

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DA BIOTECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE FISIOTERAPIA E
DEPARTAMENTO DE FISICA**

NATÁLIA CAMARGO RODRIGUES

**AÇÃO DA LASERTERAPIA DE BAIXA INTENSIDADE (830NM) NA
REGENERAÇÃO MUSCULAR DE RATOS IDOSOS**

SÃO CARLOS-SP, 2009

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DA BIOTECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE FISIOTERAPIA E
DEPARTAMENTO DE FISICA**

NATÁLIA CAMARGO RODRIGUES

**AÇÃO DA LASERTERAPIA DE BAIXA INTENSIDADE (830NM) NA
REGENERAÇÃO MUSCULAR DE RATOS IDOSOS**

Dissertação de mestrado apresentada á
Coordenação da Pós-Graduação em
Biotecnologia da Universidade Federal
de São Carlos – PPGBIOTEC/UFSCar
como parte dos requisitos para a
obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia.

Orientadores: Prof. Dr. Fernando M. Araújo-Moreira
Prof. Dr. Nivaldo A. Parizotto

SÃO CARLOS-SP, 2009

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

R696al

Rodrigues, Natália Camargo.

Ação da laserterapia de baixa intensidade (830nm) na regeneração muscular de ratos idosos / Natália Camargo Rodrigues. -- São Carlos : UFSCar, 2009.
53 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2009.

1. Biotecnologia. 2. Laserterapia. 3. Regeneração muscular. 4. Ratos idosos. 5. MyoD. 6. VEGF (Fator de Crescimento de Endotélio Vascular). I. Título.

CDD: 660.6 (20^a)

NATÁLIA CAMARGO RODRIGUES

Dissertação de Mestrado submetida
à Coordenação do Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia,
da Universidade Federal de São
Carlos, como requisito parcial para
a obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia

Aprovado em: 13/03/2009

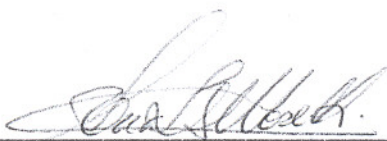
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto (Orientador)
Universidade Federal de São Carlos – DFisio/UFSCar



Profa. Dra. Ana Claudia Renno
Dfisio/UNIFESP - Santos



Profa. Dra. Ana Iochabel Soares Moretti
Universidade de São Paulo

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

Fernando Pessoa

DEDICATÓRIA

A Deus,

Aos meus pais, Ana Maria e Eduardo Rodrigues, e minha irmã, Gabriela, por sempre me apoiarem, pelos conselhos dados, pelo amor, carinho e presença em todos os momentos, amo vocês incondicionalmente.

Aos meus avós, Maria Aparecida e José Camargo, minha segunda mãe e meu segundo pai, por estarem sempre perto, mesmo estando longe, amo vocês.

Ao Rodrigo pela paciência que teve comigo em todos os momentos durante a realização dessa dissertação, pelo incentivo e companheirismo, te amo.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto, pela oportunidade, pela orientação, pelos ensinamentos e principalmente pela amizade, que vou levar para a vida inteira.

À Prof. Dra. Heloisa Selistre Araújo por abrir as portas de seu laboratório, pelas sugestões na qualificação (foram muito importantes), pela disponibilidade em tirar minhas dúvidas e pela cordialidade, obrigada.

À Prof. Dra. Tânia Salvini por disponibilizar seu laboratório para a realização de parte das análises.

Aos alunos do Laboratório de Plasticidade Muscular, Sabrina Peviani Messa e João Luiz Durigan, pela ajuda (que não foi pouca), paciência, conselhos e pela amizade, vocês se tornaram muito especiais para mim, não só como amigos, mas como profissionais.

À grande amiga Livia Ribeiro de Assis pelo carinho e amizade em todos os momentos.

Aos amigos do Laboratório de Eletrotermofototerapia, Davi, Paulo, Vivian, Emiliano, Charles, Renan, Carla, Elaine, Marco, Jaqueline, Wouber e Cleber; e também aos amigos do Laboratório de Plasticidade Muscular, Thiago, Teresa, Gabriel, Mariane e Paula pela ajuda direta ou indireta durante as análises.

Aos eternos amigos: Lidiane, Liara, Mirela, Isabela, Cláudia, Tais, Ota, Joyce, Everton, Daniela Scherma, Maira, Marcela, Igor, Rudson, Vizinho, Cássio,.... E aos novos amigos: Thiago, Jana, Luis Arnaldo, Patrícia, Clarinha, Réjean, Marcos e Neli, por sempre me apoiarem e pelos momentos de descontração.

E não poderia esquecer de agradecer as alunas do Laboratório de Biologia Molecular, Uliana e Milena, pela grande ajuda com a análise do PCR.

RESUMO

Os idosos passam por contínuas mudanças físicas, principalmente músculo-esqueléticas, como sarcopenia, alterações no sistema nervoso central e periférico, hipoperfusão sanguínea, alterações regenerativas contribuindo para atrofia e fraqueza muscular, prejudicando as atividades de vida diárias (AVDs). O processo regenerativo ocorre pela determinação, proliferação, diferenciação das células satélites através da ativação do programa genético músculo-específico, que é regulado por fatores de transcrição específicos, conhecidos como fatores regulatórios miogênicos (FRMs). Porém no idoso por causa das alterações músculo-esqueléticas a ativação dos FRMs são ineficientes, prejudicando o processo de regeneração. Entretanto, recentes achados mostraram resultados muito promissores da laser terapia de baixa intensidade (LTBI) na regeneração muscular, mas os efeitos desta terapia quando associado ao envelhecimento continuam desconhecidos. Este projeto tem por objetivo avaliar os efeitos da (LTBI), $\lambda=830\text{nm}$, no músculo tibial de ratos idosos após criolesão. Foram utilizados 56 ratos machos Wistar, divididos aleatoriamente em 4 grupos ($n=7$) de ratos jovens de 3 meses e 4 grupos ($n=7$) de ratos idosos de 10 meses; subdivididos em: grupos controle (C), grupos em que o músculo tibial anterior direito (TAD) foi apenas irradiado (I), grupos em que o TAD foi submetido à criolesão (CL) e grupos onde o TAD foi submetido à criolesão e a irradiação (LI). O tratamento com o laser modelo da DMC, classe 3B, energia de 0,87 J, foi realizado a cada 24 h, durante cinco dias consecutivos, com a primeira aplicação 24 horas após a indução da lesão. No sexto dia pós lesão, com os animais vivos e anestesiados, o músculo TAD foi cuidadosamente dissecado e retirado, e logo depois os animais foram eutanaziados. Realizou-se análises histológicas da área da lesão com Azul de Toluidina e contagem dos capilares sanguíneos com Hematoxilina-eosina. Por meio da análise por RT-PCR, foi possível analisar a expressão dos genes MyoD e VEGF. Os resultados mostraram que houve aumento significativo ($p<0,05$) da expressão gênica da MyoD, do VEGF e da contagem de capilares sanguíneos mais proeminentes nos grupos idosos lesados e irradiados do que no grupo jovem. Provavelmente a LTBI aumentou a maturação das células satélites em mioblastos e miotubos, melhorando o processo regenerativo dos ratos idosos irradiados.

Palavras-chaves: terapia laser de baixa intensidade (LTBI); regeneração muscular; ratos idosos; MyoD; VEGF.

ABSTRACT

The elderly still go through physical changes, especially musculoskeletal disorders such as sarcopenia, changes in central and peripheral nervous system, blood hypoperfusion, regenerative changes contributing to atrophy and muscle weakness, undermining the activities of daily living (AVL). The regenerative process happens about the determination, proliferation and differentiation of satellite cells through activation of muscle-specific genetic program, which is regulated by specific transcription factors, known as myogenic regulatory factors (MRFs). But in the elderly because of changes in skeletal muscle-activation of MRFs are inefficient, hindering the process of regeneration. However, recent findings showed very promising results of low laser therapy (LLT) in muscle regeneration, but the effects of this therapy when associated with aging are still unknown. This project aims to evaluate the effects of (LLT), $\lambda = 830\text{nm}$, the tibial muscle of aged rats after cryolesioning. We used 56 male Wistar rats randomly divided into 4 groups ($n = 7$) of young rats from 3 months to 4 groups ($n = 7$) of aged rats, 10 months, divided into control groups (C), groups in which the right Tibialis anterior muscle (TA) was only irradiated (I), groups in which the AT was submitted to cryolesioning (CL) and groups where the TA muscle cryolesioning and was subjected to irradiation (LI). Treatment with the laser model of the DMC, Class 3B, energy of 0.87 J, was performed every 24 h for five consecutive days, with the first application 24 hours after induction of injury. On the sixth day after injury, with the animals anesthetized and the TA muscle was carefully dissected and removed, and then the animals were euthanized. We carried out histological analysis of the area of the lesion with toluidine blue, and counting of blood capillaries with hematoxylin-eosin. Through analysis by RT-PCR, it was possible to analyze the expression of MyoD and VEGF genes. The results showed that there was significant increase ($p < 0.05$) of the expression of MyoD gene, VEGF gene and capillary blood count of more prominent in elderly victims and irradiated groups than in the young. Probably the LLT increased the maturation of satellite cells into myoblasts and mitotubos, enhancing the regenerative process of aged rats irradiated.

Keywords: Low laser therapy (LLT); muscle regeneration; aged rats, MyoD, VEGF.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema ilustrativo da criolesão no ventre do músculo TAD

Figura 2: Técnica de irradiação através da LTBI com a ponteira na posição de 90°

Figura 3: secções transversais seriadas da região média do músculo TAD coradas com Azul de Toluidina

Figura 4: secções transversais seriadas da região média do músculo TAD coradas com Hematoxilina e Eosina.

