

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

ANDRÉ CAPALDO AMARAL

**INFLUÊNCIA DA TERAPIA LASER DE BAIXA INTENSIDADE EM
CÉLULAS PRESURSORAS MIOGÊNICAS (*IN VITRO*) E DURANTE
A REGENERAÇÃO MUSCULAR (*IN VIVO*)**

SÃO CARLOS
2004

ANDRÉ CAPALDO AMARAL

**INFLUÊNCIA DA TERAPIA LASER DE BAIXA INTENSIDADE EM
CÉLULAS PRESURSORAS MIOGÊNICAS (*IN VITRO*) E DURANTE
A REGENERAÇÃO MUSCULAR (*IN VIVO*)**

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos como requisito à obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Profa. Dra. Tânia de Fátima Salvini

São Carlos
2004

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

A479it

Amaral, André Capaldo.

Influência da terapia laser de baixa intensidade em células precursoras miogênicas (*in vitro*) e durante a regeneração muscular (*in vivo*) / André Capaldo Amaral . -- São Carlos : UFSCar, 2004.

121 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2004.

1. Medicina experimental - rato. 2. Laser de baixa potência. 3. Células precursoras miogênicas. 4. Regeneração muscular. 5. Bioestimulação. 6. Fotobiomodulação. I. Título.

CDD: 619.93 (20^a)

Dedico o fruto deste trabalho à minha família, que serviu de fonte de incentivo para a conquista deste desafio.

Agradecimentos

A Deus.

Aos meus pais, avós, irmãos, cunhados e sobrinhos pelo carinho e incentivo.

A minha querida esposa Luciana, por toda dedicação, paciência e companheirismo.

A Professora Tânia F Salvini, pela orientação, apoio e confiança.

Aos Professores Anselmo S. Moriscot, Heloísa S. S. de Araújo, Nivaldo A. Parizotto, Maria Luiza B Schwantes, Creuza S. Tahara e Daniel C. Amaral pela inestimável colaboração durante o desenvolvimento desta tese.

Aos amigos Carlos R. Grazziano, Thiago Russo, Daniela Z. Paro, Fernando A. J. Jorge, Raquel A. Mesquita, Cristina Terrugi, Elaine L Guimarães e Antônio Garcia que, direta ou indiretamente, colaboraram para que mais esta conquista se realizasse.

Às empresas IBRAMED e DMC pelo fornecimento dos equipamentos utilizados nesta pesquisa.

A todos o meu muito obrigado!

Resumo

A terapia LASER de baixa intensidade (TLBI) constitui um dos recursos mais utilizados pelos fisioterapeutas com o intuito de estimular o processo de reparo do tecido muscular esquelético. Em contrapartida à intensa utilização, seus respectivos mecanismos de ação e sua efetividade terapêutica não se encontram cientificamente comprovados. Com base nesse contexto, elaboramos a presente pesquisa com o objetivo de investigar a influência exercida pela TLBI, nos comprimentos de onda (λ) frequentemente utilizados na prática clínica (670, 685 e 830 nm), sob a função das células precursoras mio gênicas (CPMs), responsáveis diretas pelo processo de regeneração tecidual. A fase inicial foi realizada por meio de experimentos *in vitro*, determinando as alterações desencadeadas pelas radiações sobre a capacidade de proliferação e diferenciação celular. As CPMs utilizadas encontravam-se na 2ª passagem, após terem sido extraídas dos músculos de ratos Wistar com 4 dias após o nascimento. Para analisar a proliferação foi elaborada, para cada λ , uma curva dose-resposta compreendendo o grupo controle, constituído por células não irradiadas, e os grupos irradiados com as doses de 0,3, 0,6, 0,9, 1,2 e 1,5 J/cm². Esse procedimento foi realizado com as células sob influência de 5 ou 10 % de soro fetal bovino (SFB). A dose demonstrando a maior efetividade sobre a proliferação celular em cada radiação foi utilizada para estabelecer a influência sobre o processo de diferenciação celular, investigada por meio da análise da expressão dos genes relacionados as isoformas IIa e IIx da cadeia pesada de miosina (MHC). A fase final da pesquisa foi direcionada a avaliar a ação das radiações, nos mesmos parâmetros dosimétricos previamente utilizados, sobre o processo de regeneração muscular *in vivo* após criolesão induzida no músculo tibial anterior de ratos Wistar adultos. Foram avaliados os aspectos histológicos, histoquímicos para a enzima Succinato Desidrogenase (SDH) e a atividade das enzimas Lactato Desidrogenase (LDH) e Citrato Sintase (CS). Os resultados demonstraram que as radiações nos λ de 670, 685 e 830 nm proporcionaram um aumento de 56,8, 70,6 e 84,8 % na taxa de proliferação das CPMs. Esses valores foram alcançados com as respectivas doses 1,2, 0,6 e 0,3 J/cm² e com as células sobre a influência de 5% de SFB. A maior concentração de soro determinou um efeito bioestimulante menos pronunciado, com elevação de 13,6, 17,5 e 10,9 % respectivamente. Em relação à taxa de expressão das isoformas de MHC foi demonstrado que houve uma significativa diminuição da isoforma IIa, pela ação da radiação de 685 nm, e uma elevação da isoforma IIx, pela ação das radiações de 685 e 830 nm, em relação às células não irradiadas. A análise *in vivo* demonstrou a capacidade das radiações nos λ de 685 e 830 nm em elevar a atividade das enzimas LDH e CS durante o processo de regeneração muscular. Conjuntamente os resultados permitem atribuir à TLBI uma capacidade λ e dose-dependente de influenciar a função proliferativa e o metabolismo das CPMs. Porém, não foi possível inferir seu efeito sobre o processo de diferenciação celular em virtude do efeito inverso sobre a expressão das isoformas de MHC.

Abstract

The Low Intensity Laser Therapy (LILT) constitutes one of the resources most used by physical therapists, with the goal of stimulating the process of repairing the skeleton muscle tissue. On the other hand, the intense utilization, its respective action mechanisms and therapeutic effectiveness are not scientifically proved. Based on this, we elaborated the present study aiming to investigate the influence of the LILT, at wavelengths (λ) usually used at clinical practices (670, 685 and 830 nm), on the function of the Myogenic Precursor Cells (MPCs), directly responsible for the tissue regeneration process. The beginning phase was carried out throughout *in vitro* experiments, determining the alterations started by radiations over the proliferation ability and the cellular differentiation. The MPCs used were in the second passage, after had been extracted from four days old Wistar rats. To analyze the proliferation, it was elaborated, for each λ , a dose-response data curve including the control group constituted of non-radiated cells, and the irradiated groups with doses of 0.3; 0.6; 0.9; 1.2; and 1.5 J/cm². This procedure was carried out with the cells under the influence of 5 or 10% of fetal bovine serum (FBS). The dose demonstrating the highest effectiveness on the cellular proliferation in each radiation, was used to establish the influence on the process of cellular differentiation, and investigated throughout the analysis of the expression of the genes related to the isoforms IIa and IIx of the myosin heavy chain (MHC). The final phase of the study was pointed towards the radiation action evaluation, at the same dose parameters used before, on the muscle regeneration process *in vivo*, after induced cryoscopy lesion at the Tibialis anterior muscles of adults Wistar rats. There were evaluations of the histological, histochemical aspects for the Succinic Dehydrogenase enzyme (SDH) and the activity of the Lactate Dehydrogenase enzymes (LDH) and Citrate Sintase (CS). The outcomes demonstrated that the radiation at λ of 670, 685 and 830 nm promoted an increase of 56.8, 70.6 and 84.8 % on the proliferate ability of the PMCs. These values were achieved with the 1.2, 0.6 and 0.3 J/cm² doses respectively, and with the cells under the influence of 5% of FBS. The highest concentration of serum (10% of FBS) determined a less pronounced bio-stimulating effect, rising only 13.6, 17.5 and 10.9 %, respectively. In relation to the MHC isoforms expression rate, it showed that there was a significant fall of the IIa isoform, due to the action of the 685 nm, and an increase of the IIx isoform, due to the action of the 685 and 830 nm radiations, in relation to the non-radiated cells rate. By means of *in vivo* analysis, it was possible to demonstrate the ability of radiation at λ of 685 and 830 nm on increasing DHL enzymes and CS during the muscle regeneration process. Therefore, according to the outcomes it is allowed to attribute to the LILT an ability λ and dose-dependent of influencing the proliferation function and the metabolism of the MPCs. It was not possible to infer its effect on the cellular differentiation process, because of the inverted effect on the MHC isoforms expression, though.

