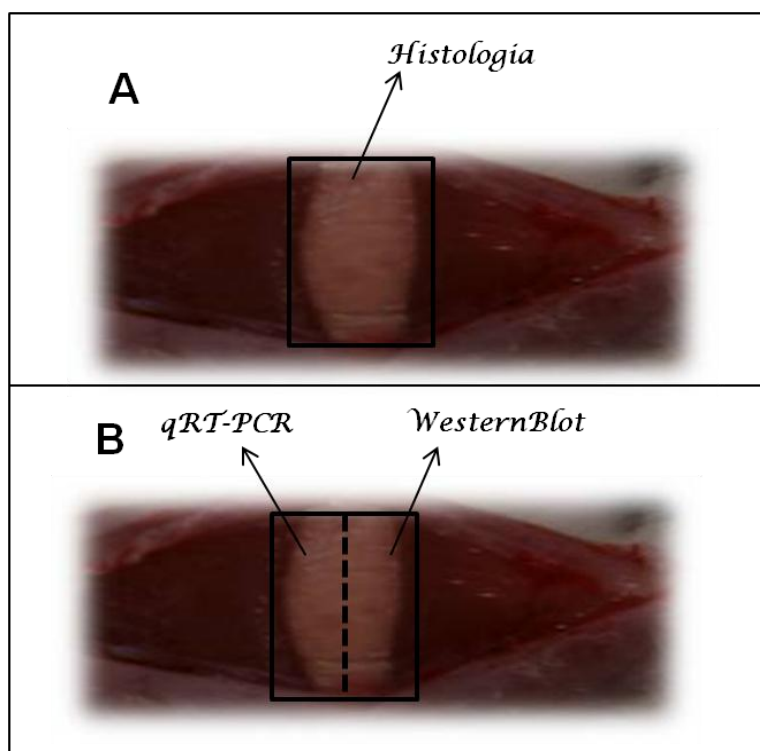
A irradiação foi realizada utilizando uma unidade de laser de baixa intensidade (Photon laser II, DMC<sup>®</sup> equipamentos Ltda, SP, São Carlos, Brasil) com as seguintes características: semicondutor Diodo de Arsenieto de Gálio-Alumínio (GaAlAs), comprimento de onda de 808 nm, potência óptica de saída de 30 mW, tempo de irradiação de 47 s, área da secção transversal do feixe de 0.00785 cm<sup>2</sup>, dose de 180 J/cm<sup>2</sup>, energia total de 1.4 J, irradiância 3.8 mW/cm<sup>2</sup> e emissão em modo contínuo. O aparelho foi calibrado (Masterfield, Filter Coherent, Santa Clara, CA) antes e após os procedimentos experimentais, pelo Centro de Pesquisa em Óptica e Fotônica (Cepof) do Instituto de Física de São Carlos (IFSC), a fim de se obter uma alta confiabilidade na intensidade efetiva da emissão laser. As regiões lesadas receberam irradiação local (1 ponto) e em contato, por quatro dias consecutivos, iniciando o tratamento imediatamente após a indução da criolesão (Figura 2).



**Figura 2: Esquema ilustrativo da aplicação da LLLT.** (A) Photon laser II, DMC<sup>®</sup> equipamentos Ltda; (B) Técnica de aplicação; (C) Local de irradiação - pontual com contato.

### Retirada e Armazenamento das amostras

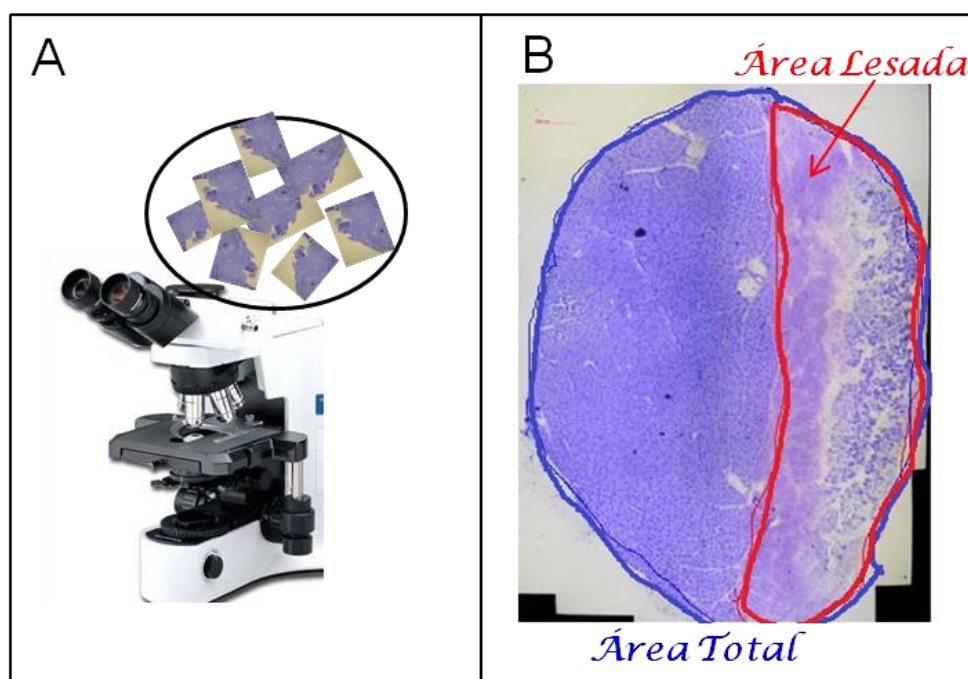
Todos os músculos TA direito foram retirados com os ratos anestesiados, sendo devidamente pesados, e em seguida submetidos à eutanásia com overdose de anestésico. Na sequência, dez animais de cada grupo foram usados para análise histológica e os outros dez para análise de western blot e qRT-PCR. Para análise histológica, os músculos foram imediatamente congelados em isopentano pré congelado em nitrogênio líquido e armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Para as demais análises, a porção central do ventre muscular foi dividida em duas partes iguais, sendo o fragmento proximal utilizado para análise de RNAm e o distal para expressão protéica, conservadas em  $-80^{\circ}\text{C}$  (Figura 3).



**Figura 3: Esquema ilustrativo da divisão e armazenamento do músculo Tibial Anterior direito.** (A) Dez músculos para análise histológica (morfometria); (B) Dez músculos subdivididos: fragmento proximal para análise de qRT-PCR e fragmento distal para análise de western blot.

## Área de lesão muscular

Foram obtidos cortes histológicos transversais e seriados (uma seção de 10  $\mu\text{m}$  a cada 100 $\mu\text{m}$ ) em micrótomo criostato (Microm HE 505, Jena, Alemanha), ao longo do ventre do músculo TA. As lâminas com os cortes histológicos foram coradas com azul de toluidina e visualizadas por meio de microscopia óptica (Axiolab, Carl Zeiss, Jena, Alemanha). Para tal, fotos da secção transversal dos músculos foram obtidos e a reconstrução da área de secção transversal total foi realizada (Figura 4). Assim, foi possível identificar e medir as áreas intactas e lesadas de cada músculo e mensurá-las utilizando um software de morfometria (Axiovision 3.0.6 SP4, Carl Zeiss, Jena, Alemanha). Foi utilizado o procedimento duplo-cego para a escolha dos cortes dos músculos lesados a serem avaliados, bem como para a mensuração das áreas intactas e lesadas de cada músculo.



**Figura 4: Esquema ilustrativo da análise morfométrica.** (A) Captura de imagens de cortes histológicos transversais do ventre do músculo Tibial Anterior; (B) Mosaico da secção transversal do músculo tibial anterior, exemplificando a área total e área lesada.

### **Análise da expressão protéica por wertern blot**

Da região correspondente ao fragmento distal da lesão, as amostras foram pulverizadas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em tampão de lise TX-100 (1% Triton X-100, 10% glicerol, 135mM NaCl, 20mM Tris pH 8.0) acrescido de inibidores de proteases (1mg/ml pepstatina A, 100mM PMSF). Em seguida, as amostras foram centrifugadas à 14000 g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi coletado, e a concentração de proteínas foi quantificada pelo método pelo método de BCA<sup>TM</sup> Protein Assays (Pierce, Rockford, IL). Amostras de 25 µg de proteína foram acrescidas de tampão de amostra (2% SDS, 60mM Tris pH 6.8, 5% de mercaptoetanol, e 0,01% de azul de bromofenol) e submetidas à eletroforese em um sistema SDS-PAGE, gel 10% de poli(acrilamida) (1.5M Tris-HCl, 10% SDS, 30% bis-acrilamida, 10% de persulfato de amônia e TEMED). Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Bio-Rad) em aparelho semi-dry transfer (Bio-Rad). As membranas foram incubadas em solução de bloqueio 5% de leite desnatado em tampão TBST (50 mM de tampão Tris, pH 8,0, 100mM NaCl, 1% Tween 20) por 1 h à temperatura ambiente e em seguida, foram lavadas em TBST durante 30 min e incubadas com o anticorpo primário contra as proteínas de interesse por 18 h, a 4 °C: colágeno I (rabbit policlonal, 1:1000, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). Posteriormente, as membranas foram lavadas novamente com TBST e incubadas em solução contendo anticorpo secundário conjugado a peroxidase (HRP goat anti-rabbit policlonal, 1:2500, Sigma Aldrich, MO, USA) à temperatura ambiente por 1 h, em seguida, foram incubadas com substrato quimioluminescente Super Signal Detection Kit (Pierce, Rockford, IL, USA) e expostas e fotografadas utilizando o sistema Syngene GBox Gel Document System (Syngene, Frederick, MD). A expressão da proteína foi comparada por densitometria de gel, utilizando-se o programa de domínio público “Image J” (Wayne Rasband, National Institutes of Mental Health, NIH, USA). Os resultados foram representados pela média de 3 testes por grupo.