Figura 5: Morfometria da área total e lesada

Figura 6: Contagem de capilares sanguíneos

Figura 7: Níveis de mRNA da MyoD

Figura 8: Níveis de mRNA do VEGF

LISTA DE ABREVIACOES

LTBI: laser terapia de baixa intensidade

λ : comprimento de onda

TAD: tibial anterior direito

AVD: Atividade de vida diária

FRM: fator regulatório miogênico

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

RT-PCR: Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction

C: grupo controle

CL: grupo controle lesão

I: grupo apenas irradiado

LI: grupo criolesado e tratado com laser $\lambda=830\text{nm}$ e dose de $30\text{J}/\text{cm}^2$

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO.....	1
1.1- ENVELHECIMENTO.....	1
1.2- REGENERAÇÃO MUSCULAR.....	2
1.3- EFEITO DO LASER NOS TECIDOS.....	5
2- METODOLOGIA.....	10
2.1- ANIMAIS.....	10
2.2- GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	10
2.3- TÉCNICA CIRÚRGICA E PROTOCOLO DE CRIOLESÃO.....	11
2.4- RETIRADA DOS MÚSCULOS.....	13
2.5- EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL	13
2.6- RT-PCR	13
2.7- REAL TIME-PCR	14
2.8- PRIMERS.....	15
2.9- ANÁLISES HISTOLÓGICAS.....	15
2.10- FONTE LUZ.....	16
2.11- PROTOCOLO DE IRRADIAÇÃO.....	17
2.12- ANÁLISES ESTÁTISTICAS.....	18
3- RESULTADOS.....	19
3.1- ANÁLISES MORFOLÓGICAS.....	19
3.2- ANÁLISES MORFOMÉTRICAS.....	22
3.3- QUANTIFICAÇÃO DE CAPILARES SANGUÍNEOS.....	23
3.4- EXPRESSÃO GENICA DO MYOD.....	24
3.5- EXPRESSAO GENICA DO VEGF.....	24
4- DISCUSSÃO.....	26
5- REFERÊNCIAS.....	31

1-INTRODUÇÃO

1.1-ENVELHECIMENTO:

O envelhecimento é uma cadeia de eventos dinâmicos e progressivos no qual há modificações morfológicas, fisiológicas, bioquímicas, psicológicas e funcionais, que determinam, em grande parte, a capacidade de adaptação do indivíduo ao meio ambiente, que pode estar relacionado às incidências de processos patológicos (Harman, 1981).

Os idosos ultrapassam o número de 15 milhões, correspondendo a 8,6% da população total brasileira. O Brasil encontra-se em 85º lugar na lista de países por expectativa de vida, com uma média de 71,97 anos (OMS, 2007).

No envelhecimento é necessário prevenir e tratar as contínuas mudanças físicas, principalmente as músculo-esqueléticas (Oliveira, 2007) como: sarcopenia, alterações no sistema nervoso central e periférico, hipoperfusão sanguínea, alterações da ingesta calórica (Matiello-sverzut, 2003), alterações regenerativas (Always et al. 2001). Essas características contribuem substancialmente para a atrofia e fraqueza muscular inerente ao envelhecimento, ocasionando a perda da mobilidade funcional e da independência física (Oliveira, 2007), sendo que uma das causas dessas alterações é o aumento do risco do idoso cair.

A queda é a principal causa da morte acidental entre pessoas com 60 anos ou mais. Além disso, na maioria dos casos que sofreram este tipo de acidente tiveram sérias conseqüências físicas, incluindo lesões, hospitalizações, dificuldade na mobilidade, restrição das atividades de vida diárias (AVDs), receio de sofrer um novo trauma, como também períodos de internação mais longos, maiores períodos de

reabilitação, maior risco de dependência posterior e maiores custos com remédios e internações (OMS-2007). Entre as lesões causadas pelas quedas dos idosos a lesão muscular é a mais comum, tendo uma incidência de 10% a 55%, sendo a contusão a causa de 90% dos casos (Järvinen et al. 2005).

O processo de regeneração muscular nos idosos é deficitário, há hipoperfusão muscular, aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) que causam o “estresse oxidativo”, alteram o pH sarcoplasmático e os canais de cálcio. Com isso, o tecido muscular sofre modificações na sua estrutura e na função das células responsáveis pela regeneração músculo-esquelética (Ehrhardt, 2005), que se tornam menos efetivas (Amaral, 2001).

1.2 – REGENERAÇÃO MUSCULAR:

O tecido músculo-esquelético é um tecido dinâmico, capaz de responder a estímulos fisiológicos ou a lesões por meio de um orquestrado processo de regeneração para restaurar sua arquitetura (Jarvinen et al. 2005).

Diversos modelos de lesão foram propostos para examinar os mecanismos regenerativos músculo-esquelético, incluindo criogenia, lesões químicas e contusões (Shi et al. 2006). Em resposta a estes modelos de lesão uma resposta celular e molecular é observada. A regeneração muscular passa por 3 fases: a primeira com ruptura e necrose das miofibrilas, levando a reação inflamatória e ativação das células satélites. A segunda consiste na fagocitose do tecido necrótico por neutrófilos e macrófagos (Tidball, 2005), regeneração das miofibrilas pela proliferação e diferenciação das células satélites; e a terceira, onde os mioblastos formam miotubos multinucleados, ocorre sua maturação em miofibrilas até o restabelecimento da capacidade funcional. As

células satélites novamente ingressam no ciclo celular e demonstram uma significativa capacidade proliferativa entre 2 a 3 dias de lesão, processo acompanhado pela fase de diferenciação onde mioblastos saem do ciclo celular para formar pequenos miotubos. A fusão dos mioblastos e seu crescimento geram miofibrilas centronucleadas regeneradas resultando na restauração do tecido muscular (Amaral, 2001; Minamoto et al. 2001; Huard et al. 2002; Anderson, 2006).

Na lesão muscular as células satélites exercem papel fundamental, pois alteram sua estrutura por meio de estágios de determinação, proliferação, diferenciação e ativação do programa genético músculo - específico, que é regulado por fatores de transcrição específicos, conhecidos como fatores regulatórios miogênicos (FRMs) (Amaral, 2001). Os FRMs são uma família de fatores de transcrição hélice-alça-hélice (bHLH) que regulam genes músculo-específico como desmina, troponina I e cadeia leve da miosina, sendo compostos por 4 membros: MyoD (ou Myf-3), Myf-5, miogenina (ou Myf-1) e MRF-4 (ou Myf-6/herculina) (Saborin & Rudnick, 2000). Durante a embriogênese eles são críticos no estabelecimento da linhagem miogênica e no controle da diferenciação dos mioblastos e miofibras (Saborin & Rudnick, 2000).

A expressão dos FRMs foi investigada em várias fases do desenvolvimento. Dois grupos de FRMs foram identificados: os FRMs primários que são myoD e myf-5, os quais têm papel na determinação miogênica, ou seja na transformação de célula precursora em mioblasto; os FRMs secundários: miogenina e MRF-4 responsáveis pela diferenciação celular do mioblasto em miócito diferenciado e deste para a fibra muscular madura (Marsh et al. 1997; Saborin & Rudnick, 2000; Buchberger et al. 2003; Ishibashi et al. 2005; Peviani et al. 2007).

Pesquisas verificaram que a sinalização molecular para ativar fatores regulatórios e expressar genes específicos musculares é o que comanda as fases de

ativação e proliferação das células satélites durante a regeneração; e a indução da MyoD ocorre dentro de 2-6 horas pós lesão, correspondendo ao seu papel de ativação das células satélites. Já a Myf5 e a miogenina aparecem 5 dias após lesão, induzindo a diferenciação destas células (Carnac, 1998; Shi et al. 2006; Zhao & Hoffman, 2006).

Outros estudos descobriram que a MyoD e a miogenina estão em altos níveis de expressão durante os primeiros meses de vida. Depois, no músculo adulto de animais, são apenas detectáveis nos processos de plasticidade, adaptação e regeneração, e no músculo do animal idoso estão frequentemente aumentadas. Esta hiper-regulação da expressão da MyoD e da miogenina no núcleo das fibras musculares está provavelmente relacionadas a insuficiente inervação motora do músculo idoso, onde a expressão dos FRMs, no núcleo das células satélites, ocorre para uma miogênese compensatória em fibras presumidamente desnervadas (Musaro et al. 1995; Always, 2001; Dedkov et al. 2003;)

Alway, 2001, analisando se o aumento da expressão dos FRMs era favorável para o músculo de ratos idosos, num protocolo de imobilização da pata traseira para causar atrofia muscular, verificaram que os ratos jovens apresentaram um aumento na expressão dos FRMs para reverter a perda das fibras musculares, porém nos idosos como já estava elevado não conseguiram aumentar além desses níveis e concluiu que a idade elimina a capacidade do músculo idoso de regular os FRMs para tentar reverter a atrofia induzida.

Marsh et al., 1997, verificaram os níveis de expressão dos FRMs durante a regeneração de músculos lesados de ratos jovens, adultos e idosos após 5, 14, 21, 28 e 56 dias de lesão. Nos ratos jovens e adultos todos os FRMs aumentaram no 5º dia seguido por uma diminuição da sua expressão atingindo os níveis do controle no 28º dia e permanecendo assim no 56º dia. Isso mostrou que no 5º dia pós lesão o processo de

regeneração está em maior atividade por que as células satélites já se transformaram em mioblastos, precisando da ação de todos os FRMs para fazer a maturação dessas células em miotubos, restaurando o tecido muscular lesado.

Já nos ratos idosos os FRMs permaneceram com sua expressão elevada, porém não foi um aumento conjugado igual ao que ocorreu com os ratos jovens e adultos. A miogenina aumentou no 5º dia, a MyoD aumentou no 28º dia e a MRF4 aumentou no 14º dia. Concluindo que o tecido muscular no idoso tem um descontrole na aptidão de ativar os FRMs de acordo com a necessidade das células no processo de regeneração, mostrando que a estabilidade do RNAm, eficiência da tradução, fosforilação, e transmissão de sinais estão alterados e é possível que as alterações da junção neuromuscular e/ou a inatividade dos ratos idosos podem causar o aumento da expressão gênica dos FRMs, na tentativa contínua de gerar novas fibras musculares e reverter a possível atrofia e lesão (Marsh, 1997).

As células satélites além de serem reguladas pelos FRMs são influenciadas por vários fatores de crescimento, como: fator de crescimento fibroblástico, fator de crescimento insulino-dependente, interleucina-6 e o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) que é um fator de crescimento vascular ativado durante a embriogênese e regeneração muscular (Cross et al., 2003).

Além das alterações nos níveis dos FRMs, Ryan et al., 2006, mostraram que os níveis de RNAm do VEGF encontram-se diminuídos no músculo de indivíduos idosos, somando para a hipoperfusão sanguínea e as alterações regenerativas. Outro estudo verificou as vias de ativação do gene VEGF durante a miogênese e descobriram que o gene MyoD interage diretamente com a região regulatória do VEGF (Bryan et al., 2008), mostrando que existe uma ligação entre a manutenção do aporte sanguíneo e a regeneração muscular (Wagatsuma et al., 2006). Assim, podemos entender que as

alterações na expressão gênica dos FRMs influenciam de forma negativa no aumento da expressão gênica do VEGF, prejudicando ainda mais a regeneração muscular no idoso.