Índice de Figuras

Figura 1: Equipamento contendo os diodos responsáveis pela emissão das radiação LASER nos λ de 685 e 830 nm. A radiação é seletivamente emitida por meio de uma fibra ótica (seta).....	36
Figura 2: Equipamento contendo o diodo responsável pela emissão de radiação LASER no λ de 670 nm. É possível visualizar a adaptação da fibra ótica (seta) realizada na extremidade da probe de emissão (*).	37
Figura 3: Plataforma para irradiação das CPMs no interior do fluxo laminar. Constitui-se de uma base para o posicionamento das placas (seta branca) e de um sistema de hastes para a fixação da probe de emissão de radiação (seta azul).	39
Figura 4: Superfície da base da plataforma de irradiação exibindo a marcação em forma de grade e o quadrado preto que representa o ponto de incidência do feixe da radiação (seta branca). Nota-se, ainda, a fixação da probe de emissão no sistema de hastes, responsável pelo ajuste e manutenção do seu posicionamento (seta azul).....	40
Figura 5: Posicionamento da placa de cultura celular sobre a plataforma para a realização da irradiação das CPMs contidas nos poços das placas de cultura.	41
Figura 6: Esquema de irradiação das células no interior do fluxo laminar. A luz ambiente foi mantida desligada durante estes procedimentos.	42
Figura 7: Adaptação de um anteparo (seta) à extremidade das probes de emissão para a manutenção da distância entre elas e a pele dos animais durante as irradiações.....	52
Figura 8: Curva padrão (DO/cel.) demonstrando os valores da DO, obtidos por meio do método colorimétrico MTT-formazana, das amostras contendo contingentes celulares de CPMs pré determinados.	58
Figura 9: Análise estatística de regressão polinomial quadrática representando a correlação entre os valores de DO e número de células da curva DO/cél. São demonstrados ainda a equação de conversão e o coeficiente de determinação.....	59
Figura 10: Distribuição dos resíduos referentes à análise de regressão polinomial quadrática que representa a correlação entre os valores de DO e número de células da curva DO/cel. Observa-se uma distribuição aleatória dos valores, com exceção do ponto correspondente ao limite superior da curva.	59
Figura 11: Efeito dose-dependente da radiação LASER no λ de 670 nm sobre a proliferação celular de CPMs mantidas em meio de cultura suplementado com 10% de SFB. São apresentados os valores da média e desvio padrão do contingente celular das réplicas nos grupos experimentais 24h após a irradiação. * $p \leq 0,02$ em relação ao controle não irradiado.	61
Figura 12: Representação sob a forma de taxa de proliferação celular do efeito dose-dependente da radiação LASER no λ de 670 nm sobre cultura de CPMs mantidas em meio de cultura celular suplementado com 10% de SFB.	61
Figura 13: Efeito dose-dependente da radiação LASER no λ de 670 nm sobre a proliferação celular em cultura de CPMs mantidas em meio de cultura suplementado com 5% de SFB. São apresentados os valores da média e desvio padrão do contingente celular das réplicas nos grupos experimentais 24h após a irradiação. ** $p \leq 0,0001$ em relação ao controle não irradiado.	62
Figura 14: Representação sob a forma de taxa de proliferação celular do efeito dose-dependente da radiação LASER no λ de 670 nm sobre cultura de CPMs mantidas em meio de cultura celular suplementado com 5% de SFB..	63

Figura 15: Efeito dose-dependente da radiação LASER no λ de 685 nm sobre a proliferação celular em cultura de CPMs mantidas em meio de cultura suplementado com 10% de SFB. São apresentados os valores da média e desvio padrão do contingente celular das réplicas nos grupos experimentais 24h após a irradiação. ** $p \leq 0,001$ em relação ao controle não irradiado.	64
Figura 16: Representação sob a forma de taxa de proliferação celular do efeito dose-dependente da radiação LASER no λ de 685 nm sobre cultura de CPMs mantidas em meio de cultura celular suplementado com 10% de SFB.	65
Figura 17: Efeito dose-dependente da radiação LASER no λ de 685 nm sobre a proliferação celular em cultura de CPMs mantidas em meio de cultura suplementado com 5% de SFB. São apresentados os valores da média e desvio padrão do contingente celular das réplicas nos grupos experimentais 24h após a irradiação. ** $p \leq 0,0001$ em relação ao controle não irradiado.	66
Figura 18: Representação sob a forma de taxa de proliferação celular do efeito dose-dependente da radiação LASER no λ de 685 nm sobre cultura de CPMs mantidas em meio de cultura celular suplementado com 5% de SFB.	66
Figura 19: Efeito dose-dependente da radiação LASER no λ de 830 nm sobre a proliferação celular em cultura de CPMs mantidas em meio de cultura suplementado com 10% de SFB. São apresentados os valores da média e desvio padrão do contingente celular das réplicas nos grupos experimentais 24h após a irradiação. ** $p \leq 0,0002$ em relação ao controle não irradiado.	67
Figura 20: Representação sob a forma de taxa de proliferação celular do efeito dose-dependente da radiação LASER no λ de 830 nm sobre cultura de CPMs mantidas em meio de cultura celular suplementado com 10% de SFB.	68
Figura 21: Efeito dose-dependente da radiação LASER no λ de 830 nm sobre a proliferação celular em cultura de CPMs mantidas em meio de cultura suplementado com 5% de SFB. São apresentados os valores da média e desvio padrão do contingente celular das réplicas nos grupos experimentais 24h após a irradiação. ** $p \leq 0,0001$ em relação ao controle não irradiado.	69
Figura 22: Representação sob a forma de taxa de proliferação celular do efeito dose-dependente da radiação LASER no λ de 830 nm sobre cultura de CPMs mantidas em meio de cultura celular suplementado com 5% de SFB.	69
Figura 23: Representação dos valores referentes a média e desvio padrão da quantidade de RNA total (em μg) extraída das amostras dos grupos controle e irradiados após a indução do processo de diferenciação celular. * $p = 0,01$ em relação ao controle não irradiado.	72
Figura 24: Padrão eletroforético das amostras de RNA total extraídas das culturas de CPMs 5 dias após irradiação e indução do processo de diferenciação celular. São verificadas as 2 bandas referentes aos componentes 28 S e 18 S do RNA ribossomal. Constata-se ainda a ausência de corante nos poços (seta).	74
Figura 25: Padrão eletroforético das amostras de cDNA, resultantes da reação de transcriptase reversa, evidenciando o padrão característico de arraste (seta).	74
Figura 30: Valores de CT-GAPDH ($M \pm SD$) dos grupos controle e submetidos a radiação laser nos λ de 670, 685 e 830 nm.	80
Figura 31: Valores de $\Delta\text{CT MHC-IIa/GAPDH}$ ($M \pm SD$) dos grupos controle e submetidos a radiação laser nos λ de 670, 685 e 830 nm. * $p = 0,0005$ em relação ao grupo controle.	81
Figura 32: Valores de $\Delta\text{CT MHC-IIx/GAPDH}$ ($M \pm SD$) dos grupos controle e submetidos a radiação laser nos λ de 670, 685 e 830 nm. * $p \leq 0,006$ em relação ao grupo controle.	82

- Figura 33: Secções transversais seriadas da região média do músculo TA do rato 7 dias após a indução da criolesão. A) Coloração com Azul de Toluidina evidenciando o sítio de lesão na região superficial do músculo (asterisco), a região constituída por fibras intactas (estrela) e a interface entre as duas regiões (seta azul). São identificadas, também, pequenas fibras em regeneração próximo à interface (seta branca) e o acúmulo de células mononucleadas na região mais superficial do músculo (seta vermelha). B) Reação enzimática para SDH demonstrando concentrações distintas de mitocôndrias nas fibras musculares intactas, distribuídas, em relação a esse aspecto, com um padrão pouco homogêneo pela região profunda do músculo (asterisco). As reações mais intensas nessa região denotam fibras com elevada quantidade de mitocôndrias em seu citosol (seta). Na região correspondente ao sítio de lesão, próximo à interface, evidencia-se o padrão da reação enzimática apresentado pelas fibras em regeneração, exibindo uma intensidade intermediária de reação um aspecto homogêneo em sua distribuição (estrela). 400X87
- Figura 34: Secções transversais seriadas da região média do músculo TA do rato 7 dias após a indução da criolesão. A) Coloração com Azul de Toluidina evidenciando a interface entre o sítio de lesão e a região intacta do músculo (seta). As fibras intactas são caracterizadas por uma maior área de secção transversa, formato poligonal e núcleo periférico (asterisco). As fibras em regeneração apresentam aspecto basofílico, núcleo centralizado e menor área de secção transversa (estrela). B) Reação enzimática para SDH demonstrando a densidade mitocondrial das fibras intactas (asterisco) e a alteração do padrão de reação das fibras em regeneração (estrela). 850X88
- Figura 35: Valores referentes à média e desvio padrão da atividade da enzima CS mensurada nos grupos controle, placebo e irradiados com os λ de 670, 685 e 830 nm. * $p = 0,006$ e ** $p \leq 0,0002$ em relação ao grupo placebo.91
- Figura 36: Valores referentes à média e desvio padrão da atividade da enzima LDH, na presença de substrato à concentração de 1mM, mensurada nos grupos controle-controle, placebo e irradiados com os λ de 670, 685 e 830 nm. * $p = 0,04$ e ** $p = 0,0002$ em relação ao grupo placebo.....92
- Figura 37: Valores referentes à média e desvio padrão da atividade da enzima LDH, na presença de substrato à concentração de 10mM, mensurada nos grupos controle-controle, placebo e irradiados com os λ de 670, 685 e 830 nm. * $p = 0,01$ e ** $p = 0,003$ em relação ao grupo placebo.....94