### **Análise da expressão gênica - PCR (*Polimerase Chain Reaction*) em tempo real**

O RNA total foi extraído utilizando-se o reagente de RNA TRIzol® de acordo com as especificações do fabricante (Invitrogen Life Science, Carlsbad, CA). Para a quantificação do RNA foi utilizado espectrofotometro nos comprimentos de onda de 260 nm (correspondente ao pico de absorção de RNA) e 280 nm (correspondente ao pico de absorção de proteínas). Foi

realizado também, eletroforese em gel de 1% de agarose com amostras (1 µl) preparadas pela adição de tampão de amostra (63 µL de água nanopura, 81 µL de formaldeído, 48 µL de glicerol – azul de bromofenol, 48 µL de MOPS 10 X, 0,5 µL de brometo de etídeo). Após a eletroforese, o aparecimento de bandas foi verificado por exposição do gel à luz ultravioleta.

Os níveis de transcritos de myoD, miogenina, VEGF e TGF-β foram determinados por PCR em tempo real (qRT-PCR), utilizando termociclador Step One Plus (Applied Biosystems StepOne™, Foster City, CA) com o kit SuperScript™ III Platinum® SYBR® Green One-Step qRT-PCR (Invitrogen Life Science, Carlsbad, CA) que contém SYBR® Green I com fluoróforo. O kit realiza a síntese do cDNA e a amplificação da sequência de interesse ao mesmo tempo e foi utilizado de acordo com as especificações do fabricante.

A quantificação da expressão gênica foi realizada pelo método 2-ΔΔCT, usando o gene housekeeping gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH). Esse gene foi escolhido após análise pelo software genorm (<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm>) de 5 genes housekeeping (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase ; tirosina 3-monooxigenase/triptofano 5-monooxigenase; β-2 microglobulina; hipozantina guanina fosforibosil tranferase 1 e ubiquitina C). Na tabela 1, encontram-se as sequências dos primers e condições de cada reação.

**Tabela 1: Sequência dos primers usados na reação de real-time PCR.**

<i>Gene</i>	<i>Primer</i>	<i>Annealing</i>
<b>MyoD</b>	F: 5'- TAC GAC GCC GCC TAC TAC AGT G -3' R: 5'- GCA TCG CTT GAG GAT GTC TCC -3'	60.1 °C
<b>Myogenina</b>	F: 5'- AGG AAG TCT GTG TCT GTG GAC C -3' R: 5'- TGT ACT GGA TGG CAC TGC G-3'	56.8 °C
<b>VEGF</b>	F: 5'- TGA GAC CCT GGT GGA CAT CTT C -3' R: 5'- TCC TAT GTG CTG GCT TTG GTG-3'	56.9 °C
<b>TGF-β</b>	F: 5'- CCT ACA TTT GGA GCC TGG ACA C -3' R: 5'- CAC GAT CAT GTT GGA CAA CTG C -3'	56.7 °C
<b>GAPDH</b>	F: 5'-ATG ATT CTA CCC ACG GCA AG-3' R: 5'-CTG GAA GATGGT GAT GGG TT-3'	60,0°C

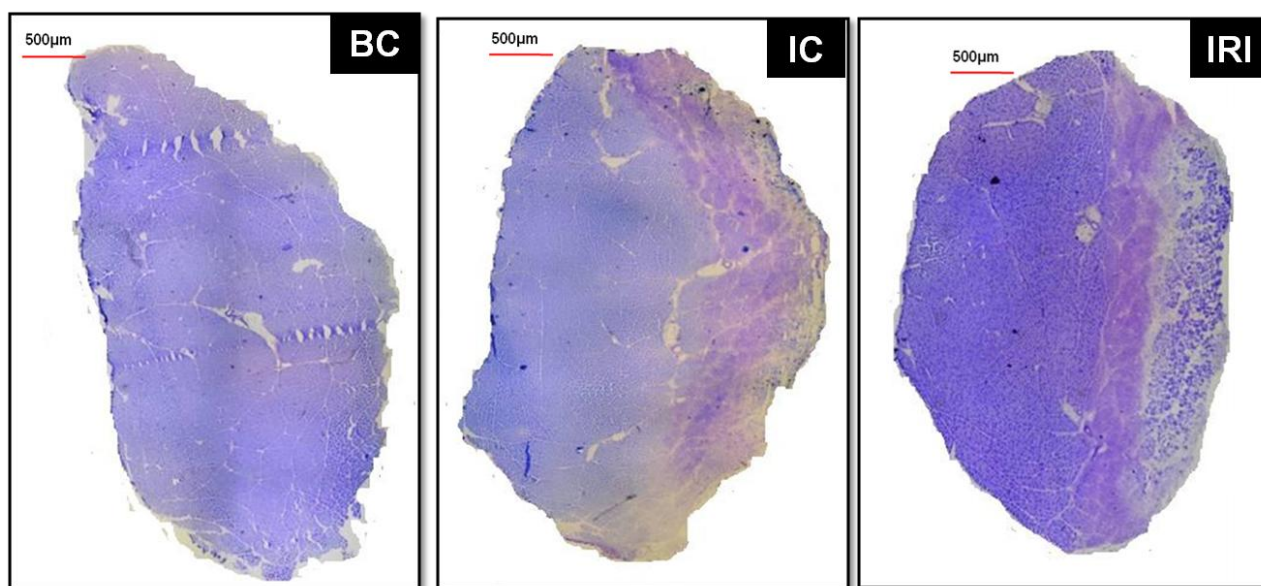
### **Análise Estatística**

Os dados foram submetidos aos testes de Levene e Shapiro-Wilk para avaliar a homogeneidade e normalidade das amostras, respectivamente. Comparações entre os grupos experimentais foram feitas pela análise de variância utilizando ANOVA one-way, seguido pelo pos-teste de Tukey para comparação individual entre os grupos. Os dados expressam a média±erro padrão da média. Foram considerados significantes valores de  $p < 0.05$ .

## RESULTADOS

### Peso do TA e área de lesão muscular

Quanto ao peso do músculo TA, não observamos diferença entre os grupos ( $p > 0.05$ ; Tabela 2). Vimos redução na área de lesão no grupo submetido à irradiação laser (IRI;  $p < 0.05$ ; Tabela 2; Figura 5) quando comparados ao grupo lesado (IC). A redução na área lesada mostra que o laser exerceu efeitos benéficos sobre a regeneração muscular.



**Figura 5: Mosaico da área de secção transversa total do músculo TA Músculo; TA Normal (BC); Músculo TA lesado (IC); Músculo TA lesado e submetido à irradiação com laser infravermelho (IRI); Observe que a área de lesão do grupo IRI apresenta-se reduzida com relação ao grupo IC (\* Tabela 2).**