1.3-EFEITO DO LASER NOS TECIDOS:

A laser terapia de baixa intensidade (LTBI) vem sendo amplamente utilizada nos tecidos biológicos com resultados positivos (Ortiz et al., 2001). Nos processos cicatriciais o laser induz respostas como diminuição do processo inflamatório, redução de edema, aumento da fagocitose, da síntese de colágeno (Baxter, 1994; Gogia, 1995). No tecido ósseo os resultados do uso da LTBI mostraram fraturas consolidadas e aumento da resistência e da densidade óssea (Trelles e Mayayo, 1987; Kawasaki e Shimizu, 2000), aumento do acúmulo de cálcio (Luger et al., 1998), aumento da atividade fagocitária dos macrófagos e da atividade dos fibroblastos para produzir o calo ósseo (Tang e Chai, 1986). Foram descritos melhor grau de organização das fibras colágenas do tecido tendíneo lesados e irradiados (Arruda et al., 2007), e também o uso da laserterapia na promoção da regeneração nervosa periférica após axoniotmese e cirurgia reparadora (Gigo-benato et al., 2004), além de estimular a proliferação de fibroblastos e síntese de prócolagênio in vitro (Pereira et al., 2002).

Trabalhos apontam o efeito positivo da LTBI na regeneração muscular, pelo aumento de miotubos, miofibrilas e angiogênese com o laser He-Ne de 632,8nm com $31,2\text{J}/\text{cm}^2$ e irradiados por 5 dias (Weis e Oron, 1992); ativa a proliferação, a diferenciação e a fusão das células satélites na cultura de células miogênicas de ratos, com laser 632,8nm, 4,5 mW (Shefer et al., 2002); induz a expressão de proteínas regulatórias do ciclo celular, aumenta a área da fibra muscular e a densidade mitocondrial com o laser He-Ne de 632,8nm com 2,6; 8,4 e $25\text{ J}/\text{cm}^2$, irradiados por 5

dias (Amaral, 2001). Porém um estudo realizado com o laser As-Ga (904nm) com doses de 3 e 10 J/cm², por 5 dias, não foi suficiente para promover alterações morfológicas significativas na regeneração muscular (Oliveira et al., 1999).

Outro trabalho utilizando laser Ga-Al-As, 780nm, com doses altas de 150J/cm², 250J/cm² e 800J/cm² por 5 dias e 10 dias consecutivos, mostraram que o melhor resultado histoquímico e histomorfométrico foi encontrado no grupo irradiado com 800J/cm² tanto com 5 dias como com 10 dias de tratamento (Morrone et al., 1998).

Comparando dois tipos de laser, He-Ne, 31,2J/cm² e o Ga-As, 2.82 Hz e 0,005mW, por 5 dias consecutivos na regeneração muscular de músculos de rãs lesados por criolesão, verificaram que o processo de regeneração ocorreu igualmente para os grupos irradiados com os dois tipos de laser (Bibikova e Oron, 1994). Verificaram também a ação a longo prazo da LTBI, com o laser He-Ne, 632,8nm, em músculos de rãs lesados com criolesão e irradiados 5 dias consecutivos, pela análise histológica depois de 9, 14 e 30 dias pós lesão. Eles conseguiram mostrar que os músculos lesados e irradiados apresentavam 15%, 65% e 75% de miofibrilas novas respectivamente quando comparado com o grupo lesado e não irradiado que apresentou 0, 5% e 15% de miofibrilas novas (Bibikova e Oron, 1992), além de verificar o aumento da angiogênese, mostrando que a revascularização precoce explica a maturação acelerada das miofibrilas dos músculos lesados e irradiados (Bibikova e Oron, 1994).

Estudos demonstraram a ação da LTBI no aumento da proliferação celular, da síntese de proteínas, aumento da área média das fibras musculares, aumento da quantidade de miotubos e miofibrilas em músculos lesados, melhora da densidade mitocondrial e da regeneração em músculos desnervados e lesados, além do aumento da angiogênese (Amaral, 2001; Bibikova e Oron, 1992). Os autores verificaram no local da lesão redução de apoptose celular, alteração nas concentrações de radicais livres,

elevação da produção da superoxidodismutase (enzima que atenua o dano causado por radicais livres, diminuída no idoso) (Karu, 1995; Vladimirov, Osipov & Klebanov, 2004), aumento da atividade de fibroblastos, alinhamento das fibras de colágeno. Estes efeitos da irradiação laser sobre tecidos biológicos podem promover uma aceleração do processo de reparo tecidual e melhoria das suas propriedades físicas e funcionais (Parizotto & Baranauskas, 1998; Enwemeka & Reddy, 2000).

Apesar dos trabalhos realizados com idosos serem escassos, resultados preliminares mostram um caminho bastante promissor da aplicação da LTBI na regeneração tecidual associado ao envelhecimento, pois determinadas características idade-dependentes como as condições bioquímicas, metabólicas e físicas podem influenciar componentes do mecanismo fotobiomodulatório e conseqüentemente definir como as células irão responder à radiação eletromagnética (Tacirow, 2007). Além do que, os efeitos da LTBI na regeneração dos tecidos biológicos dependem do tempo de dosagem, comprimento de onda e frequência das irradiações usadas (Ortiz et al., 2001, Bibikova e Oron, 1994), pois determinam quais biomoléculas vão interagir no tecido levando ao efeito terapêutico específico (Vladimirov et al., 2004; Amat et al., 2006)

O mecanismo fotobiomodulatório da LTBI explica através da teoria fotoquímica que a interação da radiação eletromagnética com os cromóforos da membrana interna da mitocôndria e a cascata bioquímica subsequente da fotoestimulação por laser se dá principalmente num meio onde há um estado óxido-redução instável (Karu, 2005). Considerando isso, é bem provável que a radiação laser encontre um meio de interação mais propício no adulto que no jovem, já que o estresse oxidativo é uma característica do processo de envelhecimento tecidual (Tacirow, 2007). Como a célula jovem apresenta um metabolismo elevado, cujas condições bioquímicas como fatores de crescimento, aporte sanguíneo e sinalização intra e intercelular são considerados ideais, é possível

que os benefícios da radiação laser sejam mais significativos para as populações idosas, restaurando processos metabólicos e bioquímicos que se alteraram durante o envelhecimento.

Também é hipotetizada a possível existência de uma cadeia de transdução de fótons para uma resposta celular, na qual ocorre a absorção da luz pela mitocôndria, podendo gerar os eventos da segunda etapa no núcleo, como: mudanças na taxa de síntese de DNA e RNA para aumentar a proliferação celular (Ortiz et al., 2001), alterações no estado de oxidação e redução dos componentes da cadeia respiratória, alterações na atividade bioquímica e estrutural da célula, aumento da proliferação celular e síntese protéica, alterações no potencial de membrana e vasodilatação local oferecendo nutrientes às células (Karu, 1995).

Comparando estes efeitos da LTBI com as alterações decorrentes do envelhecimento, possivelmente a laserterapia na regeneração muscular de ratos idosos propiciará resultados positivos, como: a normalização ou aumento dos níveis alterados dos FRMs, aumentando a capacidade de proliferação e maturação das células satélites, mioblastos e miotubos, revertendo a possível atrofia nos músculos não lesados e a lesão nos músculos lesados.

Assim, este estudo tem como objetivo verificar se a LTBI influenciou no processo de regeneração do músculo de ratos idosos, para tal comprovação foram realizadas análises moleculares, para verificar os níveis do RNAm da MyoD e VEGF, análises histológicas para analisar após a irradiação a morfologia das fibras musculares, presença de lesão muscular e o número de vasos sanguíneos. Acreditamos também que os resultados deste projeto fornecerão subsídio para o uso clínico da laserterapia na regeneração de lesões musculares, melhorando não só a resposta tecidual à lesão, como também o aspecto funcional e social do idoso.

2-METODOLOGIA

2.1-ANIMAIS:

A pesquisa foi desenvolvida utilizando 56 ratos machos da espécie Wistar, com idade de 3 meses (266 ± 30 g) o grupo de ratos jovens e 10 meses (674 ± 85 g) o grupo de ratos idosos. Os animais foram fornecidos pelo biotério central da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e alojados em biotério próprio no laboratório de eletrotermofototerapia, onde foram mantidos em gaiolas plásticas (máximo de três animais por caixa). Todos os animais tiveram livre acesso à água e ração peletizada e foram submetidos a um controle ambiental de luminosidade (ciclo claro/escuro de 12h) à temperatura ambiente. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFSCar, parecer 04/08.

2.2-GRUPOS EXPERIMENTAIS:

Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais ($n=7$). O músculo submetido à criolesão foi o tibial anterior direito (TAD) que foi tratado com laser $\lambda=830$ nm com energia 0,87J.

Grupo 1: - (LI) – Os músculos dos ratos jovens foram submetidos à criolesão e tratados com laser λ 830nm.

- (LI) - Os músculos dos ratos idosos foram submetidos à criolesão e tratados com laser λ 830nm.

Grupo 2: - (CL) – Os músculos dos ratos jovens foram submetidos à criolesão, mas não foram tratados.

- (CL) – Os músculos dos ratos idosos foram submetidos à criolesão,

mas não foram tratados.

Grupo 3: - (I) – Os músculos dos ratos jovens não foram submetidos à criolesão, mas foi realizado um tratamento com laser λ 830nm na região do TAD.

- (I) - Os músculos dos ratos idosos não foram submetidos à criolesão, mas foi realizado um tratamento com laser λ 830nm na região do TAD.

Grupo 4: - (C) - Os músculos dos ratos jovens não foram submetidos à criolesão e nem tratados.

- (C) - Os músculos dos ratos idosos não foram submetidos à criolesão e nem tratados.

2.3-TÉCNICA CIRÚRGICA E PROTOCOLO DE CRIOLESÃO:

O experimento foi realizado em sete dias:

Dia I - Os animais foram inicialmente pesados e posteriormente anestesiados de acordo com o peso corporal por meio de injeção intraperitoneal de solução composta por Cloridrato de Ketamina (0.05 mg/kg) e Cloridrato de Xilazina (0.03 mg/kg). O músculo submetido ao procedimento de criolesão foi o tibial anterior direito (TAD). Em seguida, a pele que recobre o TAD foi tricotomizada e limpa, sendo então realizada uma incisão transversal (de aproximadamente 1 cm) na região correspondente ao ventre do músculo. Para a correta exposição do TAD, foi necessário ainda, o afastamento da fáscia que o recobre.