Índice de Tabelas

- Tabela 1: Valores resultantes da análise espectrofotométrica sob luz ultravioleta do RNA total extraído das amostras pertencentes ao grupo controle e irradiado com os λ de 670, 685 e 830 nm. São apresentadas as relações entre a DO260/DO280 nm, a quantidade de RNA total das amostras e a média (X) e desvio padrão (SD) destes valores para cada grupo experimental. 72
- Tabela 2: Valores de CT para GAPDH, MHC-IIa e MHC-IIx das amostras pertencentes ao grupo controle e irradiado com os λ de 670, 685 e 830 nm adquiridas após a reação de RT-PCR. São apresentados ainda os valores de média (X) e desvio padrão (SD) para o CT do GAPDH em cada grupo e os valores individuais, M e SD em cada grupo relacionados à normalização (Δ CT) para cada isoforma de MHC..... 79
- Tabela 3: Massa corporal inicial e final, perda de massa corporal e massa do músculo TAD dos animais destinados à análise qualitativa histológica e histoquímica do padrão de regeneração muscular.....84
- Tabela 4: Dados referentes ao valor individual das amostras, média (X) e desvio padrão (SD) da massa corporal inicial e final, perda percentual de massa corporal e massas dos músculos TAD e TAE dos animais destinados à análise da atividade das enzimas CS e LDH. 89
- Tabela 5: Dados referentes ao valor individual das leituras (triplicata), média (X) e desvio padrão (SD) da atividade das enzimas CS e LDH, nas concentrações de 1 e 10 mM de substrato, do *pool* das amostras dos músculos intactos (controle), placebo e irradiados com os λ de 670, 685 e 830 nm. 90
- Tabela 6: Relação entre o valor médio da atividade da enzima LDH nas concentrações de 1 e 10 mM (LDH-1/LDH-10) e LDH na concentração de 1 mM e CS (LDH-1/CS) do *pool* das amostras dos músculos intactos (controle-controle), placebo e irradiados com os λ de 670, 685 e 830 nm. 94

Sumário

Dedicatória	2
Agradecimentos	3
Resumo	4
Abstract	5
Lista de abreviaturas	6
Índice de figuras	7
Índice de tabelas	10
Sumário	11
1 Introdução	12
1.1 Miogênese	12
1.2 Fibra muscular esquelética adulta	15
1.3 Células Satélite	15
1.4 Plasticidade do tecido muscular	18
1.5 Lesão e regeneração do tecido muscular esquelético	18
1.6 Fisioterapia nas lesões musculares	23
1.7 Conceituação e histórico do uso radiação LASER para fins terapêuticos	24
1.8 Bases físicas da radiação LASER	25
1.9 Interação da radiação LASER com os tecidos biológicos	26
1.10 Terapia LASER de baixa intensidade	27
2 Objetivos	31
3 Material e métodos	32
3.1 Análise <i>in vitro</i>	33
3.1.1 Cultura celular	33
3.1.2 Condições ambientais no acondicionamento celular	35
3.1.3 Emissores de radiação	35
3.1.4 Plataforma para irradiação	38
3.1.5 Procedimento de irradiação	40
3.1.6 Taxa de proliferação celular	42
3.1.7 Taxa de diferenciação celular	45
3.2 Análise <i>in vivo</i>	50
3.2.1 Animais	50
3.2.2 Protocolo de Criolesão	50
3.2.3 Grupos experimentais	51
3.2.4 Protocolo de irradiação	51
3.2.5 Análise histológica e histoquímica	53
3.2.6 Dosagem da atividade das enzimas CS e LDH	54
3.3 Análise Estatística	57
4 Resultados	58
4.1 Análise <i>in vitro</i>	58
4.1.1 Taxa de proliferação celular	58
4.1.2 Taxa de diferenciação celular	71
4.2 Análise <i>in vivo</i>	84
4.2.1 Análise histológica e histoquímica	84
4.2.2 Dosagem da atividade das enzimas CS e LDH	89
5 Discussão	97
6 Conclusões	109
6.1 Experimentos <i>in vitro</i>	109
6.2 Experimentos <i>in vivo</i>	110
7 Referências Bibliográficas	111

1 Introdução

1.1 Miogênese

Todas as células teciduais diferenciadas do nosso organismo são originadas a partir de pequenos grupos de células indiferenciadas denominadas células tronco (para revisão ler MOORE, 1979). Essas células primordiais apresentam como características básicas uma alta taxa de proliferação e a capacidade de se diferenciar, dentro de linhagens específicas, em células pós-mitóticas diferenciadas. Assim sendo, tem-se bem estabelecidas as funções dessas células para originar, renovar e reparar as populações de células teciduais.

As células primordiais responsáveis pela formação do tecido muscular estriado esquelético apresentam origem embrionária no mesoderma paraxial e passam a coexistir, dentro do somito, com demais células primordiais relacionadas à gênese de outros tecidos como o conjuntivo, ósseo e cartilaginoso (BÜSCHER & BELMONTE, 1999). Essas células precursoras são caracterizadas por serem mononucleadas e, como visto, indiferenciadas dentro de toda a linhagem de células miogênicas. Pesquisas recentes demonstram a possibilidade da participação de células progenitoras indiferenciadas endoteliais na constituição do contingente celular miogênico, caracterizando a existência de uma via alternativa na miogênese embrionária (DeANGELIS et al., 1999; HAWKE & GARRY, 2001).

O processo de citodiferenciação, a partir dessas células precursoras mesenquimais, até a formação de mionúcleos nas células musculares adultas apresenta, pelo menos, mais dois estágios celulares bem definidos, o pré-mioblasto e o mioblasto. As células nesses estágios intermediários já são caracterizadas com estruturas diferenciadas dentro da linhagem miogênica. Tal

característica é responsável pelo surgimento do termo freqüentemente utilizado para determiná-las, células precursoras miogênicas (CPMs).

Os pré-mioblastos são células mononucleadas apresentando um formato fusiforme e, ainda, exibem características de células indiferenciadas. Sua capacidade proliferativa permite que desempenhe, além de seu papel na formação e crescimento tecidual, um importante e comprovado papel no processo de regeneração muscular (MAURO, 1961; CARLSON & FAULKNER, 1983; SEALE & RUDNICKI, 2000). Seus descendentes imediatos, os mioblastos, são frutos do processo de diferenciação terminal. Também são células mononucleadas e fusiformes, porém seu núcleo em fase pós-mitótica torna impossível a proliferação. Essa interrupção na replicação de DNA, associada à capacidade de fusão dos mioblastos e transcrição de genes músculo-específicos, constitui um passo fundamental no processo de morfogênese do tecido muscular. Os mioblastos já apresentam alterações estruturais e funcionais características de quase todas as suas organelas citoplasmáticas, como, por exemplo, a presença do complexo polirribossomal elicoidal que sintetiza as moléculas de miosina, necessárias para o início do processo de miofibrillogênese (CARLSON & FAULKNER, 1983; FISHMAN, 1986).

A progressão de uma célula mesenquimal, por meio dos estágios de determinação, proliferação, citodiferenciação e ativação do programa genético músculo-específico, é regulada pela expressão orquestrada de fatores de transcrição (FT) específicos, conjuntamente conhecidos como fatores regulatórios miogênicos (FRMs). Entre eles destacam-se os membros da família Myo-D, representada pelos fatores Myo-D, myf-5, MRF-4 e miogenina. O papel específico de cada um desses FT sobre a miogênese, assim como durante a regulação gênica das células maduras, tem sido alvo de investigação, tendo em vista a incompleta compreensão de suas funções (HAWKE & GARRY, 2001). Acredita-se que os fatores Myo-D e myf-5 estejam relacionados aos processos de determinação e proliferação das CPMs, sendo os demais

relacionados à fase de diferenciação terminal e fusão (CORNELISON & WOLD, 1997; SEALE & RUDNICKI, 2000).