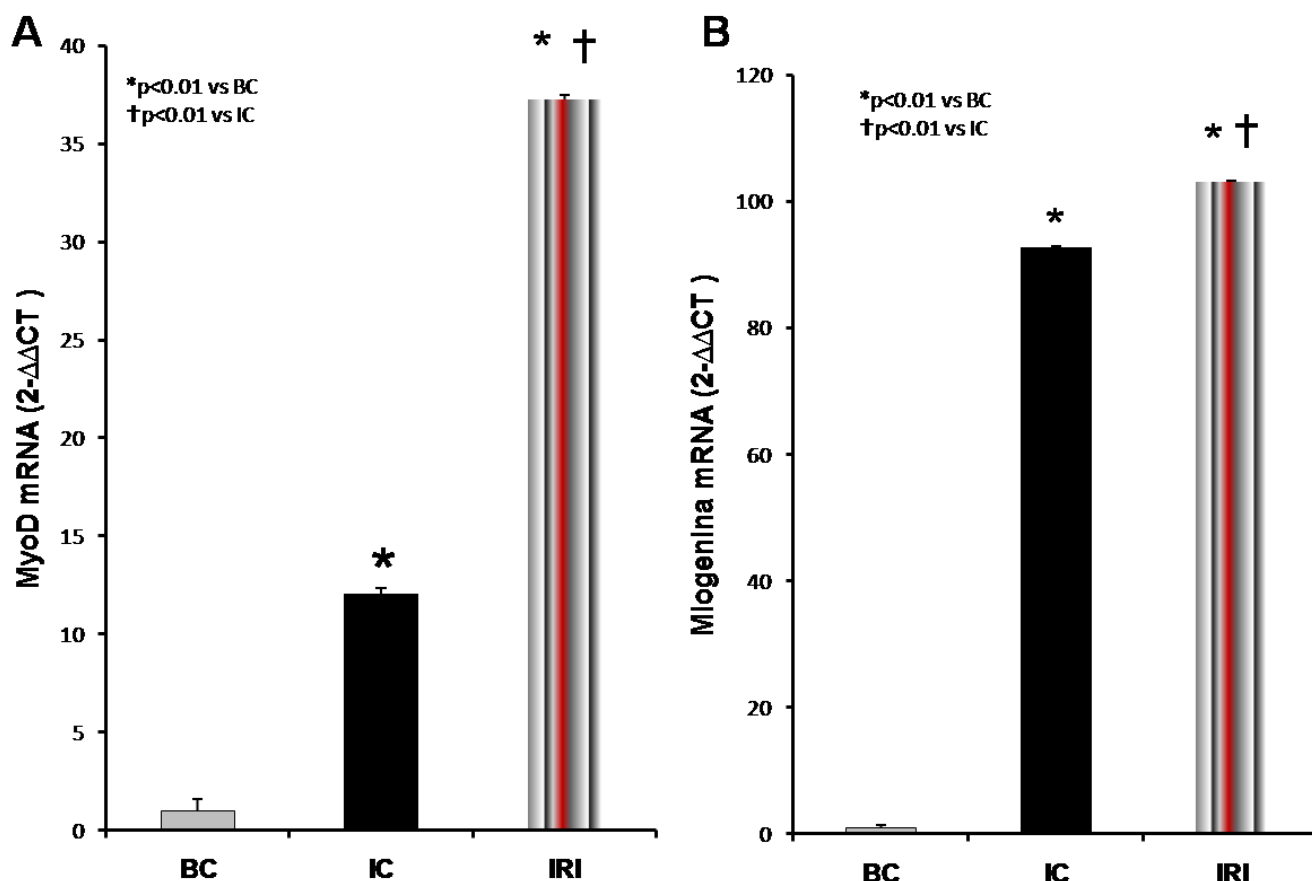
**Tabela 2: Peso do músculo, área lesada e não lesada do ventre do músculo TA**

Grupos	Peso do músculo TA (g)	Área Total ( $mm^2$ )	Área lesada ( $mm^2$ )	Área lesada (% área total)
BC	0.46±0.05	50.04±4.71	-	-
IC	0.44±0.06	53.62±5.35	20.99±2.33	38.94
IRI	0.45±0.06	53.31±1.42	15.98±1.44*	29.93*

Média dos dados ( $\pm$ SD). Músculo TA Normal (BC); Músculo TA lesado (IC); Músculo TA lesado e submetido à irradiação com laser infravermelho (IRI); \* $p < 0.05$ : comprada com a área de lesão da grupo IC.

**Expressão gênica de marcadores de regeneração: MyoD, miogenina e VEGF.**

Os níveis de expressão dos fatores regulatórios MyoD e miogenina aumentaram nos grupos criolesados (IC e IRI;  $p < 0.01$ ; Figura 6 A e B) em comparação ao grupo controle (BC). Os maiores níveis dos transcritos para MyoD e miogenina foram observados no grupo submetido à fotobioestimulação (IRI) ( $p < 0.01$  vs IC).

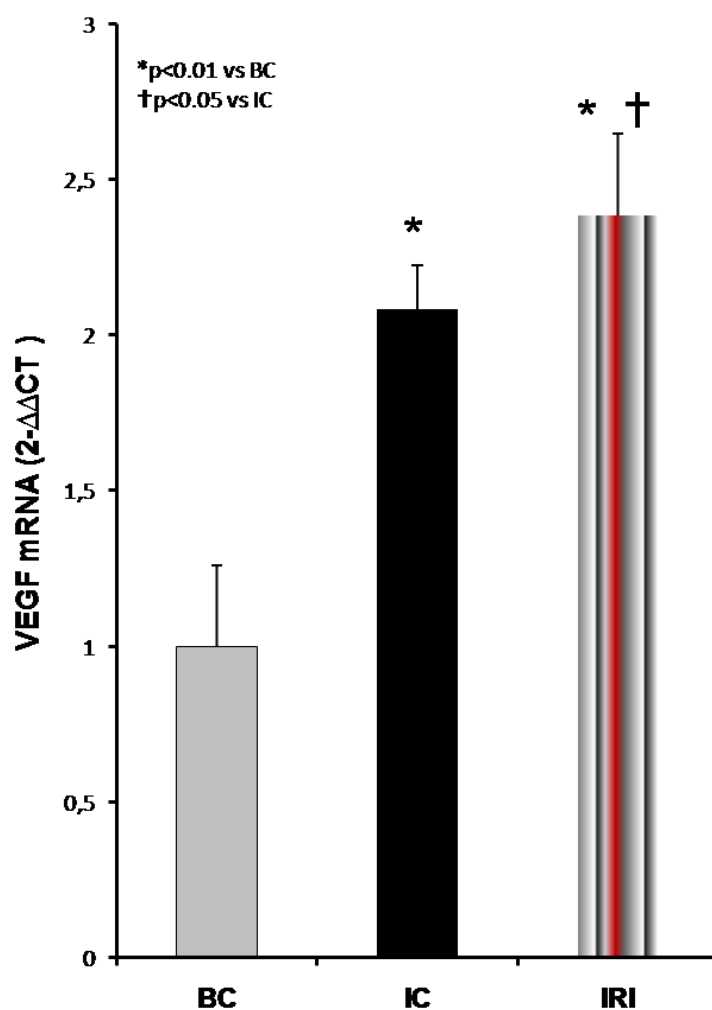


**Figura 6: Expressão gênica de marcadores de regeneração: myoD (A); miogenina (B);** Músculo TA Normal (BC); Músculo TA lesado (IC); Músculo TA lesado e tratado com laser infravermelho (IRI); Nota-se que a LLLT aumentou a expressão gênica de myoD e miogenina ( $\dagger p < 0.01$  vs IC).



A expressão gênica de VEGF apresentou o mesmo padrão observado do mRNA de myoD e miogenina. Os níveis de expressão do VEGF aumentaram nos grupos lesados (IC e IRI) comparado ao grupo controle (BC;  $p < 0.01$ ; Figura 7). A LLLT elevou a expressão do mRNA do VEGF ( $p < 0.05$  vs IC) acima dos níveis do grupo não irradiado.

O aumento dos transcritos para MyoD, miogenina e VEGF sugerem que a irradiação laser infravermelha favorece o processo de regeneração muscular.