A lesão tecidual foi induzida por congelamento (criolesão) na região central do ventre do músculo TAD. Para isso, um bastão de ferro com uma ponta de 0.5cm², previamente imerso em nitrogênio líquido, foi pressionado transversalmente contra o

ventre do músculo por 10 segundos. Após novo resfriamento do bastão, esse procedimento foi repetido e em seguida a pele foi suturada (Fio Nylon 3-0 – SHALON Ltda) e limpa com álcool iodado. Esta metodologia foi previamente testada no laboratório de Neurociências, Unidade de Plasticidade Muscular da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

Dias II, III, IV, V e VI – Os animais foram submetidos ao procedimento de irradiação de acordo com o comprimento de onda estabelecido, 830nm, durante cinco dias consecutivos. Para isso foi permitida a exposição da área lesionada ao feixe do laser.

Dia VII – Eutanásia – Os animais de todos os grupos tratados e controles foram pesados, anestesiados e submetidos a eutanásia com a injeção intracardiaca de cloreto de potássio (KCL-3M).



Figura 1: esquema ilustrativo da criolesão no ventre do músculo TAD.

2.4-RETIRADA DOS MÚSCULOS:

O músculo TAD foi cuidadosamente dissecado e retirado com os animais vivos e anestesiados. Após a retirada, o músculo foi pesado. O músculo foi dividido em duas porções similares com um corte horizontal no seu ventre. A porção distal foi imediatamente congelada em nitrogênio líquido para a extração de RNA. A porção proximal foi utilizada para análise histológica. Para tal, o fragmento muscular foi pré-congelado em isopentano. Os músculos foram armazenados em freezer a -86°C .

2.5-EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL:

A extração de RNA total de cada animal foi obtida utilizando-se o reagente Trizol (Gibco).

A densidade óptica (DO) das amostras foi determinada por espectrofotometria, no comprimento de onda de 260 nm. Para avaliar a qualidade do RNA isolado foi determinada a razão entre as absorbâncias a 260 e 280 nm (razão ≥ 1.8). Também foi avaliada a qualidade do material por eletroforese das amostras (25 μg de RNA total) em gel desnaturante de agarose-formamida (1%), em tampão MOPS (40mM de ácido morfolinopropanosulfônico). Posteriormente, os géis foram corados com brometo de etídeo.

2.6-RT-PCR (Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction):

Apos o isolamento do RNA, foi realizada as transcrições reversas (RT) utilizando 1ug de RNA total. A reação de RT foi realizada da seguinte forma:

Volumes variados de RNA total: 200 ul de Transcriptase Reversa; 0,8 mM dNTPs; 1 mM MgCl₂; 0,02 ug/ul primer oligo dT; 4 mM DTT.

A reação foi realizada em um termociclador (10 minutos a 70°C, 60 minutos a 42°C e 10 minutos a 94°C). A integridade do produto da RT (cDNAs) foi conferida através da realização de gel de agarose (1%) não desnaturante, corado com brometo de etídeo.

2.7-Real Time-PCR:

Em seguida, diferentes frações das RTs foram utilizadas na amplificação em cadeia por Polimerase (PCR) em um equipamento que monitora a geração de amplicons em tempo real (PCR *real-time*, Rotor Gene).

As amplificações por PCR foram efetuadas utilizando-se 10-80ng/μl de cDNA adicionado a uma reação contendo 25μl de SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), 50-900nM dos primers (senso e antisenso) em uma solução com volume final de 55μl , dividido em dois tubos (duplicata). As condições de ciclagem consistiram em: 95°C por 10 min, seguidos de 40 ciclo com duas etapas, 15s de desnaturação a 94°C, 60s de anelamento à 56°C para o GAPDH, 52°C para a MyoD e 56°C para o Vegf., seguido de 72°C por 60s e 72°C por 10 min.

Após a reação de PCR, foi possível determinar o início da fase de amplificação exponencial (Ct, *cycle threshold*) de cada amostra, que foi utilizado como dado para a análise da expressão gênica da MyoD e VEGF. A expressão gênica foi normalizada pelo

gene GAPDH que foi utilizado como controle interno, de acordo com os autores (Mozdziak et al., 1998).

2.8-PRIMERS:

Os oligonucleotídeos, que foram utilizados como primers, para as reações de polimerase em cadeia para a Myo-D (Hill et al., 2003), o Vegf (Wagatsuma et al., 2006). As seqüências utilizadas foram MyoD (senso: GGAGACATCCTCAAGCGATGC; antisenso: AGCACCTGGTAAATCGGATTG), VEGF (senso: GGAGATCCTTCGAGGAGCACTT; antisenso: GGCGATTTAGCAGCAGATATAAGAA), GAPDH (senso: CCACCAACTGCTTAGCCC; antisenso: GCCAAATTCGTTGTCATACC).

2.9-ANALISES HISTOLÓGICAS:

- Fibra muscular:

Para avaliar a presença de sinais da lesão muscular por criolesão, cortes histológicos do músculo tibial anterior foram analisados. Para isto, a porção proximal do músculo foi fixada em fígado bovino, conservado em formol, e congelada primeiramente em isopentano pré-congelado em nitrogênio líquido, e colocado no freezer (-80°C). Cortes seriados (10 µm de espessura) foram obtidos do ventre do músculo tibial congelado usando um micrótomo criostato (HE 505; Microm, Jena, Germany) mantido a -20°C e então foram corados com 1% de azul de toluidina/1% bórax. O corante azul de toluidina foi usado para avaliar a morfologia das fibras

musculares e presença da lesão muscular, porque este permite a identificação do mionúcleo, áreas de mionecrose, e a região basofílica das fibras musculares. Para a análise morfométrica da área de lesão, as imagens foram processadas para a obtenção de um mosaico demonstrando a extensão total do corte histológico; foram captadas com objetiva de 10x e analisadas em microscópio óptico (Axioplan 2, Carl Zeiss, Jena, Alemanha). A mensuração da área total e área lesada de cada corte foi realizada através do software Axion Vision (Carl Zeiss).

- Capilares sanguíneos:

Para avaliar a presença de vasos sanguíneos no local da lesão muscular, cortes histológicos do músculo tibial anterior foram analisados. Para isto, a porção proximal do músculo foi fixada em fígado bovino, conservado em formol, e congelada primeiramente em isopentano pré-congelado em nitrogênio líquido, e colocado no freezer (-80°C). Cortes seriados (7 µm de espessura) foram obtidos do ventre do músculo tibial congelado usando um micrótomo criostato (HE 505; Microm, Jena, Germany) mantido a -20°C e então foram corados com Hematoxilina/eosina (HE). Para a análise dos vasos sanguíneos as imagens foram processadas para a obtenção de um mosaico demonstrando a extensão total do corte histológico, foram feitas 5 áreas por corte, sendo 5 cortes por animal e as imagens foram captadas com objetiva de 10x e analisadas em microscópio óptico (Axioplan 2, Carl Zeiss, Jena, Alemanha). As imagens obtidas dos vasos sanguíneos foram analisadas no software Imagetool 3.0 (University of Texas Science Center in San Antonio), no qual foram contabilizados a quantidade de capilares sanguíneos presentes na fotomicrografia.

2.10-FONTES DE LUZ:

Foi utilizado o equipamento emissor de luz laser tipo diodo - TheraLase, da marca DMC equipamentos Ltda, operando os seguintes parâmetros: comprimentos de onda da luz = 830 nm; potência óptica útil (saída da ponteira) = 30mW; diâmetro do feixe = 0,6 mm; área do feixe de saída = 0,0028 cm²; ângulo de divergência = 1,5°; Classe = 3B GaAlAs; dose = 30J/cm², tempo de 29 segundos e energia=0,87J.

2.11-PROTOCOLO DE IRRADIAÇÃO:

- Os animais foram irradiados diretamente no local da lesão muscular, a cada 24 h, durante cinco dias consecutivos, com a primeira aplicação 24 horas após a indução da lesão.
- As irradiações foram emitidas pela referida fonte e respectivo comprimento de onda de 830nm.
- A irradiação foi realizada de forma pontual, diretamente sobre a pele que recobre o ventre do músculo TAD.
- Durante o procedimento de irradiação, os animais foram mantidos sob sedação com cloridrato de ketamina e xilazina em baixas doses e posicionados de forma a permitir a aplicação do feixe de laser diretamente sobre a área lesada.



Figura 2: técnica de irradiação através da LTBI com a ponteira na posição de 90°.

2.12-ANALISES ESTATÍSTICAS:

Os dados referentes as análises realizadas foram submetidos ao teste de Homogeneidade (Teste de Levene) e normalidade. Em seguida, foi realizado o teste de variância (ANOVA two way), permitindo a análise comparativa entre os grupos experimentais. O teste de Tukey foi eleito para caracterização das diferenças entre grupos específicos. O nível de significância aceito foi de 5% ($p < 0,05$).

3.RESULTADOS

3.1-ANALISES MORFOLÓGICAS:

Os procedimentos histológicos permitiram analisar de forma qualitativa o processo de regeneração muscular que ocorreu em condições normais e também com influência da irradiação laser. As imagens coradas com TB (figura 3) nos grupos apenas lesados e grupos lesados e irradiados mostraram uma região lesada bem delimitada, permanecendo restrita à superfície do músculo TA, foi possível ser visualizado também a região de transição das regiões intactas para o sítio de lesão. Na região do sítio de lesão próximo a região de transição, são identificadas fibras jovens, com núcleos centralizados e menor área de secção transversa. Já na região superficial da lesão, pode-se identificar uma elevada concentração de células mononucleadas (inflamatórias e /ou miogênicas), ausência de fibras musculares jovens, matriz extracelular abundante e alta concentração de lisossomos.

As fibras da região intacta (figura 3) dos grupos controles e grupos apenas irradiados apresentaram características de um tecido músculo esquelético saudável apresentando um formato poligonal, núcleo periférico, organização fascicular, não apresentando alteração na morfologia das fibras.