Em consequência da fusão dos mioblastos, tem-se a formação de células multinucleadas, cilíndricas e alongadas chamadas miotubos (FISHMAN, 1986). Estas estruturas estão fundamentalmente relacionadas à síntese das proteínas contráteis e sua organização em subestruturas denominadas miofibrilas. Seus núcleos estão dispostos centralmente e apresentam citoplasma abundante com nucléolo proeminente, que são características histológicas típicas de células envolvidas em síntese protéica (CARLSON, HANSEN-SMITH, MAGON, 1979). A quantidade de núcleos nos miotubos é progressivamente maior, tendo em vista que o processo de fusão de novos mioblastos perdura até a fase de maturação do músculo. Miotubos em fase avançada de desenvolvimento apresentam grande quantidade de seu citoplasma ocupado pelas miofibrilas, que associado à continuidade do processo de miofibrilogênese, fazem que os núcleos sejam deslocados progressivamente para a periferia. A finalização da citodiferenciação dos miotubos em miofibras maduras envolve a obtenção definitiva da posição subsarcolêmica (periférica) por parte dos núcleos, agora denominados mionúcleos. Além disso, os mionúcleos apresentam, ainda, um volume reduzido e seu nucléolo mais compacto.

As miofibras representam o fim do processo de citodiferenciação, porém seu desenvolvimento estrutural e funcional ainda não foi concluído. Os processos de formação de sua lâmina basal, sua vascularização e ancoragem ao sistema ósteo-articular prosseguem. Por fim, sua inervação, representada por um motoneurônio específico, e o ambiente ao qual a fibra muscular é submetida determinam sua diferenciação funcional. Vale a pena ressaltar que essa maturidade funcional é adquirida somente após as primeiras semanas de desenvolvimento pós-natal, tendo em vista que, nos estágios iniciais do processo de inervação, as fibras musculares são poliinervadas e, portanto, ainda indiferenciadas (BROWN, HOLLAND, HOPKINS, 1981).

1.2 Fibra muscular esquelética adulta

As fibras musculares esqueléticas adultas são células cilíndricas e alongadas que, juntamente com o tecido conjuntivo e neural associado, constituem o tecido muscular esquelético. Essas células são caracterizadas por serem polinucleadas e seus núcleos, também denominados mionúcleos, por localizarem-se periféricamente, mantendo íntimo contato com a membrana citoplasmática (sarcolema). O citosol dessas células, assim como a maioria de suas organelas citoplasmáticas, é escasso (LIEBER, 1992).

As proteínas contráteis organizam-se em estruturas denominadas sarcômeros, que representam a unidade funcional básica do processo contrátil. A associação em série desses sarcômeros formam as miofibrilas, que compreendem os componentes mais abundantes no sarcoplasma das fibras musculares. A presença e disposição das proteínas contráteis no interior dos sarcômeros conferem às fibras um aspecto estriado.

1.3 Células Satélite (CS)

As CS são pequenas células mononucleadas presentes no músculo esquelético adulto. Essas células, características dos mamíferos e da maioria dos vertebrados, localizam-se em íntimo contato com a periferia das fibras musculares, porém são completamente independentes. Elas foram inicialmente descobertas com estudos utilizando microscopia ótica, mas a confirmação de sua existência como unidade independente, suas características estruturais e a sua verdadeira relação com a fibra muscular só ocorreram após estudos com microscopia eletrônica realizados por Andreas Mauro (1961). Essas células são caracterizadas por um corpo celular e várias projeções citoplasmáticas que lhe conferem um formato fusiforme. Apresentam um núcleo celular grande e heterocromático, citoplasma escasso e poucas organelas citoplasmáticas. Encontram-se intimamente relacionadas à fibra muscular, localizadas na sua periferia no interior

de pequenas fendas presentes no plasmalema. Uma das características mais importantes das CSs, que as diferenciam das demais células mononucleadas do tecido muscular íntegro, é sua posição sub-laminar (MAZANET & FRANZINI-ARMSTRONG, 1986).

As CS encontram-se equilibradamente distribuídas ao longo dos músculos, não havendo diferenças significativas entre as regiões proximal, média e distal das fibras musculares (MARUENDA & ARMSTRONG, 1978). Porém, estudos mais detalhados das fibras musculares evidenciam concentrações ligeiramente aumentadas próximo a estruturas específicas, tais como a junção neuromuscular (JNM), mionúcleos e capilares. A proximidade destas estruturas anatômicas sugere um papel permissivo na regulação da atividade celular das CS (HAWKE & GARRY, 2001).

A função básica das CS, de atuarem no processo de regeneração da fibra muscular esquelética, hoje bem estabelecida, já era proposta desde a época de sua descoberta. Na época, final do século XVIII, já havia sido abandonada a hipótese de que o tecido muscular esquelético era um tecido estático, ou seja, incapaz de se regenerar após uma lesão. Waldeyer & Weber, no ano de 1867, pesquisando o processo de regeneração muscular, descreveram intensa proliferação nuclear nos sítios de lesão, seguidas pela formação de fibras musculares jovens. Esses resultados passaram a fundamentar a realidade sobre a capacidade regenerativa do músculo e ressaltar a importância daquela proliferação nuclear presente nas fases iniciais deste processo. Já que a incapacidade dos mionúcleos em se proliferar (núcleos pós-mitóticos) era conhecida foi proposto que aqueles núcleos proliferantes eram decorrentes da atividade das CS (para revisão ler MAZANET & FRANZINI-ARMSTRONG, 1986). Mikel Snow, no ano de 1979, por meio de um estudo auto-radiográfico, que comprovou a origem dos núcleos proliferativos como sendo realmente dessas células.

Acredita-se que as CS sejam, primordialmente, CPMs remanescentes do processo de miogênese, que se tornaram quiescentes durante as fases finais do desenvolvimento pós-natal (CHAMBERS & McDERMOTH, 1996). Recentes estudos têm identificado a existência de células tronco em músculos esqueléticos adultos, sugerindo a possibilidade da participação de células mesenquimais indiferenciadas no contingente de CS. A pluripotencialidade destas células, também denominadas células tronco musculares (CTMs), foi demonstrada na pesquisa realizada por Jackson e colaboradores (1999). Tais células foram capazes de reconstituir todo contingente de células da medula óssea em ratos previamente submetidos à radioterapia. A relação e interação entre as CPMs e as CTMs e suas respectivas representatividades dentro do aspecto global das CS ainda permanecem pobremente compreendida (SEALE & RUDNICKI, 2000).

Em resposta a estímulos apropriados, como, por exemplo, durante os processo de regeneração (CARLSON & FAULKNER, 1983; GROUNDS, 1991; HURME & KALIMO, 1992) ou de hipertrofia muscular (ROSEMBLAT, YONG, PARRY, 1994; GOLDSPINK, 1999), essas CS podem reentrar no ciclo celular, proliferar, diferenciar e atuar como fonte de novos mionúcleos para as fibras maduras. Essas etapas representam uma réplica do processo de miogênese do tecido muscular esquelético.

Mesmo diante de uma constante mobilização das CS pelo tecido muscular, com o objetivo de manutenção e adaptação de seus aspectos estruturais às demandas funcionais, o contingente celular, em um tecido em fase adulta, permanece relativamente inalterado. Isso se deve à inerente capacidade de auto-renovação das CS. Conseqüentemente, confere-se ao tecido muscular esquelético a capacidade quase ilimitada de adaptação (GROUNDS, 1991; SEALE & RUDNICKI, 2000).

1.4 Plasticidade do tecido muscular

O termo plasticidade muscular refere-se à capacidade da fibra muscular esquelética de se adaptar em resposta a uma grande variedade de estímulos. A ocorrência dessa plasticidade deve-se à relação existente entre as fibras musculares e os demais componentes da unidade muscular básica (matriz extracelular, JNM e CS). São exemplos dessa plasticidade a hipertrofia muscular (aumento do conteúdo protéico e dimensões das fibras), ocorrida respectivamente em resposta a um estímulo de sobrecarga (ROSEMBLAT, YONG, PARRY, 1994), ou ao alongamento muscular (WILLIAMS & GOLDSPINK, 1973; LIEBER, 1992).

A regeneração muscular representa um conhecido e importante exemplo da capacidade plástica do músculo. Graças a esse processo, a função primordial do tecido muscular, de produzir movimento, pode ser completa ou parcialmente restabelecida após lesões, evitando ou amenizando o estabelecimento de deficiências e/ou incapacidades aos indivíduos (CARLSON & FAULKNER, 1983; GROUNDS, 1991; HUMER & KALIMO, 1992).

1.5 Lesão e regeneração do tecido muscular esquelético

O tecido muscular estriado esquelético apresenta uma alta suscetibilidade a lesões tendo em vista sua intensa solicitação durante o cotidiano dos indivíduos. O potencial regenerativo desse tecido, documentado desde a segunda metade do século XVIII, ainda constitui um “alvo” de investigações tendo em vista a existência de fases desse processo que ainda não foram completamente estabelecidas (CARLSON & FAULKNER, 1983). A tentativa de compreender o processo regenerativo em sua totalidade é justificada pela sua importância no contexto dos esportes, medicina, fisioterapia e demais profissões que estudam ou trabalham com a compreensão e preservação do movimento humano.