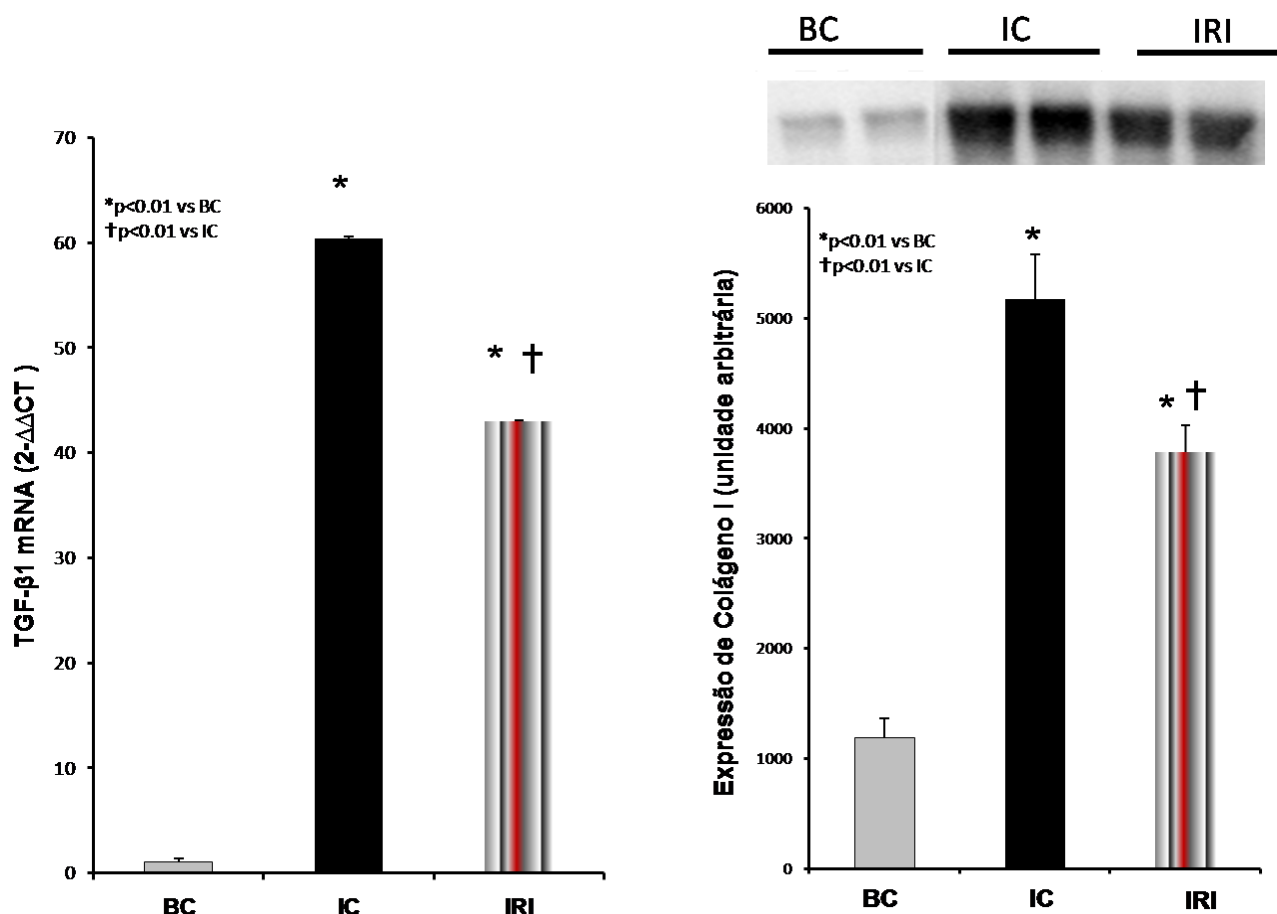


**Figura 7: Expressão gênica VEGF.** Músculo TA Normal (BC); Músculo TA lesado (IC); Músculo TA lesado e tratado com laser infravermelho (IRI); Nota-se que a LLLT aumentou a expressão gênica de VEGF († $p < 0.05$  vs IC).

### Expressão de marcadores cicatriciais: TGF- $\beta$ e colágeno I

A expressão gênica de TGF- $\beta$  aumentou nos grupos lesados quando (IC e IRI) quando comparados ao grupo controle ( $p < 0.01$ ; Figura 8A). A LLLT reduziu os níveis de mRNA de TGF- $\beta$  no sítio da lesão muscular ( $p < 0.01$  vs IC).

Com base no fato de que o TGF- $\beta$  é um importante mediador da produção de colágeno por fibroblastos, analisamos também a síntese de colágeno neste modelo. A expressão de colágeno I no tecido muscular está elevada após criolesão (IC e IRI) quando comparados ao grupo não lesado (BC;  $p < 0.05$ ; Figura 9). A LLLT reduziu a expressão do colágeno I no grupo IRI ( $p < 0.01$  vs IC). Observamos que a reduzida expressão de colágeno no grupo irradiado correlaciona-se positivamente com a baixa expressão de TGF- $\beta$ . Portanto, a LLLT favorece a regeneração muscular e ao mesmo tempo reduz a formação de tecido cicatricial no local da lesão neste modelo.



**Figura 8:** Expressão gênica de TGF- $\beta$  (A) e expressão protéica de colágeno tipo I (B). Músculo TA Normal (BC); Músculo TA lesado (IC); Músculo TA lesado e tratado com laser infravermelho (IRI); Nota-se que a LLLT diminuiu a expressão gênica de TGF- $\beta$  e a expressão protéica de colágeno I ( $\dagger p < 0.01$  vs IC).

## **DISCUSSÃO**

A regeneração muscular é a resposta desejada após uma lesão e/ou inflamação do tecido músculo esquelético. Neste período, ocorre a substituição de fibras musculares danificadas por novas fibras musculares, produzidas através da miogênese, com subsequente recuperação da função muscular. De forma contrária, ocorre um indesejável processo de formação de tecido cicatricial ou fibrose, composto principalmente por colágeno, que compete com as fibras musculares em regeneração no local da lesão. Fibrose causa perda da função muscular e prejudica a regeneração muscular. Como possibilidade de favorecer a regeneração muscular e prevenir a fibrose muscular, encontramos diferentes modalidades terapêuticas, entre elas a LLLT. Embora a maioria dos trabalhos que avaliaram a ação da LLLT na lesão muscular tenha demonstrado efeitos benéficos [19-22,30], pouco se conhece sobre como exatamente a irradiação eletromagnética laser é capaz de afetar os sistemas celulares envolvidos na regeneração muscular e quais são os mecanismos moleculares envolvidos neste processo. Assim, no presente estudo, utilizamos um modelo de criolesão em ratos, a fim de avaliar a influência da LLLT (808 nm) sobre marcadores moleculares envolvidos na regeneração e fibrose muscular.

Nossos resultados demonstraram que a LLLT otimizou o processo de regeneração muscular, pois aumentou a expressão gênica de myoD, miogenina e VEGF no local lesado, enquanto que ao mesmo tempo reduziu os níveis do mRNA de TGF- $\beta$  e a expressão protéica de colágeno I, bem como o tamanho da área de lesão. A LLLT, portanto, pode aumentar os marcadores de regeneração muscular e, simultaneamente, reduzir a formação de tecido cicatricial, favorecendo assim, o reparo tecidual de lesões musculares.

O processo de regeneração do músculo esquelético é iniciado por estímulos mecânicos ou químicos, que levam à ativação de células satélites quiescentes [31]. Embora não se saiba exatamente como é controlada a passagem destas células do estado quiescente para o estado ativado, alguns estudos propõem que a interrupção da integridade do sarcolema e da lâmina basal cause estresse mecânico, levando a posterior ativação das células satélites [32]. Muitos autores evidenciaram que a liberação de substâncias estimuladas durante a lesão, tais como, citocinas, HGF, prostaglandinas (PG), óxido nítrico (NO), possam estimular a ativação das células satélites [3,5]. É provável que exista uma complexa combinação desses e de outros eventos celulares, no qual a administração da LLLT possa ter um papel de estimulador adicional [33,34] sobre a expressão de fatores reguladores da miogênese (MRFs), como myoD e miogenina.

Estudos mostram que myoD e miogenina, são tradicionalmente considerados como marcadores do crescimento e hipertrofia muscular, pois podem modular a divisão de células satélites e conduzir a incorporação de novos mionúcleos em fibras musculares maduras. Estes fatores de transcrição são expressos no músculo esquelético adulto em resposta a diversos estímulos, tais como, sobrecarga, desnervação e alongamento, sugerindo que a myoD e miogenina apresentam um importante papel na regeneração dos músculos esqueléticos [35]. Em nosso modelo, observamos que a indução da criolesão gerou um aumento na expressão gênica dos fatores miogênicos, myoD e miogenina. No entanto, houve um efeito adicional significativo da LLLT sobre a expressão destes marcadores.

O laser de baixa intensidade é capaz de ativar células satélites quiescentes a entrarem no ciclo celular e iniciarem a sua proliferação [19,34,36]. Shefer et al. demonstraram que a LLLT (HeNe; 632.8 nm; 4.5 mW; 3 s) está envolvida na regulação de proteínas presentes na etapa inicial do processo de síntese protéica de mioblastos (via MAPK/ERK) [34]. Os mesmos autores observaram que a média do número de células por fibra foi triplicado no grupo irradiado com laser de baixa intensidade em comparação ao grupo controle [20]. O tratamento com o laser GaAlAs (830 nm, 60 mW, 36 J/cm<sup>2</sup>) foi capaz de amplificar o diâmetro da fibra muscular que sofreu atrofia [27]. Embora existam ainda muitas questões a serem esclarecidas sobre os mecanismos moleculares pelos quais a LLLT cause esses efeitos, sugerimos que neste modelo, o aumento dos fatores regulatórios miogênicos favoreceu a ativação das células satélites e a regeneração muscular.

É interessante notar que o aumento de myoD e miogenina estão correlacionados com os resultados obtidos na análise morfométrica, onde uma redução na área de lesão muscular nos grupos irradiados com laser foi evidenciada. Estes dados nos levou a inferir que a regulação dos fatores transcricionais envolvidos na ativação das células satélites pela LLLT, contribuiu para a formação de novas fibras musculares, reduzindo assim a área lesada.

A angiogênese, estimulada por VEGF, entre outros fatores, é também essencial para a formação de novas fibras musculares após dano muscular. Este evento é um requisito importante para a recuperação morfológica e funcional do músculo lesado [11], uma vez que restaura vasos sanguíneos danificados, promove o fluxo sanguíneo local e o restabelece o fornecimento de oxigênio e nutrientes para o tecido danificado.