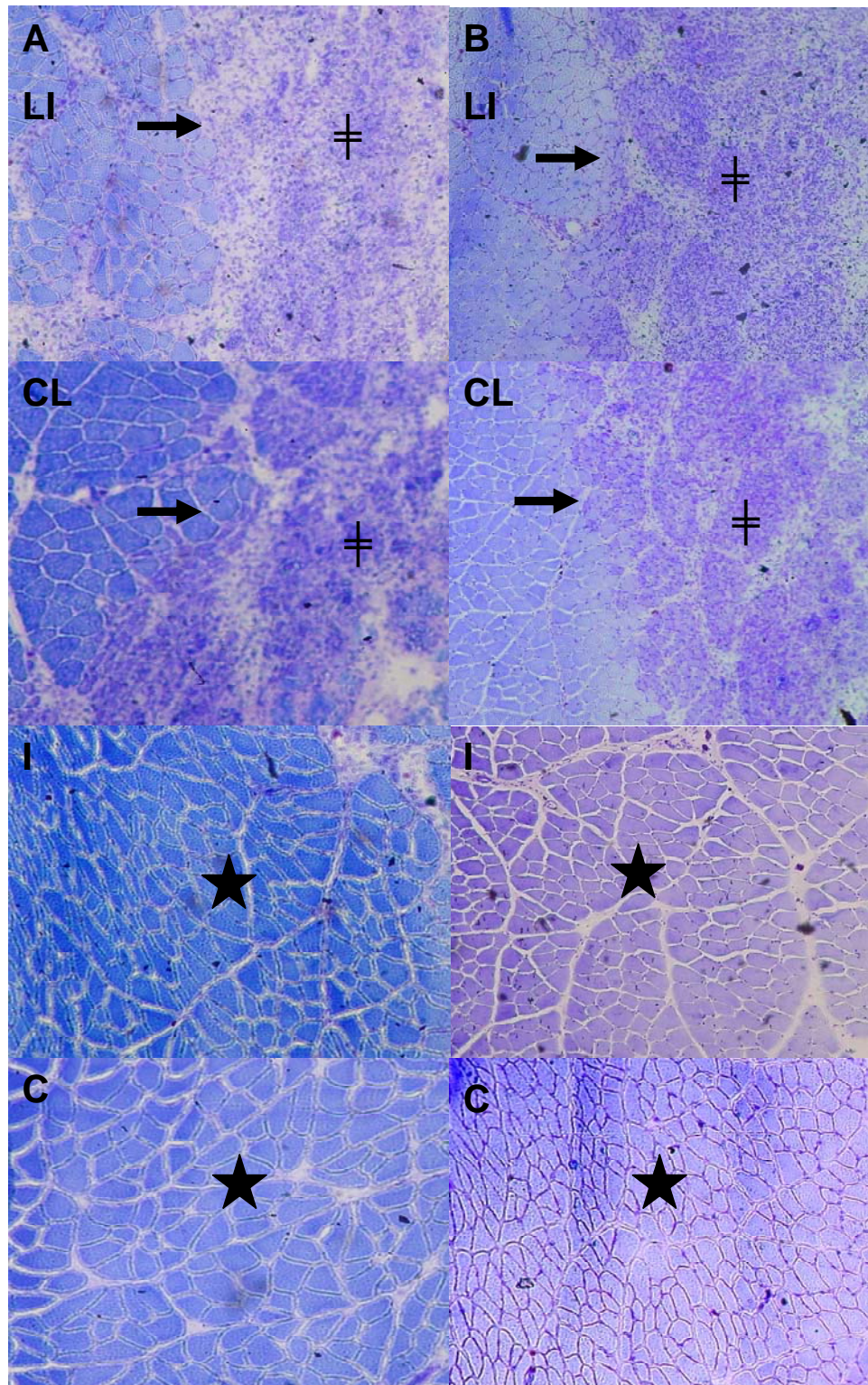


Figura 3: Secções transversais seriadas da região média do músculo TAD coradas com Azul de Toluidina. A fileira (A) corresponde ao grupo idoso, e a fileira (B) ao grupo jovem; LI – grupos lesados e irradiados; CL – grupos apenas lesados; I – grupos apenas irradiados; C – grupos controles. Visualiza-se → a interface entre as regiões normais e lesadas; ≠ região correspondente a lesão; fibras musculares normais ★ .

As imagens coradas com HE (figura 4) possibilitaram visualizar a presença de capilares sanguíneos nos cortes dos grupos controle, controle irradiado, controle lesado, lesado e irradiado tanto nos jovens como nos idosos.

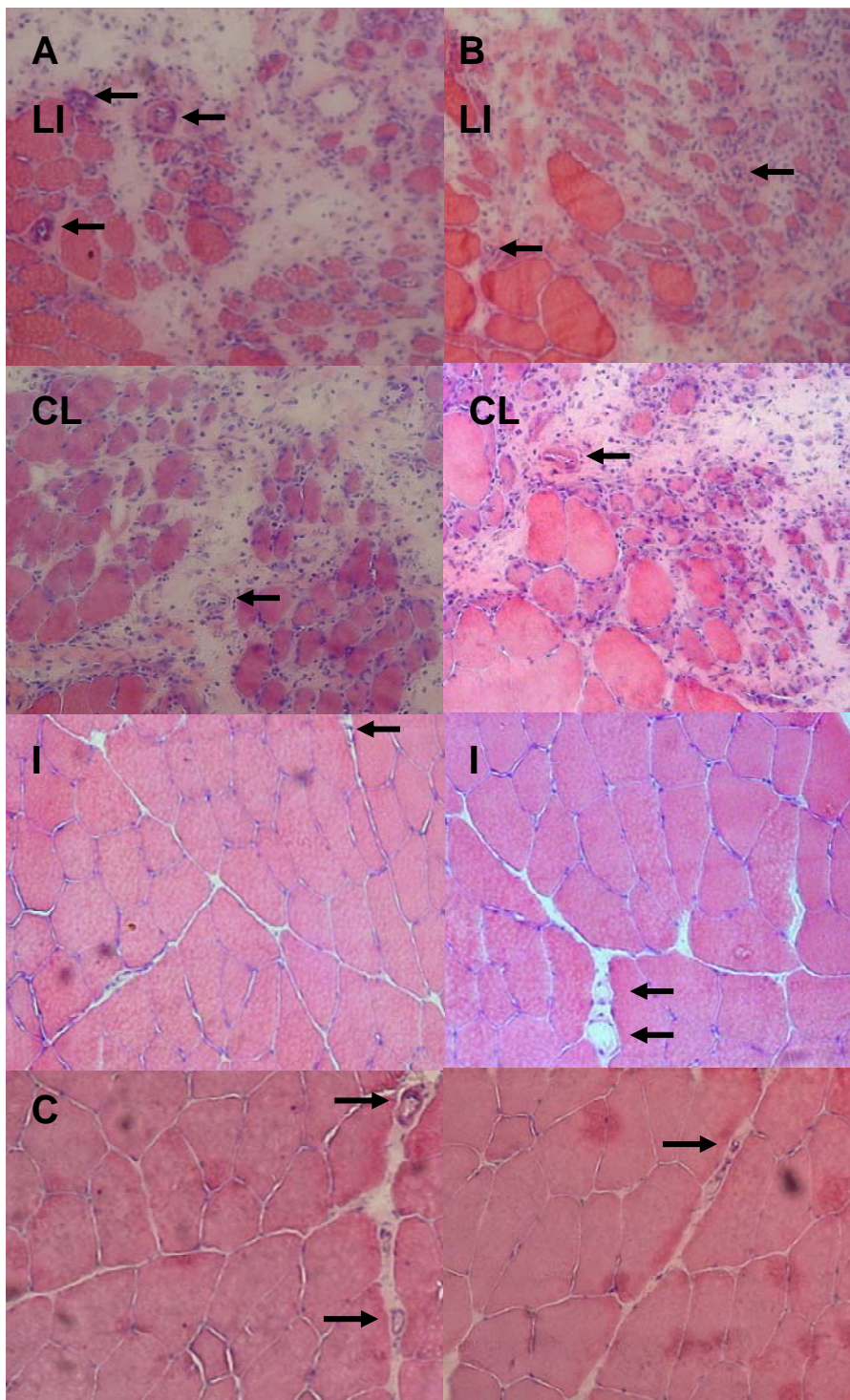


Figura 4: Secções transversais seriadas da região média do músculo TAD coradas com Hematoxilina e Eosina. A fileira (A) corresponde ao grupo idoso, e a fileira (B) ao grupo jovem; LI– grupos lesados e irradiados; CL– grupos apenas lesados; I– grupos apenas irradiados; C– grupos controles. Visualiza-se → capilares sanguíneos.

3.2-ANÁLISES MORFOMÉTRICAS:

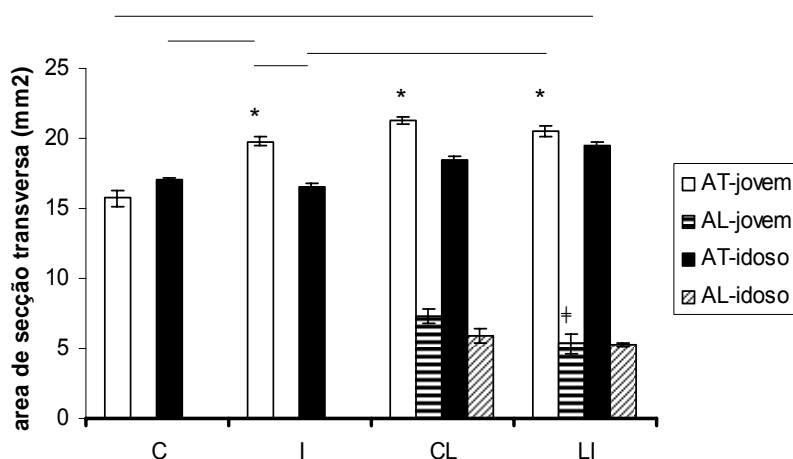


Figura 5: Área total (AT) e área lesada (AL), em que * : $p < 0,05$ corresponde as comparações intragrupos, ou seja, as diferenças significantes entre os grupos LI, CL e I jovens em relação ao grupo C jovem, e † : $p < 0,05$ corresponde a diferença significativa entre o grupo LI jovem em relação ao grupo CL jovem. As barras horizontais na porção superior da figura indicam as comparações intergrupos que apresentam diferenças estatísticas ($p < 0,05$), entre os grupos jovens e idosos.

A figura 5 mostra que houve aumento da área total da secção transversa dos grupos jovens e idosos, porém um aumento significativo desta área só ocorreu nos grupos LI, CL e I jovens. A figura mostra também que ocorreu uma diminuição das áreas lesadas, mas com diferença estatística apenas para o grupo LI jovem quando comparado com o grupo LI idoso.