Vale a pena ressaltar que os estudos experimentais *in vivo*, realizados com animais de laboratório contribuíram e, ainda, contribuem, para a elucidação e melhor compreensão dos principais aspectos do processo regenerativo muscular. A validade desses estudos se encontra, mesmo se tratando de espécies muito diferentes, na existência de um alto grau de similaridade morfológica nos tecidos musculares esqueléticos entre os mamíferos. Além disso, há a possibilidade da utilização de métodos e técnicas de análise que não são permissíveis em estudos com humanos.

Após a ocorrência de uma lesão no tecido muscular, inicia-se uma seqüência de eventos celulares que caracterizam o processo de regeneração. Essa resposta celular é basicamente homogênea e independe da natureza do estímulo lesivo (TIDBALL, 1995).

A mionecrose, ou morte da célula muscular, compreende a primeira fase do processo de regeneração e está associada à perda da homeostasia aos íons Ca^{+2} . O nível bastante elevado destes íons no meio intra-celular, fruto do comprometimento funcional do plasmalema, promove a inibição irreversível da atividade da cadeia respiratória das mitocôndrias e interrompe a respiração celular. Conjuntamente à mionecrose ocorre a autólise dos componentes protéicos da célula devido à ativação de fosfolipases e proteases neutra cálcio-dependentes (ENGEL & BIESECKER, 1982). O sistema de complemento, através do fragmento lítico C5b-9, ou também denominado de complexo de ataque à membrana, participa de forma intensa nessa fase de degeneração intrínseca (CHAMBERS & McDERMOTT, 1996).

A remoção do tecido necrótico e dos produtos de lise celular do foco de lesão constitui um fator determinante no processo de regeneração muscular. A retirada destes detritos é realizada pelos macrófagos (MCF) e leucócitos polimorfonucleares (LPMN) através da fagocitose. Essas células são atraídas ao sítio de lesão por fatores quimiotáticos, sejam eles derivados do sistema de

complemento ou produzidos no tecido muscular durante a fase de autólise (CHAMBERS & McDERMOTT, 1996; COLLINS, 2000).

O papel dos MCF na regeneração muscular não se restringe apenas à fagocitose do tecido necrótico. Atualmente reconhece-se sua atuação fundamental, por meio da síntese e liberação de moléculas biologicamente ativas, na instalação do processo inflamatório e ativação das CPMs (TIDBALL, 1995; LESCAUDRON et al., 1999; VIERCKE et al., 2000). Essas ações tão distintas, fagocitose e liberação de substâncias ativas, são realizadas por subpopulações específicas de MCF, respectivamente, ED1 e ED2 (CANTINI et al., 1994; St.PIERRE & TIDBALL, 1994).

A revascularização tecidual, temporalmente associada à fase de mionecrose, é responsável pelo restabelecimento da rede vascular e aporte sanguíneo local. Esse fenômeno resulta do surgimento e expansão de brotos vasculares a partir dos vasos próximos não comprometidos pelo trauma. O estímulo para a sua ocorrência provém do próprio tecido sob hipóxia, desencadeando a proliferação e reorganização das células endoteliais vasculares. O sucesso do processo de regeneração muscular é dependente da eficiência da fase de revascularização, sendo ela responsável pela gênese de um ambiente tecidual favorável à ocorrência das fases subseqüentes do processo regenerativo (GROUNDS, 1991; CHAMBERS & McDERMOTT, 1996).

A fase intermediária do processo de regeneração consiste da ativação, determinação, proliferação e diferenciação das CS, encarregadas de restaurar, parcial ou totalmente, as fibras lesadas. Entre os sinais biológicos diretamente relacionados à regulação da atividade dessas células podemos citar os fatores neurotróficos, demais fatores de crescimento (FC) e citocinas que são liberados durante o processo inflamatório inicial (GROUNDS 1991; HURME & KALIMO, 1992; RENDE, et al., 2000; ADAMS et al., 2001). Tais substâncias são capazes de estimular, ou inibir, a proliferação celular assim como influenciar em seu processo de

citodiferenciação. São produzidos localmente no sítio de lesão e atuam de forma autócrina e/ou parácrina via receptores encontrados na superfície da membrana celular (GROUNDS, 1991; CHAMBERS & McDERMOTT, 1996).

Os FC que estimulam a proliferação podem ainda ser divididos em dois grandes grupos. Os fatores de competência, tais como o fator básico de crescimento de fibroblastos (FGF-b), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento de hepatócito (HGF) e mitógeno de Bischoff para CPMs, atuam inicialmente e são diretamente responsáveis pela reentrada da célula no ciclo de divisão celular, ou seja, pela sua passagem do estágio G_0 para G_1 . Já os fatores de progressão, como o fator de crescimento insulínico I e II (IGF-I e IGF-II) e fator de crescimento endotelial (EGF), atuam posteriormente no ciclo celular e estimulam a fase de replicação do DNA, que representa a passagem da fase G_1 para S do ciclo (GROUNDS, 1991; ALLEN et al., 1995; CHAMBERS & McDERMOTT, 1996; GAL-LEVI et al., 1998).

Da mesma forma que estão sujeitas à influência de fatores estimulantes, as CPMs também são suscetíveis aos estímulos inibitórios à sua proliferação e/ou diferenciação, tais como o fator transformante de crescimento- β (TGF- β), interferon e o próprio contato com o plasmalema intacto. Vale a pena ressaltar que os mecanismos de controle dos processos de proliferação e diferenciação não são determinados única e exclusivamente pela presença, ou não, dos FC. A responsividade das CPMs aos fatores, alterada através da auto-regulação da expressão de seus receptores de membrana, contribui de forma relevante (BISCHOFF, 1990; CHAMBERS & McDERMOTT, 1996).

Uma vez ativadas, as CPMs adquirem características citológicas específicas, tais como um citoplasma mais abundante, organelas citoplasmáticas mais numerosas e núcleo menos heterocromático. Essas células também passam a demonstrar mobilidade, permitindo que CPMs

de outras regiões da fibra, ou mesmo de outras fibras, possam ser recrutadas para o sítio de lesão e participem do processo regenerativo (WATT et al., 1987; HAWKE & GARRY, 2001).

Além da migração para o sítio da lesão, essas células passam a se proliferar intensamente e diferenciar em mioblastos, os quais posteriormente sofrem fusão para a formação dos miotubos, que, por sua vez, são capazes de fundir entre si e os remanescentes intactos da fibra lesada. Nota-se que as fases desse processo seguem os mesmos passos do processo de gênese e crescimento da fibra muscular esquelética. Embora apresentem características similares, há a necessidade de se esclarecer que os processos de gênese e regeneração do tecido muscular esquelético são distintos. A diferença básica se encontra no contexto ambiental dentro do qual as CPMs se proliferam e diferenciam, sugerindo mecanismos moleculares de regulação diversificados (CHAMBERS & McDERMOTT, 1996).

Com frequência, e dependendo da natureza do estímulo, a lâmina basal das fibras musculares sobrevive à lesão. Sua permanência proporciona condições mais favoráveis para o desenvolvimento do processo regenerativo. Além da manutenção das CPMs na região da lesão, a lâmina basal impede o acúmulo de fibroblastos, atua como suporte para a organização estrutural das miofibrilas recém-formadas e facilita o processo de reinervação (SANES, 1986).

A fase final do processo de regeneração é determinada pela reinervação das fibras regeneradas, caso a inervação dessa fibra tenha sido comprometida, que ocorre em consequência de brotamentos axonais que se originam das terminações nervosas de regiões íntegras adjacentes (CARLSON & FAULKNER, 1983). Isso permite o restabelecimento da funcionalidade contrátil das fibras.

Segundo Carpenter & Karpati (1984), a partir de uma lesão necrótica segmentar em uma fibra muscular, existem 5 possíveis consequências do processo regenerativo. 1) completa restauração do segmento lesado; 2) segmento regenerado com calibre diminuído; 3) fusão lateral

incompleta com fragmentação das fibras musculares; 4) separação entre os cotos de regeneração devido à deficiência de fusão do segmento regenerado com o segmento íntegro; 5) substituição do segmento lesado por tecido conjuntivo.

Os principais fatores responsáveis pelas variações das características resolutivas do processo regenerativo são o tipo de estímulo lesivo, sua intensidade e a eficiência do processo regenerativo.

Em idosos o processo regenerativo ocorre mais lentamente e com menor eficiência devido à presença de um menor contingente dessas células miogênicas de reserva, assim como sua menor capacidade proliferativa (ALLEN, McALLISTER, MASAC, 1980; GIBSON & SCHULTZ, 1983, RENAULT et al.,2000). Fatores intrínsecos, tais como espessamento da lâmina basal, aumento do contingente conjuntivo associado e reduzida densidade capilar, e extrínsecos, menor eficiência do sistema imune e diminuição dos níveis séricos de FC, contribuem para as limitações relacionadas ao processo regenerativo (HAWKE & GARRY, 2001).