Wagatsuma *et. al.*, mostraram que os níveis de mRNA do VEGF aumentam no terceiro dia após a criolesão do músculo gastrocnêmio de camundongos [14]. Da mesma forma, no presente estudo, a LLLT aumentou os níveis deste fator de crescimento pro-angiogênico. Estudos *in vivo* em diferentes modelos de regeneração têm evidenciado o efeito da LLLT na

indução da angiogênese [37,38]. Alguns autores postularam que a LLLT é capaz de aumentar a formação de novos capilares por meio da liberação de fatores de crescimento, como o VEGF [38,24]. Dados do nosso laboratório foram capazes de confirmar que a LLLT (660 e 780 nm; 40 mW; 30 e 40 J/cm<sup>2</sup>) induz angiogênese por aumentar a expressão do fator induzido por hipóxia (HIF-1 $\alpha$ ), seguido pelo aumento do mRNA de VEGF e formação de novos capilares na pele de ratos (Cury *et al.*, manuscrito submetido). Dessa forma, consideramos que a expressão aumentada de VEGF pós irradiação, vista neste modelo, também contribuiu para a recuperação do tecido muscular.

Cabe designar que a recuperação funcional do músculo lesado é dependente do equilíbrio entre regeneração e fibrose. A mensuração deste equilíbrio se dá através da intensidade da resposta inflamatória aguda, da ativação das células satélites, da expressão de diversos fatores de crescimento e citocinas, em especial o TGF- $\beta$ , presentes no local da lesão [3]. Assim, decidimos avaliar o possível efeito da LLLT sobre TGF- $\beta$  e a deposição de colágeno na região de reparo.

Encontramos que a LLLT reduziu a expressão de TGF- $\beta$ , minimizando a deposição de colágeno tipo I e a formação de tecido fibroso no músculo esquelético dos ratos. A expressão de TGF- $\beta$  desempenha um papel fundamental na formação de tecido cicatricial durante o reparo muscular. Este fator regula a produção de proteínas da matrix extracelular (MEC) e simultaneamente bloqueia sua degradação. Sabe-se também que o aumento nos níveis de TGF- $\beta$ , inibe a expressão de myoD e induz células miogênicas a se diferenciarem em miofibroblastos, capazes de produzir colágeno do tipo I, dificultando assim o a regeneração muscular [15]. Li *et al.* observaram que o TGF- $\beta$  estimula mioblastos da linhagem C2C12 a produzirem mais TGF- $\beta$  de forma autócrina, suprimindo a expressão de proteínas musculares e aumentando a produção de proteínas relacionadas à fibrose [16].

A formação de tecido fibroso prejudica a função contrátil do músculo esquelético, levando a contraturas patológicas e a dores musculares crônicas. Neste cenário, pode haver uma excessiva deposição de colágeno entre os capilares e as membranas das miofibras, que reduz suporte nutricional das fibras musculares. A inativação de TGF- $\beta$  reduz a formação de tecido fibroso e melhora as propriedades contráteis do músculo em reparação [39]. Com base nestas informações, nossos resultados sugerem que a LLLT teve um efeito biológico positivo, pois reduziu a expressão de TGF- $\beta$  com consequentemente redução do acúmulo de colágeno local, prevenindo a deposição de tecido fibroso e favorecendo a recuperação do músculo esquelético.

Os parâmetros ideais de tratamento que visem favorecer a regeneração e prevenir a fibrose muscular, ainda não se encontram completamente elucidados. O presente estudo não foi direcionado para esclarecer tais parâmetros, uma vez que existem muitas variáveis a serem analisadas. Entretanto, inferências podem ser feitas a partir de estudos prévios. Mesquita-Ferrari et al. trataram músculos de ratos com LLLT (AlGaIn, 660 nm, 20 mW, 0.3 cm<sup>2</sup>; 5 J/cm<sup>2</sup>), encontraram níveis mais baixos de expressão de TGF- $\beta$  e TNF- $\alpha$  após término do tratamento, o que auxiliou a prevenção da fibrose e melhoria da contratibilidade muscular [22]. Ramos et al. relataram que o laser AsGaAL, 810 nm, na densidade de energia de 107.14 J/cm<sup>2</sup> e energia total de 3 J, melhorou a funcional do músculo após lesão por estiramento muscular. Rizzi *et al.* detectaram reduzida expressão de colágeno após tratamento com laser (AsGa; 904 nm; 45 mW; 5J/cm<sup>2</sup>; 35s) e sugeriram que a inativação do fator transcricional NF- $\kappa$  $\beta$  pela LLLT, poderia ser o mecanismo que regulou a produção de colágeno [40]. Contudo, mais estudos se fazem necessários a fim de preconizar protocolos de tratamento cada vez mais eficientes em reabilitação muscular.

Com base nas condições experimentais deste trabalho e considerando seus resultado, verificamos que o laser infravermelho (808 nm), potência óptica de saída de 30 mW, densidade de energia de 180 J/cm<sup>2</sup> e energia total de 16 J por sessão, irradiância 3.8m W/cm<sup>2</sup> aplicados por 4 dias consecutivos, foi capaz de favorecer a regeneração do músculo esquelético por aumentar a expressão gênica de fatores regulatórios miogênicos (myoD e miogenina) e estimular a expressão gênica do VEGF após criolesão muscular em ratos. Além disso, esta terapia reduziu a expressão do mRNA de TGF- $\beta$ 1, e a expressão protéica de colágeno tipo I na área lesada, prevenindo a formação de fibrose no tecido muscular.

Embora exista a necessidade de investigações mais detalhadas sobre os mecanismos moleculares e celulares a fim de elucidar a influência da LLLT na regeneração muscular e desordens fibróticas em geral, relatamos aqui, que a LLLT caracterizada como um recurso terapêutico não invasivo, relativamente barato, e sem efeitos colaterais relatados, pode ser utilizado dentro da fisioterapia e demais áreas da saúde como uma modalidade terapêutica inovadora que favorece a reabilitação de lesão muscular e previne complicações indesejáveis decorrentes deste processo.

## **REFERÊNCIAS**

1. Huard J, Li Y, Fu FH (2002) Muscle injuries and repair: current trends in research. *The Journal of bone and joint surgery American volume* 84-A (5):822-832
2. Jarvinen TA, Jarvinen TL, Kaariainen M, Kalimo H, Jarvinen M (2005) Muscle injuries: biology and treatment. *The American journal of sports medicine* 33 (5):745-764.
3. Filippin LI, Cuevas MJ, Lima E, Marroni NP, Gonzalez-Gallego J, Xavier RM (2011) The role of nitric oxide during healing of trauma to the skeletal muscle. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al]* 60 (4):347-356.
4. Charge SB, Rudnicki MA (2004) Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiological reviews* 84 (1):209-238.
5. Ehrhardt J, Morgan J (2005) Regenerative capacity of skeletal muscle. *Current opinion in neurology* 18 (5):548-553
6. Le Grand F, Rudnicki MA (2007) Skeletal muscle satellite cells and adult myogenesis. *Current opinion in cell biology* 19 (6):628-633.
7. Sakuma K, Watanabe K, Sano M, Uramoto I, Sakamoto K, Totsuka T (1999) The adaptive response of MyoD family proteins in overloaded, regenerating and denervated rat muscles. *Biochimica et biophysica acta* 1428 (2-3):284-292
8. Shi X, Garry DJ (2006) Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. *Genes & development* 20 (13):1692-1708.
9. Rantanen J, Hurme T, Lukka R, Heino J, Kalimo H (1995) Satellite cell proliferation and the expression of myogenin and desmin in regenerating skeletal muscle: evidence for two different populations of satellite cells. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 72 (3):341-347
10. Warren GL, Hulderman T, Jensen N, McKinstry M, Mishra M, Luster MI, Simeonova PP (2002) Physiological role of tumor necrosis factor alpha in traumatic muscle injury. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 16 (12):1630-1632.
11. Deveci D, Marshall JM, Egginton S (2002) Chronic hypoxia induces prolonged angiogenesis in skeletal muscles of rat. *Experimental physiology* 87 (3):287-291
12. Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L (2006) VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nature reviews Molecular cell biology* 7 (5):359-371.
13. Botusan IR, Sunkari VG, Savu O, Catrina AI, Grunler J, Lindberg S, Pereira T, Yla-Herttuala S, Poellinger L, Brismar K, Catrina SB (2008) Stabilization of HIF-1alpha is critical

to improve wound healing in diabetic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (49):19426-19431.

14. Wagatsuma A (2007) Endogenous expression of angiogenesis-related factors in response to muscle injury. *Molecular and cellular biochemistry* 298 (1-2):151-159.

15. Kollias HD, McDermott JC (2008) Transforming growth factor-beta and myostatin signaling in skeletal muscle. *Journal of applied physiology* 104 (3):579-587.

16. Li Y, Foster W, Deasy BM, Chan Y, Prisk V, Tang Y, Cummins J, Huard J (2004) Transforming growth factor-beta1 induces the differentiation of myogenic cells into fibrotic cells in injured skeletal muscle: a key event in muscle fibrogenesis. *The American journal of pathology* 164 (3):1007-1019

17. Hamblin MR (2010) Introduction to experimental and clinical studies using low-level laser (light) therapy (LLLT). *Lasers in surgery and medicine* 42 (6):447-449.