3.3-QUANTIFICAÇÃO DOS CAPILARES SANGUÍNEOS:

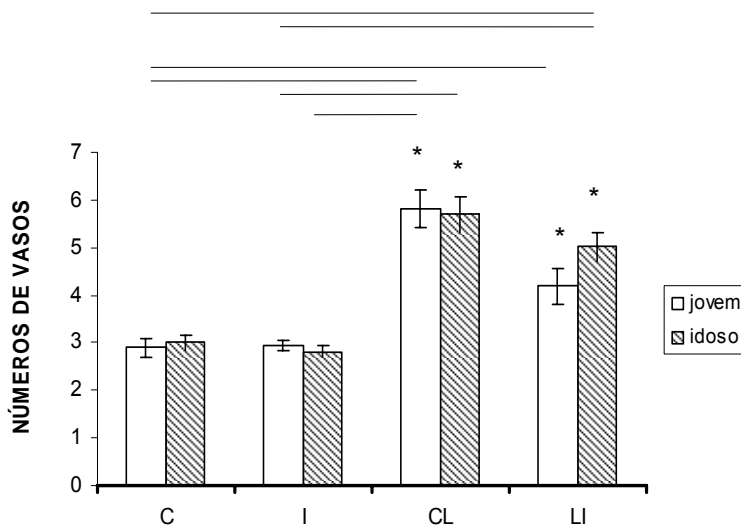


Figura 6: Contagem de capilares sanguíneos através de microscopia de luz obtidas nas fotomicrografias dos grupos jovens e idosos, em que *: $p < 0,05$ corresponde as comparações intragrupos, ou seja, as diferenças significantes entre os grupos LI, CL jovens em relação ao grupo C jovem, e entre os grupos LI, CL idosos em relação ao grupo C idoso. As barras horizontais na porção superior da figura indicam as comparações intergrupos que apresentam diferenças estatísticas ($p < 0,05$), entre os grupos jovens e idosos.

O resultado da contagem de capilares sanguíneos em nosso estudo mostrou um aumento significativo da quantidade de capilares sanguíneos em ambos os grupos jovem e idoso LI e CL. O grupo I jovem e idoso não apresentaram alterações da quantidade de capilares sanguíneos. Os grupos LI jovem e idoso tiveram uma diminuição dos capilares sanguíneos quando comparado aos grupos CL jovem e idoso, porém não foi significativo.

3.4-EXPRESSÃO GÊNICA DO MYOD RNAm:

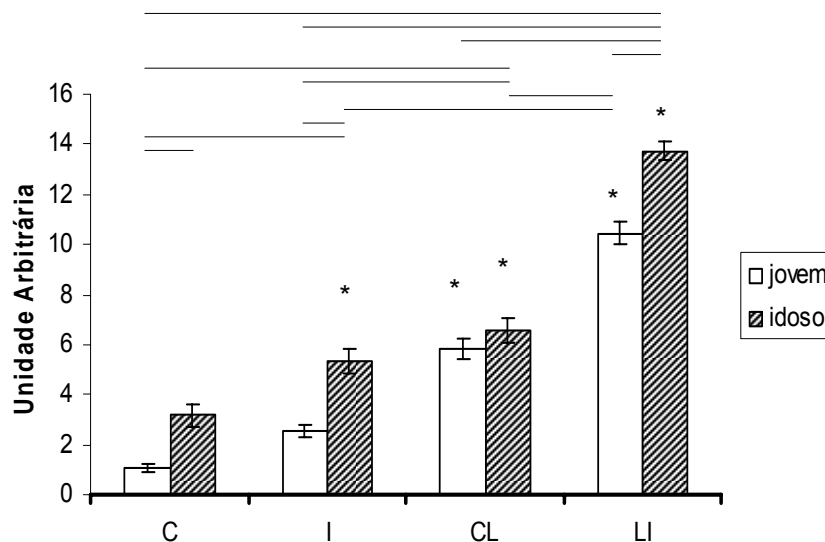


Figura 7: Níveis de RNAm da MyoD do músculo tibial anterior (TA) de ratos, em que *: $p < 0,05$ corresponde as comparações intragrupos, ou seja, as diferenças significantes entre os grupos LI, CL jovens em relação ao grupo C jovem, e entre os grupos LI, CL e I idosos em relação ao grupo C idoso. As barras horizontais na porção superior da figura indicam as comparações intergrupos que apresentam diferenças estatísticas ($p < 0,05$), entre os grupos jovens e idosos.

Em relação à expressão gênica da MyoD RNAm os grupos I, CL e LI tanto jovens como idosos apresentaram aumento da expressão em relação ao grupo C jovem e idoso. Este aumento da expressão gênica obteve uma diferença significativa em relação ao grupo C para os grupos LI idoso, CL idoso e I idoso. Já nos jovens o aumento da expressão gênica da MyoD RNAm obteve uma diferença estatística em relação ao grupo C, para os grupos LI e CL. Na relação intergrupos os idosos tiveram uma resposta mais acentuada dos níveis de RNAm da MyoD quando comparados com os grupos jovens.

3.5-EXPRESSÃO GÊNICA DO VEGF RNAm:

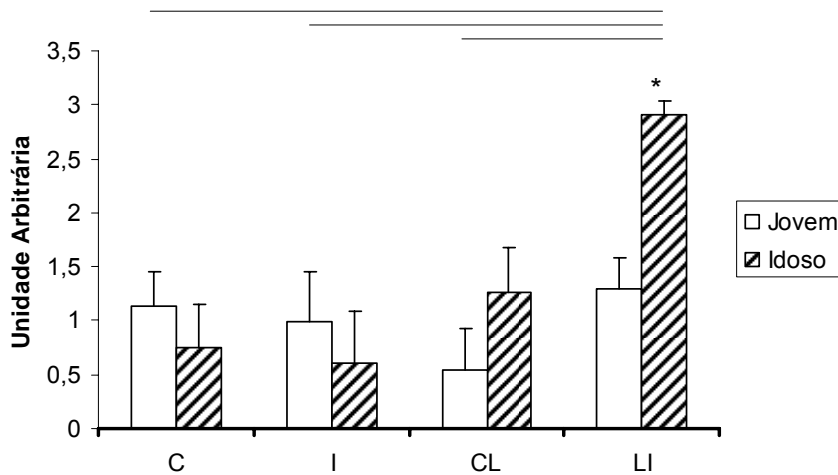


Figura 8: Níveis de RNAm da VEGF do músculo tibial anterior (TA) de ratos, em que *: $p < 0,05$ corresponde as comparações intragrupos, ou seja, as diferenças significantes entre os grupos LI idoso em relação aos grupos CL, I e C idosos. As barras horizontais na porção superior da figura indicam as comparações intergrupos que apresentam diferenças estatísticas ($p < 0,05$), entre os grupos jovens e idosos.

Em relação à expressão gênica do VEGF RNAm os grupos LI idoso e CL idoso apresentaram aumento da expressão em relação ao grupo C idoso, sendo que o grupo LI idoso apresentou um aumento significativo. O grupo LI jovem apresentou um aumento da expressão do VEGF RNAm em relação ao grupo C jovem, e somente o grupo CL jovem apresentou uma diminuição da expressão em relação ao grupo C jovem.

4-DISCUSSÃO:

Esse estudo analisou o efeito da LTBI, com dose de $30\text{J}/\text{cm}^2$ e $\lambda=830\text{nm}$, sobre a regeneração muscular de ratos jovens e idosos através de mecanismos moleculares e celulares envolvidos no processo de regeneração. Os resultados mostraram aumento dos capilares sanguíneos e da expressão dos genes VEGF e MyoD, fatores essenciais para a regeneração muscular e para a melhora da estrutura do tecido muscular no idoso.

Atualmente a LTBI vem sendo amplamente utilizada na clínica (Amaral, 2001), vários trabalhos mostram a ação positiva da LTBI na regeneração muscular (Bibikova e Oron, 1994; Vieira et al., 2006; Moreira, 2008; Assis, 2008), porém são escassas as pesquisas que analisam os mecanismos pelo qual esta terapia interage com o tecido muscular durante a regeneração, principalmente em indivíduos idosos.

Assim neste trabalho foram realizadas análises para avaliar respostas celulares que podem explicar alguns mecanismos envolvidos na interação laser e tecido muscular. Porém, pelos aspectos morfológicos investigados apenas de forma qualitativa (figura 3), não foi demonstrado diferença no padrão de regeneração entre os músculos dos ratos jovens e idosos submetidos ao protocolo de criolesão e irradiação em relação ao que sofreram apenas criolesão.

Na análise morfométrica da área total e da área lesada foi possível verificar diferenças no padrão regenerativo para os grupos idosos e jovens. Os resultados mostraram que apenas os grupos jovens, criolesados e irradiados (figura 5), tiveram uma resposta positiva em relação à área lesada, pois houve uma diminuição da mesma. Nesse sentido, pode-se sugerir que a LTBI foi eficaz na regeneração muscular nos 5 dias de tratamento, ativando a proliferação e/ou diferenciação das células satélites recrutadas durante a fase inicial da regeneração (Ben-dov et al., 1991; Salvini, 2001).

Porém como este processo regenerativo no idoso é deficitário (Ehrhardt, 2005), sugerimos que é preciso avaliar tratamentos com diferentes tempos de irradiação laser.

A perda da integridade das miofibrilas e a capacidade regenerativa diminuída são as principais causas da atrofia muscular relacionada ao envelhecimento em associação com alterações da função das células satélites (Kim et al., 2005). A ativação das células satélites requer um controlado aumento na expressão dos FRMs e genes músculo-específicos (Marsh et al, 1997), fatores que encontram-se alterados nos músculos dos indivíduos idosos, apresentando elevação dos seus níveis de RNAm, porém sem ação eficaz (Always et al., 2001; Dedkov et al., 2003). Always et al., 2001, explica que a expressão gênica dos FRMs pode estar muito elevada no músculo idoso, não sendo possível aumentar mais, o que prejudica o processo de regeneração.