1.6 Fisioterapia nas lesões musculares

Diversos recursos fisioterapêuticos têm sido utilizados rotineiramente no tratamento de diferentes afecções que acometem o tecido muscular esquelético. O tratamento fisioterapêutico tem como objetivo, de modo geral, acelerar a regeneração e recuperação da atividade funcional do músculo esquelético. Entre os recursos terapêuticos mais utilizados no tratamento das lesões musculares, pode-se citar a crioterapia (KNIGHT, 2000), cinesioterapia (ANDREWS, HARRELSON, WILK, 2000) e a Terapia LASER de Baixa Intensidade (BAXTER, 1997a, TUNÉR & HODE, 1999), que, embora seja utilizada com freqüência, não apresenta seus mecanismos de ação e sua efetividade terapêutica compreendidos e cientificamente comprovados.

1.7 Conceituação e histórico do uso da radiação LASER para fins terapêuticos

O termo LASER, abreviação de *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, denomina a luz amplificada por emissão estimulada de radiação. Constitui-se de uma radiação eletromagnética específica, possuindo como principais características a monocromaticidade, unidirecionalidade, coerência espacial e temporal e alto brilho. Tais peculiaridades relacionam-se ao princípio básico de sua produção, denominado fenômeno de emissão estimulada de radiação (BAXTER, 1997a).

A descrição de suas bases físicas, demonstrada e comprovada por Albert Einstein, ocorreu em 1917, porém a aquisição da primeira fonte emissora deste tipo de radiação só consagrou-se no ano de 1960. Os anos seguintes foram marcados pela grande evolução em instrumentação e tecnologia LASER, acarretando o surgimento de diversas fontes de emissão e a aquisição de vários tipos de radiações - diferentes λ (BAXTER, 1997a).

O uso da radiação LASER em medicina teve início por volta da metade da década de 60. Áreas como a oftalmologia, oncologia, dermatologia e cirurgia plástica passaram a explorar as características foto-térmicas resultantes da interação da radiação com os tecidos biológicos, quando utilizada em elevadas densidades de potência, direcionando seu uso aos procedimentos cirúrgicos ablativos e para foto-coagulação.

A possibilidade da utilização da radiação LASER para a indução de fenômenos foto-bioquímicos celulares foi relatada nos primórdios da década de 70 pelo pesquisador Húngaro Endre Mester. Desde então esse fenômeno tem sido crescentemente investigado e utilizado como ferramenta terapêutica na prática clínica com objetivo de, entre outros, estimular o processo de reparo tecidual (BAXTER, 1997a; SHIELDS & O'KANE, 1997). Os efeitos dessa recente modalidade, diferentemente dos até então conhecidos e explorados efeitos destrutivos desse tipo

de radiação, encontram-se relacionados à sua capacidade de, quando sob baixas densidades de potência e energia, modular a função celular. Em decorrência das características do tipo de interação LASER-tecido, essa modalidade terapêutica passou a ser denominada TLBI (TUNÉR & HODE, 1999).

1.8 Bases físicas da radiação LASER

Segundo Max Planck (HALLIDAY & RESNICK, 1988), por meio da teoria dos quanta de luz, o transporte de energia pelas ondas eletromagnéticas é feito por meio de pacotes, denominadas *quantums* ou fótons, que percorrem o espaço realizando movimentos oscilatórios. O nível de energia quantal específica de um fóton, cuja unidade de energia é dada em elétronvolt (ev) ou joule (J), determina as características de propagação das ondas eletromagnéticas.

O movimento oscilatório dos fótons no espaço permite a determinação dos seguintes parâmetros:

- Ciclo: menor porção não repetitiva da onda;
- Período (T): tempo para realizar um ciclo, medido em segundos (s);
- Comprimento de onda (λ): distância percorrida pelo ciclo, medida em metros (m);
- Frequência (F): número de ciclos por segundos, medido em hertz (Hz);
- Velocidade de propagação (c): constante e igual a 300.000 Km/s.

Os parâmetros λ e F estão diretamente relacionados à energia aportada pelo fóton. Assim sendo, qualquer desses 3 parâmetros possibilitam a caracterização de uma radiação eletromagnética.

A grande variabilidade de carga energética dos fótons determina a existência de uma vasta quantidade de radiações, que passaram a ser classificadas dentro de um espectro eletromagnético.

As radiações LASER freqüentemente utilizadas na prática clínica encontram-se em uma faixa de espectro variando entre a luz visível e infra-vermelho (HALLIDAY & RESNICK, 1988; BAXTER, 1997b).

1.9 Interação da radiação LASER com os tecidos biológicos

Quando uma onda eletromagnética incide sobre um tecido biológico ela sofre, inevitavelmente, um fenômeno denominado de espalhamento. Esse é caracterizado pelos sucessivos processos de reflexão e/ou refração dos fótons durante sua propagação pelo meio. A magnitude da reflexão e refração está relacionada a fatores como o ângulo de incidência do feixe, λ da radiação e o grau de homogeneidade dos tecidos biológicos. Outro fenômeno resultante da propagação da radiação é a absorção, que se deve à presença de biomoléculas capazes de absorver seletivamente os fótons aportados no feixe. Os tecidos biológicos apresentam, além de um baixíssimo grau de homogeneidade, uma alta quantidade de moléculas absorventes, o que explica a alta magnitude dos fenômenos de espalhamento e absorção em relação à radiação LASER (DIAMANTOPOULOS, 1997).

O uso clínico da radiação LASER em medicina fundamenta-se nas alterações teciduais desencadeadas pela absorção dos fótons aportados pela radiação. O tipo de resposta induzida associa-se às características dosimétricas da radiação utilizada (λ , modo de emissão e densidade de potência), podendo variar desde simples alterações bioquímicas celulares (TLBI) até a vaporização de um tecido em virtude dos elevados níveis de temperatura gerados no local. Vários são os componentes biológicos capazes de absorver a radiação LASER cujos comprimentos de onda são freqüentemente utilizados na prática clínica. Entre eles pode-se citar a água, proteínas e até mesmo os ácidos nucleicos (DIAMANTOPOULOS, 1997).

1.10 Terapia LASER de baixa intensidade

As primeiras pesquisas sobre os efeitos fotobioquímicos da radiação LASER nos tecidos biológicos foram realizadas na Hungria na década de 70, poucos anos antes do início de sua utilização clínica. Desde então, foi observado um grande interesse pelo esclarecimento e compreensão de seus mecanismos de ação, tendo em vista que resultados clínicos favoráveis, principalmente no que diz respeito à melhora no processo de cicatrização de feridas, eram indiscutíveis. A incompatibilidade entre a efetividade clínica e a obscuridade científica criou um certo ceticismo sobre a eficiência terapêutica desse método, porém não impediu a ampla disseminação da técnica e sua utilização clínica (KARU, 1987; BASFORD, 1995).

Embora ainda permaneçam obscuros os seus mecanismos de ação, evidencia-se que a radiação LASER tem a capacidade de alterar o metabolismo celular, na ausência de aquecimento tecidual significativo. Este fenômeno, denominado de biomodulação, é dependente do λ e dose de radiação utilizada (KARU, 1987; BASFORD, 1995; KARU, 1998a).

A responsividade das células à radiação deve-se a absorção seletiva de seus fótons por estruturas celulares denominadas de cromóforos (fotoceptores não especializados). Tais fotoceptores representam necessariamente elementos constituintes de vias bioquímicas celulares específicas, não dependentes da influência da luz. Com a absorção dos fótons aportados pela radiação as moléculas adquirem um estado eletronicamente excitado (mudança do potencial redox), influenciando na regulação e cinética da respectiva via bioquímica. Esta alteração focal serve como um gatilho para uma série de alterações bioquímicas em cadeia que culminam em uma mudança das funções metabólicas e proliferativas de uma célula (KARU, 1998b).

Pesquisas recentes demonstram que entre os cromóforos fotoceptores mais efetivos estão as proteínas que constituem a cadeia de transportadores de elétrons da membrana mitocondrial

interna. Estudos comparativos entre os espectros de ação da TLBI e os espectros de absorção dos constituintes desta cadeia indicam mais especificamente para os componentes do complexo enzimático citocromo-oxidase (KARU, 1998b).

Entre as hipóteses mais aceitas do mecanismo de ação da radiação LASER, esta a que a absorção dos fótons pelos componentes da cadeia respiratória levaria a um aumento do seu potencial redox. Em resposta a esse aumento seria estabelecido um maior gradiente eletroquímico de prótons transmembrana mitocondrial, responsável, por sua vez, por um aumento na síntese de ATP e pelo aumento da concentração hidrogeniônica no citoplasma celular (KARU, PYTIBRAT, KALENDO, 1995). A acidificação do meio intracelular induz a alterações na permeabilidade da membrana celular aos íons sódio (Na^+), potássio (K^+) e cálcio (Ca^{+2}), alterando suas concentrações citosólicas. As concentrações alteradas destes íons mono e divalentes são capazes de alterar o metabolismo dos nucleotídeos cíclicos. Já se encontra bem estabelecido na literatura o papel dos nucleotídeos cíclicos, particularmente 3'5-monofosfato de adenosina (AMPC), no controle do metabolismo e proliferação celular (WHITFIELD et al., 1980; BOYNTON & WHITFIELD, 1983; KARU, 1988; KARU, 1998b).