18. Demidova-Rice TN, Salomatina EV, Yaroslavsky AN, Herman IM, Hamblin MR (2007) Low-level light stimulates excisional wound healing in mice. *Lasers in surgery and medicine* 39 (9):706-715.

19. Ben-Dov N, Shefer G, Irintchev A, Wernig A, Oron U, Halevy O (1999) Low-energy laser irradiation affects satellite cell proliferation and differentiation in vitro. *Biochimica et biophysica acta* 1448 (3):372-380

20. Shefer G, Barash I, Oron U, Halevy O (2003) Low-energy laser irradiation enhances de novo protein synthesis via its effects on translation-regulatory proteins in skeletal muscle myoblasts. *Biochimica et biophysica acta* 1593 (2-3):131-139

21. Renno AC, Toma RL, Feitosa SM, Fernandes K, Bossini PS, de Oliveira P, Parizotto N, Ribeiro DA (2011) Comparative effects of low-intensity pulsed ultrasound and low-level laser therapy on injured skeletal muscle. *Photomedicine and laser surgery* 29 (1):5-10.

22. Mesquita-Ferrari RA, Martins MD, Silva JA, Jr., da Silva TD, Piovesan RF, Pavesi VC, Bussadori SK, Fernandes KP (2011) Effects of low-level laser therapy on expression of TNF-alpha and TGF-beta in skeletal muscle during the repair process. *Lasers in medical science* 26 (3):335-340.

23. Iyomasa DM, Garavelo I, Iyomasa MM, Watanabe IS, Issa JP (2009) Ultrastructural analysis of the low level laser therapy effects on the lesioned anterior tibial muscle in the gerbil. *Micron* 40 (4):413-418.

24. Tuby H, Maltz L, Oron U (2006) Modulations of VEGF and iNOS in the rat heart by low level laser therapy are associated with cardioprotection and enhanced angiogenesis. *Lasers in surgery and medicine* 38 (7):682-688.



25. Amaral AC, Parizotto NA, Salvini TF (2001) Dose-dependency of low-energy HeNe laser effect in regeneration of skeletal muscle in mice. *Lasers in medical science* 16 (1):44-51
26. Silveira PC, Silva LA, Fraga DB, Freitas TP, Streck EL, Pinho R (2009) Evaluation of mitochondrial respiratory chain activity in muscle healing by low-level laser therapy. *Journal of photochemistry and photobiology B, Biology* 95 (2):89-92.
27. Nakano J, Kataoka H, Sakamoto J, Origuchi T, Okita M, Yoshimura T (2009) Low-level laser irradiation promotes the recovery of atrophied gastrocnemius skeletal muscle in rats. *Experimental physiology* 94 (9):1005-1015.
28. Cressoni MD, Dib Giusti HH, Casarotto RA, Anaruma CA (2008) The Effects of a 785-nm AlGaInP Laser on the Regeneration of Rat Anterior Tibialis Muscle After Surgically-Induced Injury. *Photomedicine and laser surgery*.
29. Miyabara EH, Martin JL, Griffin TM, Moriscot AS, Mestril R (2006) Overexpression of inducible 70-kDa heat shock protein in mouse attenuates skeletal muscle damage induced by cryolesioning. *American journal of physiology Cell physiology* 290 (4):C1128-1138.
30. Servetto N, Cremonuzzi D, Simes JC, Moya M, Soriano F, Palma JA, Campana VR (2010) Evaluation of inflammatory biomarkers associated with oxidative stress and histological assessment of low-level laser therapy in experimental myopathy. *Lasers in surgery and medicine* 42 (6):577-583.
31. Holterman CE, Rudnicki MA (2005) Molecular regulation of satellite cell function. *Seminars in cell & developmental biology* 16 (4-5):575-584.
32. Hurme T, Kalimo H (1992) Activation of myogenic precursor cells after muscle injury. *Medicine and science in sports and exercise* 24 (2):197-205
33. Shefer G, Oron U, Irintchev A, Wernig A, Halevy O (2001) Skeletal muscle cell activation by low-energy laser irradiation: a role for the MAPK/ERK pathway. *Journal of cellular physiology* 187 (1):73-80.
34. Shefer G, Partridge TA, Heslop L, Gross JG, Oron U, Halevy O (2002) Low-energy laser irradiation promotes the survival and cell cycle entry of skeletal muscle satellite cells. *Journal of cell science* 115 (Pt 7):1461-1469
35. Gomes AR, Soares AG, Peviani S, Nascimento RB, Moriscot AS, Salvini TF (2006) The effect of 30 minutes of passive stretch of the rat soleus muscle on the myogenic differentiation, myostatin, and atrogin-1 gene expressions. *Archives of physical medicine and rehabilitation* 87 (2):241-246.
36. Oron U (2006) Photoengineering of tissue repair in skeletal and cardiac muscles. *Photomedicine and laser surgery* 24 (2):111-120.

37. Bibikova A, Belkin V, Oron U (1994) Enhancement of angiogenesis in regenerating gastrocnemius muscle of the toad (*Bufo viridis*) by low-energy laser irradiation. *Anatomy and embryology* 190 (6):597-602
38. Kipshidze N, Nikolaychik V, Keelan MH, Shankar LR, Khanna A, Kornowski R, Leon M, Moses J (2001) Low-power helium: neon laser irradiation enhances production of vascular endothelial growth factor and promotes growth of endothelial cells in vitro. *Lasers in surgery and medicine* 28 (4):355-364.
39. Fukushima K, Badlani N, Usas A, Riano F, Fu F, Huard J (2001) The use of an antifibrosis agent to improve muscle recovery after laceration. *The American journal of sports medicine* 29 (4):394-402
40. Rizzi CF, Mauriz JL, Freitas Correa DS, Moreira AJ, Zettler CG, Filippin LI, Marroni NP, Gonzalez-Gallego J (2006) Effects of low-level laser therapy (LLLT) on the nuclear factor (NF)-kappaB signaling pathway in traumatized muscle. *Lasers in surgery and medicine* 38 (7):704-713.



## *Considerações finais*

Enfatizando as condições experimentais específicas dessa tese e considerando seus resultados, julgamos válidas as seguintes conclusões:

- O modelo de criolesão causou mudanças morfológicas no tecido muscular caracterizadas por alterações na arquitetura muscular, edema intercelular, presença de células inflamatórias associada à alta concentração de lisossomos considerado como prova de necrose tecidual. A análise morfométrica permitiu verificar que a LLLT reduziu a área de lesão muscular.
- A LLLT atenuou o estresse oxidativo e nitrativo no músculo esquelético após lesão, diminuindo a produção de NO, peroxidação lipídica e expressão protéica de nitrotirosina, provavelmente devido a redução na expressão protéica de iNOS e aumento da expressão gênica de SOD. Além disso, modulou a resposta inflamatória, reduzindo a expressão gênica de NF- $\kappa$ B, bem como a produção de TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$  e expressão gênica de COX-2 da área lesada.
- A LLLT favoreceu a regeneração muscular, reduzindo a porcentagem de área lesada após criolesão, aumentando a expressão do mRNA dos fatores transcricionais Myod e miogenina, e de VEGF. Observamos também que a LLLT preveniu a fibrose tecidual neste modelo, devido a reduzida expressão do mRNA de TGF- $\beta$  e da deposição de colágeno.

Nossos dados confirmam que a LLLT reduz a inflamação e favorece a regeneração muscular, por biomodular a expressão e/ou atividade de diferentes marcadores biológicos. Contudo, persiste a necessidade de novos estudos utilizando diferentes parâmetros de irradiação e períodos de análise, a fim de elucidar os mecanismos de ação da irradiação eletromagnética laser sobre o processo de regeneração muscular. A descoberta destes mecanismos possibilitará preconizar protocolos de tratamento cada vez mais eficientes em reabilitação muscular.

## Referências Bibliográficas

ADAMS, V.; NEHRHOFF, B.; SPATE, U. et al. Induction of iNOS expression in skeletal muscle by IL-1beta and NFkappaB activation: an in vitro and in vivo study. **Cardiovasc Res**, v. 54, n. 1, p. 95-104, Apr 2002.

ALMEIDA-LOPES, L.; RIGAU, J.; ZÂNGARO, R.A.; GUIDULI-NETO, J.; JAEGER M.M.M. Comparison of the low level therapy effects on cultured gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and fluence. **Lasers Surg Med**, v. 29, p.179-184, 2001.

AMARAL, A. C.; PARIZOTTO, N. A.; SALVINI, T. F. Dose-dependency of low-energy HeNe laser effect in regeneration of skeletal muscle in mice. **Lasers Med Sci**, v. 16, n. 1, p. 44-51, 2001.

BEN-DOV, N.; SHEFER, G.; IRINTCHEV, A. et al. Low-energy laser irradiation affects satellite cell proliferation and differentiation in vitro. **Biochim Biophys Acta**, v. 1448, n. 3, p. 372-80, Jan 11 1999.