Recentemente, estudos prévios demonstraram um aumento dos marcadores moleculares relacionados com a regeneração muscular de ratos e camundongos jovens tratados com LTBI (Amaral, 2001; Moreira, 2008). Amaral et al, 2001, através dos lasers com λ de 685 e 830 nm com doses 0,6 e 0,3 J/cm² respectivamente, demonstrou um aumento da enzima lactato desidrogenase (LDH) e citrato sintase (CS), verificando que a terapia influenciou na função proliferativa e metabólica das células satélites durante a regeneração muscular. Moreira, 2008, mostrou que o laser diodo $\lambda=780\text{nm}$ apresentou efeito bioestimulatório das atividades celulares, aumentando a expressão gênica do MyoD em músculos lesados de camundongos, supondo com isso que houve ativação da proliferação celular durante a regeneração. O presente estudo, em ratos idosos, mostra que o tratamento com a LTBI exerceu influência sobre o aumento da expressão gênica do MyoD nos grupos I, CL e CI, hipotetizando que a irradiação laser ativa as células satélites quiescentes e as dirige para a fase inicial do ciclo celular,

mediando seus efeitos para a sua proliferação (Ben-dov et al., 1991; Shefer et al., 2002;), através também da regulação da expressão dos FRMs no músculo idoso.

Foi analisado os efeitos da LTBI sobre a expressão gênica da MyoD, por este gene iniciar a ativação da proliferação e diferenciação das células satélites durante a regeneração muscular (Marsh et al., 1997). As células satélites são essenciais para a regeneração, embora sua capacidade de proliferação esteja mantida durante o envelhecimento, sua quantidade e sua capacidade de diferenciação estão diminuídas, alteração causada pelo déficit da indução dos FRMs nas células satélites, ação crucial para este processo e para a transcrição de genes músculo-específicos (Degens, 2007; Moreira, 2008). Os resultados mostraram que a LTBI exerceu grande influência sobre a expressão RNAm da MyoD nos grupos idosos; porém visualizando a área lesada do músculo TA, podemos afirmar que o grupo LI jovem apresentou respostas positivas na regeneração muscular mais acentuadas do que no grupo LI idoso. Para isso, Degens, 2007, enfatiza que os níveis altos de RNAm das FRMs não necessariamente refletem a níveis altos de proteínas músculo-específicas.

A relação entre a regeneração muscular e o suprimento sanguíneo é muito importante (Wagatsuma et al., 2006), pois um suprimento sanguíneo adequado ajuda na migração das células satélites para o local da lesão (Germani et al., 2003). O VEGF é um fator angiogênico que desempenha importante papel no desenvolvimento vascular (Germani et al., 2003) e participa ativamente da regeneração muscular (Wagatsuma et al., 2006). Bryan et al., 2008, mostrou em seu estudo que o VEGF é coordenadamente regulado, aumentando sua expressão durante a miogênese, e verificou também que esse aumento do VEGF depende do fator de transcrição miogênico, o MyoD.

O gene VEGF tem um papel regulador importante na capilarização basal do tecido muscular e na atenuação da perda de motoneurônios em indivíduos idosos (Ryan

et al., 2006), ajudando na fusão das células satélites miogênicas para formar miotubos durante a regeneração (Arsic et al., 2004; Wagatsuma et al., 2006). Estudos mostram que a disfunção endotelial relacionada com a idade e a reduzida expressão de VEGF são possíveis mecanismos de redução da angiogênese idade-dependente (Taciro, 2007; Ryan et al, 2006), levando a um retardo na formação de capilares sanguíneos nos idosos (Germani et al., 2003).

Estudos confirmam a ação da LTBI na angiogênese através do aumento da expressão do VEGF (Braverman et al., 1989; Tuby et al., 2006; Moreira, 2008), do aumento da contagem de capilares sanguíneos (Bibikova e Oron, 1994; Taciro, 2007); e do aumento da expressão de células satélites (Ben-dov et al., 1991); assim como visto no presente estudo.

Por outro, houve uma diminuição dos vasos sanguíneos dos grupos LI quando comparados com o CL. Esta resposta pode ser explicada pela ação da LTBI na modulação da resposta inflamatória local através do seu efeito sistêmico, como: aumento da atividade superóxido dismutase (Kim et al., 2005), aumento de linfócitos e regulação das espécies reativas de oxigênio (ROS) (Vladimirov et al., 2004), mas são necessários estudos para elucidar melhor esta hipótese.

De acordo com a teoria fotoquímica da LTBI, a interação da radiação eletromagnética com os cromóforos da mitocôndria e a cascata bioquímica subsequente da fotoestimulação se dá principalmente num meio com o estado REDOX instável (Karu, 2005), e o presente estudo mostra que a ação da LTBI obteve uma melhor resposta no grupo LI idoso do que no grupo LI jovem para as análises dos níveis de mRNA da MyoD e VEGF. Verificamos que tivemos respostas importantes no grupo idoso tratado pela LTBI e acreditamos que o aumento da expressão gênica da MyoD e do VEGF além de ter influenciado no aumento dos capilares sanguíneos, diminuiu a

área lesada e aumentou a área total de secção transversa do músculo TA idoso no grupo LI, indicando que as células satélites entraram no programa genético músculo - específico, formando fibras musculares, substituindo as fibras lesadas decorrentes da criolesão e revertendo a atrofia muscular intrínseca ao envelhecimento.

Os grupos normais irradiados com laser foram realizados para verificar a ação da fotoestimulação em tecidos biológicos sem alterações metabólicas no caso do grupo jovem e com alterações metabólicas decorrentes do avanço da idade no grupo idoso (Tacirol, 2007). Os resultados mostram que houve aumento da expressão gênica da MyoD e da área total da secção transversa do músculo TA do idoso, possivelmente uma resposta positiva da regulação do FRM, o MyoD, formando fibras musculares perdidas na tentativa de reverter a atrofia muscular intrínseca ao envelhecimento. Apesar das respostas positivas com 5 dias de irradiação, acreditamos que mais dias de tratamentos com a LTBI são necessários para o músculo idoso ter uma resposta mais efetiva no processo de regeneração e atrofia muscular.

Assim, podemos concluir que a LTBI acelerou o processo de regeneração muscular após criolesão de ratos jovens e idosos, pois ativou a expressão dos genes MyoD e VEGF, provavelmente, aumentando a maturação das células satélites em mioblastos e miotubos e diminuindo a atrofia muscular dos ratos idosos irradiados, além de melhorar o suprimento sanguíneo durante este processo de regeneração.

As principais características do sistema músculo-esquelético durante o envelhecimento são a atrofia, a hipoperfusão sanguínea, levando a perda de força muscular, os quais pioram depois de lesões musculares, de hospitalizações e de períodos prolongados de reabilitação. Com isso, os resultados do presente estudo permitem supor que a LTBI poderá melhorar o processo de regeneração muscular no idoso, prevenindo as internações e seus longos períodos de reabilitação, proporcionando uma melhor

expectativa para o retorno deste individuo para as suas AVDs, além de diminuir os custos do tratamento.

5-REFERENCIAS:

ALWAYS, E.S.; LOWE A.D.; CHEN, D.K. The effects of age and hindlimb suspension on the levels of expression of the myogenic regulatory factors MyoD and myogenin in rats fast and slow skeletal muscles. **Experimental Physiology**. v. 86, p.509-517, 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, p.44–51, 2001.

AMARAL, A.C. Influência da terapia laser de baixa intensidade em células precursoras miogênicas (in vitro) e durante a regeneração muscular (in vivo). Dissertação de doutorado. Universidade Federal de São Carlos, 2001.

AMAT, A; RIGAU, J.; WAYNANT, R.W.; ILEV, I.K.; ANDERS, J.J. The electric field induced by light can explain cellular responses to electromagnetic energy: A hypothesis of mechanism. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v.82, p. 152-160, 2006.

ANDERSON, J.E. The satellite cell as a companion in skeletal muscle plasticity: currency, conveyance, clue, connector and colander. Review. **The Journal of Experimental Biology**. v. 209, p. 2276-2292, 2006.

ARRUDA, E.R.B.; RODRIGUES, N.C.; TACIRO, C.; PARIZOTTO, N.A. Influência de diferentes comprimentos de onda da laserterapia de baixa intensidade na regeneração

tendínea do rato após tenotomia. **Revista Brasileira de Fisioterapia**. v. 11, p. 283-288, 2007.

ARSIC, N.; ZACCHIGNA S, ZENTILI L, et al. Vascular Endothelial Growth Factor Stimulates Skeletal Muscle Regeneration In Vivo. **Molecular Therapy**. v.10, p. 844–854, 2004.

ASSIS, L.R. Laser de Baixa intensidade (830nm) na regeneração do músculo tibial anterior em ratos. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de São Carlos. Pós-Graduação em Fisioterapia, 2008.

BAXTER, G.D. Therapeutic lasers: theory and practice. 1994.

BEN-DOV, N.; SHEFER, G.; et al. Effects of photosensilization and low power helium-neon laser irradiation on liposomos and cell membranes. **Scanning Microsc**. v.5, p.1157-64, 1991.

[BIBIKOVA, A.](#); [ORON, U.](#); BELKIN, V. Enhancement of angiogenesis in regenerating gastrocnemius muscle of the toad (*bufo viridis*) by low-energy laser irradiation. [Anatomy and Embryology](#). v. 190, p. 597-602, 1994.

[BIBIKOVA, A.](#); [ORON, U.](#) Attenuation of the process of muscle regeneration in the toad gastrocnemius muscle by low energy laser irradiation. [Lasers Surg Med](#). v. 14(4), p. 355-61, 1994.

BIBIKOVA A, ORON U. Promotion of muscle regeneration in the toad (*Bufo viridis*) gastrocnemius muscle by low-energy laser irradiation. [The Anatomical Record](#). v. 235, p. 374 – 380, 1992.

BRAVERMAN, B.; Mc CARTHY, R.J.; IVANKOVICH, A.D. ; et al. Effect of helium-neon and infrared laser irradiation on wound healing in rabbits. **Laser Surg. Med.** v.9, p.50-88, 1989.

BRYAN, B.A.; WALSH, T.E.; MITCHELL, D.C.; HAVUMACH, J.S.; SAINT-GENIEZ M.; et al. Coordinated vascular endothelial growth factor expression and signaling during skeletal myogenic differentiation. **Molecular Biology of the Cell.** v. 19, p. 994-1006, 2008.

BUCHBERGER, A.; NOMOKONOVA, N.; ARNOLD, H.H. Myf5 expression in somites and limb buds of mouse embryos is controlled by two distinct distal enhancer activities. **Department of Cell and Molecular Biology**, Technical University of Braunschweig, p.3297-3307, 2003.

CARNAC G ET AL. RhoA GTPase and serum response factor control selectively the expression of MyoD without affecting Myf5 in Mouse Myoblasts. **Molecular Biology of the Cell.** v. 9, p. 1891-1902, 1998.