Vias alternativas cuja participação também foram sugeridas no contexto dos mecanismos de ação da TLBI envolvem mudanças nos aspectos conformacionais e funcionais dos cromóforos fotoceptores em resposta ao discreto aquecimento local, e na produção, pelas mitocôndrias, de espécies reativas de oxigênio (ERO) induzidas pela absorção dos fótons (GROSSMAN et al., 1998; KARU, 1998b; TUNÉR & HODE, 1999).

Entre as respostas biológicas decorrentes das alterações bioquímicas celulares induzidas pela TLBI, pode-se citar o aumento nas taxas de proliferação celular (ALMEIDA-LOPES et al., 2001; PINHEIRO et al. 2002), aumento nas taxas de síntese de proteínas (ENWEMEKA, 1992; VACCA et al., 1996; YAMAMOTO et al., 1996), extra-síntese de ATP (PASSARELLA et al.,

1984; KARU, PYITIBRAT, KALENDO, 1995), influência sobre o processo de diferenciação celular (BEN-DOV et al., 1999) e síntese e liberação de moléculas biologicamente ativas, tais como citocinas (YU et al., 1996) e fatores de crescimento (YOUNG et al., 1989; AGAIBY et al., 2000).

Atribui-se a essas alterações fisiológicas a capacidade da TLBI estimular o processo de reparo dos tecidos biológicos, assim como descrito para o tecido ósseo (BARUSHKA, YAAKOBI, ORON, 1995; DAVID et al. 1996; LUGER et al. 1998;), tendíneo (REDDY, STEHNO-BITTEL, ENWEMEKA, 1998), epitelial (AL-WATBAN & ZHANG, 1997; LAGAN et al., 2000; RIBEIRO, et al., 2002) e muscular (WEISS & ORON, 1992; AMARAL, PARIZOTTO & SALVINI, 2001).

No entanto, a literatura apresenta resultados polêmicos em relação à efetividade biológica da TLBI. Em contrapartida aos referidos trabalhos demonstrando o potencial bioestimulante da técnica, são várias as pesquisas que têm demonstrado a sua ineficiência em influenciar o processo de reparo tecidual. Oliveira e colaboradores (1999) demonstraram a ausência de efetividade da radiação laser sobre o processo de reparo no tecido muscular esquelético. Resultados similares foram relatados em relação ao processo de reparo de úlceras cutâneas (LOWE et al., 1998; WALKER et al., 2000).

Parte dessa divergência entre os resultados provém das grandes variações nos aspectos metodológicos adotados durante a realização das análises. Isto inclui os modelos experimentais (métodos *in vitro* ou *in vivo*), parâmetros dosimétricos (λ , densidade de energia, densidade de potência, modo de emissão) e procedimentos de irradiação (irradiação direta ou transdérmica). Além disso, ressalta-se a influência do comportamento λ e dose-dependente exibido pelo potencial modulatório da TLBI (BASFOR, 1995, KARU, 1998a).

Mesmo diante desse panorama de incertezas sobre a efetividade terapêutica, vêm crescendo a utilização clínica da TLBI nas áreas de fisioterapia, odontologia e até medicina veterinária, todas explorando a referida capacidade bioestimulante atribuída à técnica. Faz-se necessário enfatizar que, para a utilização clínica consciente e efetiva desse recurso, será imprescindível a melhor compreensão dos aspectos relacionados aos mecanismos de ação e de determinação dos parâmetros dosimétricos necessários.

2 Objetivos

O objetivo da presente pesquisa foi caracterizar a resposta do tecido muscular estriado esquelético, em específico das CPMs, à radiação LASER de baixa intensidade nos λ de 670, 685 e 830nm. Para isso, foram desenvolvidos protocolos experimentais com as respectivas finalidades específicas de:

- a) determinar o tipo de influência exercida pelas radiações sobre as características de proliferação e diferenciação celular, que representam pontos-chave da participação das CPMs durante o processo de regeneração do tecido muscular estriado esquelético;
- b) avaliar a influência destas radiações sobre o processo de regeneração do tecido muscular esquelético *in vivo*, utilizando um procedimento de irradiação que reproduza os fatores de atenuação da radiação presentes durante a utilização clínica da técnica (irradiação transdérmica).

3 Material e Métodos

Tendo em vista o objetivo central estabelecido e as características λ -dependente e dose-dependente atribuídas ao potencial biomodulador da TLBI, a investigação foi realizada em duas fases distintas.

A primeira, fundamentada em experimentos conduzidos *in vitro*, foi direcionada à investigação da influência exercida pelas radiações, administradas em diferentes densidades de energia (DE), sobre a atividade das CPMs. Para isso foram realizadas curvas dose-resposta de irradiação nos comprimentos de onda que são freqüentemente utilizados na prática clínica ($\lambda = 670, 685$ e 830 nm). Como indicador da responsividade celular aos diferentes parâmetros de irradiação, foi utilizada a taxa de proliferação celular, que constitui um dos processos celulares comprovadamente influenciados pela TLBI nesse tipo de experimentação (GROSSMAN et al., 1998; BEN-DOV et al., 1999; SROKA et al., 1999; PINHEIRO et al., 2002). A influência da técnica sobre o processo de diferenciação celular foi investigada separadamente, sendo para tal utilizados apenas os parâmetros de irradiação com maior efetividade biológica em relação à proliferação celular.

A segunda fase, realizada em experimentos *in vivo*, foi direcionada à análise da efetividade terapêutica da radiação LASER de baixa intensidade, aplicando-se os parâmetros de radiação com máxima efetividade biológica nas CPMs sobre o processo de reparo do tecido muscular esquelético após lesão induzida por congelamento tecidual (criolesão). Os parâmetros utilizados para avaliar a influência da radiação LASER foram a análise histológica e histoquímica dos músculos, além da dosagem da atividade das enzimas Citrato Sintase (CS) e Lactato Desidrogenase (LDH). A prescrição das doses de irradiação utilizadas levou em consideração o

fator atenuação da radiação (espalhamento + absorção) determinado pela irradiação transdérmica, que caracteriza a aplicação clínica da técnica.

3.1 Análise *in vitro*

3.1.1 Cultura celular

As fases deste experimento que envolveram o manuseio de cultura de células foram realizadas na sala de cultura celular do Laboratório de Bioquímica, pertencente ao Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos (DCF/UFSCar), com a participação da Profa. Dra. Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo.

Foram utilizadas culturas primárias de CPMs de músculos dos membros posteriores de ratos machos Wistar com 4 dias de vida, obtidos junto ao biotério central da Universidade Federal de São Carlos.

Para a obtenção da cultura primária, como descrito por Horn & Brodwick (1908) e Saraiba e colaboradores (1992), os animais ($n = 3$ por experimento) foram inicialmente submetidos à eutanásia com inalação de éter etílico, sendo posteriormente imersos em um recipiente contendo álcool etílico a concentração de 70% (v/v). Em ambiente estéril no interior de uma capela de fluxo laminar horizontal, os músculos quadríceps femoral, gastrocnêmio, sóleo e tibial anterior foram cuidadosamente removidos, separados de tecidos conjuntivo, adiposo e ósseo associados e depositados em uma placa de petri. Durante o procedimento da extração os músculos foram mantidos em solução nutritiva isotônica gelada (em mM: NaCl 135; KCl 5,5; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3,3; KH_2PO_4 2,2; sucrose 43,8; dextrose 25; HEPES (N-2-Hidroxietilpiperazina-2-etanosulfônioácido) 10, pH 7.3), sendo posteriormente picotados em conjunto com tesoura por um tempo aproximado de 10 minutos. O tecido foi então submetido à digestão enzimática por

tripsina (0,025%-GIBCO) e colagenase tipo V (0,1%-SIGMA) durante 40 minutos a 37°C. Ao término deste período, os fragmentos teciduais foram imersos em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM-CULTILAB), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB-CULTILAB) e os antibióticos estreptomicina (100µg/ml-CULTILAB) e penicilina (100unidades/ml-CULTILAB). Posteriormente a um breve procedimento de homogeneização mecânica manual, com o auxílio de uma micropipeta, o contingente celular foi fracionado dos demais componentes teciduais por centrifugação (1.500rpm/10minutos/5°C), sendo o precipitado ressuspenso em meio DMEM contendo 10% de SFB e imediatamente submetido ao pré-plaqueamento. Esse procedimento teve o objetivo de enriquecer a população das CPMs, isolando-as de células não miogênicas normalmente presentes nas culturas primárias. Para tal, as células foram semeadas em placa de petri estéril e mantidas em condições ideais de crescimento por 20 minutos (temperatura de 37° C, concentração de CO₂ de 5% e umidade relativa do ar de 95%). Em seguida, o meio de cultura celular foi cuidadosamente removido e adicionado em garrafas de cultura celular de 75 cm² de área de crescimento (COSTAR). Esse meio de cultura continha um contingente celular mais concentrado de CPMs, tendo em vista que as células não miogênicas, em virtude de uma maior velocidade de adesão, permaneciam preferencialmente aderidas na placa de petri.