BIBIKOVA, A.; BELKIN, V.; ORON, U. Enhancement of angiogenesis in regenerating gastrocnemius muscle of the toad (*Bufo viridis*) by low-energy laser irradiation. **Anat Embryol (Berl)**, v. 190, n. 6, p. 597-602, Dec 1994.

BOTUSAN, I. R.; SUNKARI, V. G.; SAVU, O. et al. Stabilization of HIF-1alpha is critical to improve wound healing in diabetic mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 49, p. 19426-31, Dec 9 2008.

CHARGE, S. B.; RUDNICKI, M. A. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. **Physiol Rev**, v. 84, n. 1, p. 209-38, Jan 2004.

CRESSONI, M. D.; DIB GIUSTI, H. H.; CASAROTTO, R. A.; ANARUMA, C. A. The Effects of a 785-nm AlGaInP Laser on the Regeneration of Rat Anterior Tibialis Muscle After Surgically-Induced Injury. **Photomed Laser Surg**, Sep 18 2008.

DEMIDOVA-RICE, T.N.; SALOMATINA, E.V.; YAROSLAVSKY, A.N; et al. Low-level light stimulates excisional wound healing in mice. **Lasers Surg Med**, v.39. n9, p.706-715. 2007.

- DOURADO, D. M.; FAVERO, S.; BARANAUSKAS, V.; DA CRUZ-HOFLING, M. A. Effects of the Ga-As laser irradiation on myonecrosis caused by Bothrops Moojeni snake venom. **Lasers Surg Med**, v. 33, n. 5, p. 352-7, 2003.
- DURIGAN, J.L.; PEVIANI, S.M.; RUSSO, T.L., et al. Effects of alternagin-C from Bothrops alternatus on gene expression and activity of metalloproteinases in regenerating skeletal muscle. **Toxicon**, v.6, p.687-94, 2008.
- DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol Rev**, v. 82, n. 1, p. 47-95, Jan 2002.
- FILIPPIN, L. I.; CUEVAS, M. J.; LIMA, E. et al. Nitric oxide regulates the repair of injured skeletal muscle. **Nitric Oxide**, v. 24, n. 1, p. 43-9, Jan 1 2011a.
- \_\_\_\_\_. The role of nitric oxide during healing of trauma to the skeletal muscle. **Inflamm Res**, v. 60, n. 4, p. 347-56, Apr 2011b.
- FREITAS, L. S.; FREITAS, T. P.; SILVEIRA, P. C. et al. Effect of therapeutic pulsed ultrasound on parameters of oxidative stress in skeletal muscle after injury. **Cell Biol Int**, v. 31, n. 5, p. 482-8, May 2007.
- GIGO-BENATO, D.; RUSSO, T.L.; TANAKA, E. H.; ASSIS, L.; et al. .Effects of 660 and 780nm low-level laser therapy on neuromuscular recovery after crush injury in rat sciatic nerve. **Lasers Surg Med.**, v. 42, p. 673-682, 2010.
- HAMBLIN, MR. Introduction to Experimental and Clinical Studies Using Low-Level Laser (Light) Therapy (LLLT). **Lasers Surg Med.**, v.42, n.6, p.447-9. Aug 2010.
- HENSLEY, K.; ROBINSON, K. A.; GABBITA, S. P.; SALSMAN, S.; FLOYD, R. A. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. **Free Radic Biol Med**, v. 28, n. 10, p. 1456-62, May 15 2000.
- HUANG, Y-Y.; CHEN, A. C-H; CARROLL, J,D; HAMBLIN, M.R. Biphasic dose response in low-level light therapy. **Dose Response**, v.7, p. 358-383, 2009.
- HUARD, J.; LI, Y.; FU, F. H. Muscle injuries and repair: current trends in research. **J Bone Joint Surg Am**, v. 84-A, n. 5, p. 822-32, May 2002.

IYOMASA D.M.; GARAVELO I.; IYOMASA M.M.; WATANABE I.S.; ISSA, J.P. Ultrastructural analysis of the low level laser therapy effects on the lesioned anterior tibial muscle in the gerbil. **Micron**, v.40, n.4, p.413-418, 2009.

JARVINEN, T. A.; JARVINEN, T. L.; KAARIAINEN, M.; KALIMO, H.; JARVINEN, M. Muscle injuries: biology and treatment. **Am J Sports Med**, v. 33, n. 5, p. 745-64, May 2005.

JACKSON, M. J.; PYE, D.; PALOMERO, J. The production of reactive oxygen and nitrogen species by skeletal muscle. **J Appl Physiol**, v.102, n. 4, p.1664–1670, 2007.

KARU, T.; PYATIBRAT, L.; KALENDO, G. Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated in vitro. **J Photochem Photobiol B**, v. 27, n. 3, p. 219-23, Mar 1995.

LANGEN, R. C.; SCHOLS, A. M.; KELDERS, M. C.; WOUTERS, E. F.; JANSSEN-HEININGER, Y. M. Inflammatory cytokines inhibit myogenic differentiation through activation of nuclear factor-kappaB. **FASEB J**, v. 15, n. 7, p. 1169-80, May 2001.

LAPOINTE, B. M.; FREMONT, P.; COTE, C. H. Influence of nonsteroidal anti-inflammatory drug treatment duration and time of onset on recovery from exercise-induced muscle damage in rats. **Arch Phys Med Rehabil**, v. 84, n. 5, p. 651-5, May 2003.

LAKYOVA, L.; TOPORCER, T.; TOMECKOVA, V.; SABO, J.; RADONAK, J. Low-level laser therapy for protection against skeletal muscle damage after ischemia-reperfusion injury in rat hindlimbs. **Lasers Surg Med**, v. 42, n. 9, p. 665-72, Nov 2010.

LEAL JUNIOR, E. C.; LOPES-MARTINS, R. A.; DE ALMEIDA, P. et al. Effect of low-level laser therapy (GaAs 904 nm) in skeletal muscle fatigue and biochemical markers of muscle damage in rats. **Eur J Appl Physiol**, v. 108, n. 6, p. 1083-8, Apr 2010.

LI, Y.; CUMMINS, J.; HUARD, J. Muscle injury and repair. **Current Opinion in Orthopedics**, v. 12, p. 6, 2001.

LI, Y.; FOSTER, W.; DEASY, B. M. et al. Transforming growth factor-beta1 induces the differentiation of myogenic cells into fibrotic cells in injured skeletal muscle: a key event in muscle fibrogenesis. **Am J Pathol**, v. 164, n. 3, p. 1007-19, Mar 2004.

LIU, X. G.; ZHOU, Y. J.; LIU, T. C.; YUAN, J. Q. Effects of low-level laser irradiation on rat skeletal muscle injury after eccentric exercise. **Photomed Laser Surg**, v. 27, n. 6, p. 863-9, Dec 2009.

LOPES-MARTINS, R. A.; MARCOS, R. L.; LEONARDO, P. S. et al. Effect of low-level laser (Ga-Al-As 655 nm) on skeletal muscle fatigue induced by electrical stimulation in rats. **J Appl Physiol**, v. 101, n. 1, p. 283-8, Jul 2006.

MESQUITA-FERRARI, R. A.; MARTINS, M. D.; SILVA, J. A., JR. et al. Effects of low-level laser therapy on expression of TNF-alpha and TGF-beta in skeletal muscle during the repair process. **Lasers Med Sci**, v. 26, n. 3, p. 335-40, May 2011.

MESTER, E.; MESTER, A. F.; MESTER, A. The biomedical effects of laser application. **Lasers Surg Med**, v. 5, n. 1, p. 31-9, 1985.

MIYABARA, E. H.; MARTIN, J. L.; GRIFFIN, T. M.; MORISCOT, A. S.; MESTRIL, R. Overexpression of inducible 70-kDa heat shock protein in mouse attenuates skeletal muscle damage induced by cryolesioning. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 290, n. 4, p. C1128-38, Apr 2006.

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

OLIVEIRA, N. M. L. ; PARIZOTTO, N. A. ; SALVINI, Tânia de Fátima . GaAs (904 nm) laser radiation does not affect muscle regeneration in mouse skeletal muscle. **Lasers In Surgery And Medicine**, EUA, v. 25, p. 13-21, 1999

OLSSON, A. K.; DIMBERG, A.; KREUGER, J.; CLAESSION-WELSH, L. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 7, n. 5, p. 359-71, May 2006.

PRETEL, H.; LIZARELLI, R. F.; RAMALHO, L. T. Effect of low-level laser therapy on bone repair: histological study in rats. **Lasers Surg Med**, v. 39, n. 10, p. 788-96, Dec 2007.

PRISK, V.; HUARD, J. Muscle injuries and repair: the role of prostaglandins and inflammation. **Histol Histopathol**, v. 18, n. 4, p. 1243-56, Oct 2003.