CAROLINA FMZ, MARCUS AFC, SARA TOS, KLEBER, GF. Differentiation of C2C12 myoblasts is critically regulated by FAK signaling. *Am. J. Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol.* Vol.289: pag.862-870, 2005.

CROSS, M.J.; DIXELIUS, J.; MATSUMOTO, T.; CLAESSION-WELSH, L. VEGF-receptor signal transduction. **Trends. Biochem. Sci.** v. 28, p. 488-494, 2003.

DEDKOV, L.E.; KOSTROMINOVA, Y.T.; BORISOV, B.A.; CARLSON, M.B. MyoD and myogenin protein expression en skeletal muscles of senile rats. **Cell Tissue Res.** v. 311, p. 401-416, 2003.

DEGENS H. Age-related skeletal muscle dysfunction: causes and mechanisms. **J Musculo skelet Neuronal Interact.** v.7(3), p. 246-252, 2007.

EHRHARDT A. Regenerative capacity of skeletal muscle. **Cur.r Opin. Neurol** , v.18, p. 548–553. 2005.

ENWEMEKA, C.S.; REDDY, K. The biological effects of laser therapy and other modalities on connective tissue repair process. **Laser Therapy.** v.12, p. 22-30, 2000.

GERMANI, A.; CARLO, A.D.; MANGONI, A.; STRAINO, S.; GIACINTI, C.; et al. Vascular Endothelial Growth Factor Modulates Skeletal Myoblast Function. **American Journal of Pathology.** v. 163, n. 4, October 2003.

GIGO-BENATO, D. et al. Low power laser boestimulation enhances nerve repairs after end-to-side neurorrhaphy: a double-blind randomized study in rat median nerve model. **Lasers Med. Sci.** v. 19, p. 57-65, 2004.

GIGO-BENATO, D.; GEUNA, S.; ROCHKIND, S. Phototherapy for enhancing peripheral nerve repair. A review of the literature. **Muscle nerve**. v. 31, p. 694-701, 2005.

GOGIA, P.P. Laser treatment. *Clinical Wound Management*. United States of America; Slack Incorporated. p.177-178, 1995.

HARMAN, D. The aging process. **Proc. Natl. Acad. Sci**. v. 78, p. 7124-7128, 1981.

HILL, M.; WERNIG, A.; GOLDSPIK, G. Muscle satellite (stem) cell activation during local tissue injury and repair. **J. Anat.** v. 203, n.1, p. 89-99, 2003.

HUARD, J.; LI, Y.; FU, H. F. Muscle injuries and repair: current trends in research. **J Bone Joint Surg Am**. v. 84, p. 822-832, 2002.

ISHIBASHI, J.; PERRY, R.L.; ASAKURA, A.; RUDNICKI, M.A. MyoD induces differentiation through cooperation of its NH² and COO-terminal regions. **The Journal of Cell Biology**. v.171: (3), p. 471-482, 2005.

JARVINEN, T.A.H. ; JARVINEN, T.L.N.; KAARIAINEN, M.; KALIMO, H.; JARVINEN, M. Muscle Injuries: Biology and Treatment. **The American Journal of Sports Medicine**. v. 33, n. 5, p. 745-763, 2005.

KARU, T. Cellular effects of low power laser therapy can be mediated by nitric oxide. **Laser Surg. Med**. v. 36(4), p. 307-314, 2005.

KARU T. Mechanics of interaction of monochromatic visible light with cells. **Proceedings of effects of low power light on biological systems**. 2630: 29, 1995.

KAWASAKI, K.; SHIMIZU, N. Effects of low-energy laser irradiation on bone remodeling during experimental tooth movement in rats. **Lasers in Surgery and Medicine**. v. 26, p. 282-291, 2000.

KIM, J.; KOSEK, D.J.; PETRELLA, J.K.; CROSS, J.M.; BAMMAN, M.M. Resting and load-induced levels of myogenic gene transcripts differ between older adults with demonstrable sarcopenia and young men and women. **J Appl Physio**. v. 99, p. 2149–2158, 2005.

LUGER, E.J. et al. Effect of low-power laser irradiation on the mechanical properties of bone fracture healing in rats. **Lasers in Surgery and Medicine**. v. 22, p. 97-102, 1998.

MARSH, D.R.; CRISWELL, D.S.; CARSON, J.A.; BOOTH, F.W. Myogenic regulatory factors during regeneration of skeletal muscle in young, adult and old rats. **J. Appl. Physiol**.v. 83, p. 1270-1275, 1997.

MATIELLO-SVERZUT, A.C. Artigo de revisão: Histopatologia do músculo esquelético no processo de envelhecimento e fundamentação para a prática terapêutica de exercícios físicos e prevenção da sarcopenia. **Revista de Fisioterapia da Universidade de São Paulo**. v. 10, n. 1, p. 24-33, Jan/Jun. 2003.

MINAMOTO, V.B.; BUNHO, S.R.; SALVINI, T.F. Regeneration rat skeletal muscle after periodic contusions. **J. Med. Biol. Res.** v.34, n.11, p.1447-52, 2001.

MOZDZIAK, P.E.; GREASER, M.L.; SCHULTZ, E. Myogenin, MyoD and myosin expression after pharmacologically and surgically induced hypertrophy. **J. Appl. Physiol.**v. 84(4), p. 1359-1364, 1998.

MOREIRA, O.S.M. Laser de baixa intensidade altera a expressão gênica da MyoD e Miogenina em músculos de camundongos. Dissertação de doutorado. Universidade Federal de São Carlos. Departamento de Fisioterapia 2008.

MORRONE, A.; GUZZARDELA, G.A.; ORIENTI, L.; GIAVARESI, G.; FINI, M.; et al. Muscular trauma treated with a Ga-Al-As diode laser: in vivo experimental study. **Lasers Med. Sci.** v. 13, p. 293-298, 1998.

MUSARO ET AL. Enhanced expression of myogenic regulatory genes in aging skeletal muscle. **Experimental Cell Research.** v. 221, p.241-248, 1995.

OLIVEIRA, D.M.G. Índices plasmáticos de interleucina-6, força muscular e capacidade funcional em idosas da comunidade [manuscrito]. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional. 2007.

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

OMS, 2007, acessado em: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Idoso>

ORTIZ, M.C.S.; CARRINHO, P.M.; SANTOS, A.S.; GONÇALVES, R.C. PARIZOTTO, N. A. Laser de baixa intensidade: princípios e generalidades – parte 1. **Fisioterapia Brasil**. v. 2, n. 4, Julho/Agosto, 2001.

PARIZOTTO, N.A.; BARANAUSKAS, V. Strutral analysis of collagen fibrils after He-Ne laser photostimulated regenerating rat tendon. **Proceeding 2o Congress World Association for Laser therapy**. Sept 2-5, p. 66-67, 1998.

PEREIRA, N.A.; EDUARDO, P.C.; MATSON, E.; MARQUES, M.M. Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. **Lasers in Surgery and Medicine**. v. 31, p. 263-267, 2002.

PEVIANI, S.M.; GOMES, A.R.S.; MOREIRA, R.F.C.; et al. Short bouts of stretching increase myo-d, myostatin and atrogin-1 in rat soleus muscle. **Muscle Nerve**. v. 35: p. 363–370, 2007.

RYAN, N.A.; ZWETSLOOT, K.A.; WESTERKAMP, L.M.; RICKNER, R.C.; POFAHL, W.E.; et al. Lower skeletal muscle capillarization and VEGF expression in aged vs. young men. **J Appl Physiol**. v. 100, p. 178–185, 2006.

SABOURIN, L.A.; RUDNICKI, M.A. The molecular regulation of myogenesis. **Clinical Genetics**. v. 57, p.16-25, 2000.

SALVINI, T.F. Regeneration and change of the muscle fiber types after injury induced by a hemorrhagic fraction isolated from *Agkistrodon contortrix* Laticinctus venom. **Toxicol**. v.39, p.641-649, 2001.

SHEFER, G.; PARTRIDGE, T.A.; HESLOP, L.; GROSS, J.G.; et al. Low-energy laser irradiation promotes the survival and cell cycle entry of skeletal muscle satellite cells. **Journal of Cell Science**. v.115(7), p.1461- 1469, 2002.

SHI, X.; GARRY, D. Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. **Genes & Dev**. v. 20, p.1692-1708, 2006.

TACIRO C. Ação do envelhecimento e da dose energética na fotobiomodulação laser de baixa intensidade na regeneração tendínea. Dissertação de mestrado apresentada à coordenação do programa de pós-graduação em fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos, 2007.

TANG, X.M.; CHAI, B.P. Effect of CO₂ laser irradiation on experimental fracture healing: a transmission electron microscopic study. **Lasers in Surgery and Medicine**. v. 6, p. 346-352, 1986.

TIDBALL, J.G. Inflammatory processes in muscle injury and repair. **Am. J. Physiol.** v. 288, p. 345-353, 2005.

TRELLES, M.A.; MAYAYO, E. Bone fracture consolidates faster with low power laser. **Lasers in Surgery and Medicine.** v. 7, p. 36-45, 1987.

TUBY, H.; MALTZ, L.; ORON, U. Modulation of VEGF and iNOS in the rat heart by Low Level Laser Therapy are associated with cardio protection and enhanced angiogenesis. **Laser Surg. Med.** v. 38, 7, p.682-688, 2006.

VIEIRA, W.H.B.; GOES, R.; COSTA, F.C.; et al. Adaptação enzimática da LDH em ratos submetidos a treinamento aeróbio em esteira e laser de baixa intensidade. **Rev. bras. fisioter.** v. 10, n. 2, p.205-211, 2006.

VLADIMIROV, Y.A.; OSIPOV, N.A.; KLEBANOV, G.I. Photobiological Principles of Therapeutic Applications of Radiation. **Biochemistry.** v. 69, no. 1, p. 81-90, 2004.

WAGATSUMA, A.; TAMAKI, T.; OGITA, F. Sequential Expression of Vascular Endothelial Growth Factor, Flt-1, and KDR/Flk-1 in Regenerating Mouse Skeletal Muscle. **Physiol. Res.** v. 55, p. 633-640, 2006.

WEISS, N.; ORON, U. Enhancement of muscle regeneration in the rat gastrocnemius muscle by low energy laser irradiation. **Anatomy and Embryology.** v. 186, p. 497-503, 1992.

ZHAO, P.; HOFFMAN, E.P. Musculin isoforms and repression of MyoD in muscle regenerative. **Biochemical and Biophysical Research Communication**. v. 342: p. 835-842, 2006.