PROSKE, U. AND ALLEN, T.J. Damage to skeletal muscle from eccentric exercise. **Exercise and Sport Science Reviews**, v.33, p.98-104, 2005.

RAMOS, L.; LEAL JUNIOR, E. C.; PALLOTTA, R. C. et al. Infrared (810 nm) Low-Level Laser Therapy in Experimental Model of Strain-Induced Skeletal Muscle Injury in Rats: Effects on Functional Outcomes. **Photochem Photobiol**, v. 88, n. 1, p. 154-160, Jan 2012.

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

RIZZI, C. F.; MAURIZ, J. L.; FREITAS CORREA, D. S. et al. Effects of low-level laser therapy (LLLT) on the nuclear factor (NF)-kappaB signaling pathway in traumatized muscle. **Lasers Surg Med**, v. 38, n. 7, p. 704-13, Aug 2006.

SALVINI, T. F.; MORINI, C. C.; PEREZ, A. S. E.; FERREIRA FILHO, P. The Effect of Cryotherapy and Treadmill exercise on the Mouse Soleus Muscle Damage. **Revista Brasileira de Fisioterapia** v. 2, p. 9, 1997.

SERVETTO, N.; CREMONEZZI, D.; SIMES, J. C. et al. Evaluation of inflammatory biomarkers associated with oxidative stress and histological assessment of low-level laser therapy in experimental myopathy. **Lasers Surg Med**, v. 42, n. 6, p. 577-83, Aug 2010.

SHEFER, G.; ORON, U.; IRINTCHEV, A.; WERNIG, A.; HALEVY, O. Skeletal muscle cell activation by low-energy laser irradiation: a role for the MAPK/ERK pathway. **J Cell Physiol**, v. 187, n. 1, p. 73-80, Apr 2001.

SHI, X.; GARRY, D. J. Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. **Genes Dev**, v. 20, n. 13, p. 1692-708, Jul 1 2006.

SILVEIRA, P. C.; SILVA, L. A.; FRAGA, D. B. et al. Evaluation of mitochondrial respiratory chain activity in muscle healing by low-level laser therapy. **J Photochem Photobiol B**, v. 95, n. 2, p. 89-92, May 4 2009.

SUSSAI, D.A.; CARVALHO, P.T.C; DOURADO, D.M. et al. Low level laser therapy attenuates creatine kinase levels and apoptosis during forced swimming in rats. **Lasers Med Sci**, v.25, p. 115-120, 2010.

TATSUMI, R.; SHEEHAN, S. M.; IWASAKI, H.; HATTORI, A.; ALLEN, R. E. Mechanical stretch induces activation of skeletal muscle satellite cells in vitro. **Exp Cell Res**, v. 267, n. 1, p. 107-14, Jul 1 2001.

TIDBALL, J. G. Inflammatory processes in muscle injury and repair. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 288, n. 2, p. R345-53, Feb 2005.

VENOJARVI, M.; KVIST, M.; ATALAY, M.; JOZSA, L.; KALIMO, H. Recovery from immobilisation: responses of fast-twitch muscle fibres to spontaneous and intensive exercise in rat calf muscles. **Pathophysiology**, v. 11, n. 1, p. 17-22, Jul 2004.

VLADIMIROV, Y. A.; OSIPOV, A. N.; KLEBANOV, G. I. Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation. **Biochemistry (Mosc)**, v. 69, n. 1, p. 81-90, Jan 2004.

WAGATSUMA, A. Endogenous expression of angiogenesis-related factors in response to muscle injury. **Mol Cell Biochem**, v. 298, n. 1-2, p. 151-9, Apr 2007.

WALT Dosage Recommendations; Dose table 780-860nm for Laser Therapy WALT 2010 - [www.walt.nu/dosage-recommendations.html](http://www.walt.nu/dosage-recommendations.html)

# Anexos

## - Confirmação de Submissão - Manuscrito I

 Lasers in Surgery and Medicine Edit Account | Instructions & Forms | Log Out | [Get Help Now](#) SCHOLARONE™ Manuscripts

[Main Menu](#) → [Author Dashboard](#) → Submission Confirmation

You are logged in as Ana Moretti

### Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *Lasers in Surgery & Medicine*.

Manuscript ID: LSM-12-0021


Title: Low-Level Laser Therapy (808-nm) Reduces Inflammatory Response and Oxidative Stress in Rat Tibialis Anterior Muscle After Cryolesion

Authors: Assis, Livia  
Moretti, Ana  
Abrahão, Thalita  
Cury, Vivian  
Souza, Heraldo  
Hamblin, Michael  
Parizotto, Nivaldo

Date Submitted: 02-Feb-2012

 [Print](#)  [Return to Dashboard](#)

ScholarOne Manuscripts™ v4.8.0 (patent #7,257,767 and #7,263,655). © ScholarOne, Inc., 2011. All Rights Reserved.  
ScholarOne Manuscripts is a trademark of ScholarOne, Inc. ScholarOne is a registered trademark of ScholarOne, Inc.

 [Follow ScholarOne on Twitter](#)

[Terms and Conditions of Use](#) - [ScholarOne Privacy Policy](#) - [Get Help Now](#)

**- Confirmação de Submissão - Manuscrito II**

**Lasers in Medical Science**

**Low-Level Laser Therapy (808-nm) Contributes to Muscle Regeneration and Prevents Fibrosis in Rat Tibialis Anterior Muscle After Cryolesion  
--Manuscript Draft--**

Manuscript Number:	LIMS-1234
Full Title:	Low-Level Laser Therapy (808-nm) Contributes to Muscle Regeneration and Prevents Fibrosis in Rat Tibialis Anterior Muscle After Cryolesion
Article Type:	Original Article
Keywords:	low-level laser therapy; photobiomodulation; muscle cryolesion; muscle regeneration; MyoD, myogenin, VEGF, TGF- $\beta$ 1, type I collagen.
Corresponding Author:	Ana Iochabel Soares Moretti, Ph.D. School of Medicine - Universidade de São Paulo São Paulo, São Paulo BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	School of Medicine - Universidade de São Paulo
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Livia Assis, Ph.D.
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Livia Assis, Ph.D.
	Ana Iochabel Soares Moretti, Ph.D.
	Thalita Bálamo Abrahão, Ph.D.
	Heraldo Possolo Souza, Ph.D.
	Michael R. Hamblin, Ph.D.
	Nivaldo Antonio Parizotto, Ph.D.

- Tabela normativa desenvolvida pela Associação Mundial de Terapia Laser (Walt 2010) e recomendada para reabilitação clínica de algumas condições inflamatórias



**Recommended treatment doses for Low Level Laser Therapy**

Laser class 3 B, 780 - 860nm GaAlAs Lasers. Continuous or pulsed, mean output: 5 - 500mW  
Irradiation times should range between 20 and 300 seconds

**Diagnoses**

<b>Tendinopathies</b>	<b>Points or cm2</b>	<b>Joules 780 - 820nm</b>	<b>Notes</b>
Carpal-tunnel	2-3	8	Minimum 4 Joules per point
Lateral epicondylitis	1-2	4	Maximum 100mW/cm2
Biceps humeri c.l.	1-2	6	
Supraspinatus	2-3	8	Minimum 4 Joules per point
Infraspinatus	2-3	8	Minimum 4 Joules per point
Trochanter major	2-4	8	
Patellartendon	2-3	8	
Tract. Iliotibialis	1-2	4	Maximum 100mW/cm2
Achilles tendon	2-3	8	Maximum 100mW/cm2
Plantar fasciitis	2-3	8	Minimum 4 Joules per point
<b>Arthritis</b>			
	<b>Points or cm2</b>	<b>Joules</b>	
Finger PIP or MCP	1-2	4	
Wrist	2-4	8	
Humeroradial joint	1-2	4	
Elbow	2-4	8	
Glenohumeral joint	2-4	8	Minimum 4 Joules per point
Acromioclavicular	1-2	4	
Temporomandibular	1-2	4	
Cervical spine	4-12	16	Minimum 4 Joules per point
Lumbar spine	4-8	16	Minimum 4 Joules per point
Hip	2-4	12	Minimum 6 Joules per point
Knee medial	3-6	12	Minimum 4 Joules per point
Ankle	2-4	8	

Daily treatment for 2 weeks or treatment every other day for 3-4 weeks is recommended  
 Irradiation should cover most of the pathological tissue in the tendon/synovia.  
 Start with energy dose in table, then reduce by 30% when inflammation is under control  
 Therapeutic dose windows typically range from +/- 50% of given values, and doses outside these windows are inappropriate and should not be considered as Low Level Laser Therapy.  
 Recommended doses are for white/caucasian skin types based on results from clinical trials or extrapolation of study results with similar pathology and ultrasonographic tissue measurements.

**Disclaimer**

The list may be subject to change at any time when more research trials are being published.  
 World Association of Laser Therapy is not responsible for the application of laser therapy in patients, which should be performed at the sole discretion and responsibility of the therapist.

*Revised April 2010*