As garrafas foram acondicionadas na estufa de cultura celular e, a partir da identificação da confluência (ocupação total da superfície de crescimento), as células já encontravam-se disponíveis para a utilização nos procedimentos de irradiação. Levando-se em consideração que para a utilização destas células um processo de tripsinização foi necessário, conclui-se que as células foram sempre submetidas à experimentação em sua 2^a passagem (ciclos caracterizados

pela recomposição estrutural da célula, adesão à garrafa e continuidade de seu processo de crescimento *in vitro*).

3.1.2 Condições ambientais no acondicionamento celular

As condições de acondicionamento celular adotadas nestes experimentos, que foram mantidas no transcorrer de todas as suas fases, foram uma temperatura de 37° C, concentração de CO₂ de 5% e umidade relativa do ar de 95%, sendo esses valores programados na estufa de cultura celular utilizada (QEUE).

3.1.3 Emissores de radiação

Foram utilizadas nos experimentos radiações LASER em três comprimentos de onda distintos, sendo dois dentro da faixa de radiações visíveis ($\lambda = 670$ e 685 nm) e um de radiação infravermelho ($\lambda = 830$ nm) do espectro eletromagnético.

Esses comprimentos de onda representam as radiações LASER cujas fontes de emissão são comercialmente disponíveis e rotineiramente utilizadas na prática clínica, inclusive com objetivo de estimular o processo de reparo tecidual durante o tratamento fisioterapêutico das lesões musculoesqueléticas.

Um dos equipamentos utilizados nos experimentos, denominado Thera Lase[®] e fornecido pela empresa DMC equipamentos, emite por meio de diodos semi-condutores duas das radiações propostas ($\lambda = 685$ e 830 nm). Caracteriza-se pela emissão da radiação por meio de uma fibra ótica circular (emissão indireta). O feixe da radiação é pouco colimado, divergindo a partir da extremidade da fibra e determinando uma relação diretamente proporcional entre a distância de um alvo e a área de projeção do feixe. Além dos comandos de seleção do λ , modo de emissão (contínuo ou pulsado) e dose de radiação, esse equipamento possibilita o controle da potência de

emissão (potências máximas de emissão nos $\lambda = 685$ e 830 nm respectivamente de 35 e 350 mW - Figura 1).



Figura 1: Equipamento contendo os diodos responsáveis pela emissão das radiação LASER nos λ de 685 e 830 nm. A radiação é seletivamente emitida por meio de uma fibra ótica (seta).

Para a radiação no $\lambda = 670$ nm, foi utilizado um equipamento do modelo Laserpulse[®], fornecido pela empresa IBRAMED. Nele a emissão da radiação é realizada diretamente a partir do diodo semi-condutor, que se encontra embutido na própria probe de emissão (caneta). O feixe também é pouco colimado e divergente. Foi necessária a adaptação de uma fibra ótica à extremidade da probe para converter seu feixe em um formato circular, tendo em vista a necessidade de uma irradiação zonal homogênea das células no interior dos poços das placas de cultura celular (poços circulares). A potência de emissão nesse equipamento é fixa e, segundo o manual do equipamento, no valor aproximado de 30 mW (figura 2).



Figura 2: Equipamento contendo o diodo responsável pela emissão de radiação LASER no λ de 670 nm. É possível visualizar a adaptação da fibra ótica (seta) realizada na extremidade da probe de emissão (*).

Para a realização dos experimentos propostos optou-se pela padronização, em todos os protocolos de irradiação elaborados, do modo (contínuo) e potência de emissão. Para a determinação do valor real a ser utilizado, possibilitando a padronização e o controle mais rigoroso sobre os parâmetros dosimétricos adotados, foi mensurado o valor da potência de emissão do equipamento com potência fixa, fato que permitiu a subsequente reprodução aproximada do valor para as duas radiações no equipamento com potência ajustável.

As aferições das potências de emissão foram realizadas no Departamento de Ótica do Instituto de Física da Universidade de São Paulo (IFSC/USP), Campus de São Carlos. O dispositivo utilizado foi um potenciômetro Field Master (COHERENT), acoplado a um termo sensor de alta sensibilidade (COHERENT). A aferição do equipamento de potência fixa ($\lambda = 670$) evidenciou uma potência de emissão de 36,5 mW, ou seja, 6,5 mW acima do valor estabelecido nas informações técnicas contidas no manual do equipamento. A aferição no equipamento de

potência ajustável demonstrou que, para ambos λ de radiação, seria possível utilizar potências similares. Também nesse equipamento, em relação ao λ de 685 nm, foi detectado que a potência real de emissão superava o limite máximo prescrito no respectivo manual.

Com a seleção dos valores de potência, fundamentado nos registros obtidos nas mensurações realizadas, foram estabelecidos os valores da potência de emissão nos λ de 685 e 830 nm, respectivamente 36,2 e 37 mW.

3.1.4 Plataforma para irradiação

O primeiro passo para a realização dos experimentos *in vitro* foi o desenvolvimento de um dispositivo para viabilizar a irradiação das células, contidas em poços nas placas de cultura, dentro do fluxo laminar, em virtude da necessidade de ambiente estéril para as irradiações. Tal dispositivo deveria proporcionar o adequado posicionamento da placa de cultura e da probe de emissão da radiação LASER, devendo essa permanecer perpendicular e imóvel em relação à superfície de irradiação durante todo o procedimento.

Baseado nestas características, foi desenvolvido um sistema que contém uma base para o posicionamento da placa de cultura e um suporte para a fixação da probe de emissão da radiação (figura 3).

A superfície da base apresenta uma marcação em forma de grade (quadriculada) que orienta o posicionamento da placa para que o feixe laser coincida com a área dos poços em que se encontravam as células. O quadrado que determina o ponto fixo de incidência da radiação apresenta a cor negra para diminuir a reflexão da radiação e conseqüente reincidência sobre o contingente celular. Isto poderia alterar sensivelmente a dosimetria proposta (figura 4).

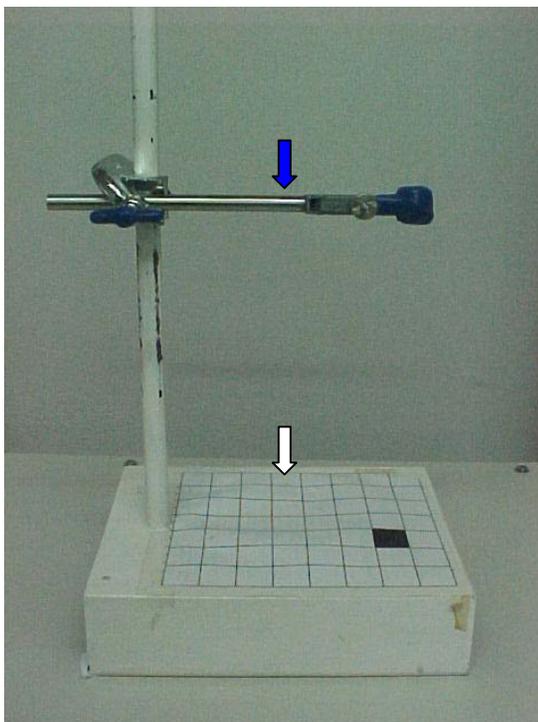


Figura 3: Plataforma para irradiação das CPMs no interior do fluxo laminar. Constitui-se de uma base para o posicionamento das placas (seta branca) e de um sistema de hastes para a fixação da probe de emissão de radiação (seta azul).

O suporte para a fixação da probe de emissão apresenta uma haste disposta verticalmente, que se encontra fixa a base, e outra horizontalmente, conectadas entre si por uma garra. Em uma das extremidades da haste horizontal, encontra-se uma presilha ajustável responsável pela fixação da probe de emissão da radiação e a sua manutenção na posição vertical (Figura 4). Tal disposição possibilitou a regulagem da altura da probe em relação à base, mecanismo necessário para compensar os diferentes graus de divergência dos dispositivos de emissão de radiação cujos comprimentos de onda foram propostos neste projeto. O distanciamento ou aproximação da fonte de emissão proporcionou a adequação entre as áreas de incidência do feixe laser e dos poços da placa de cultura.

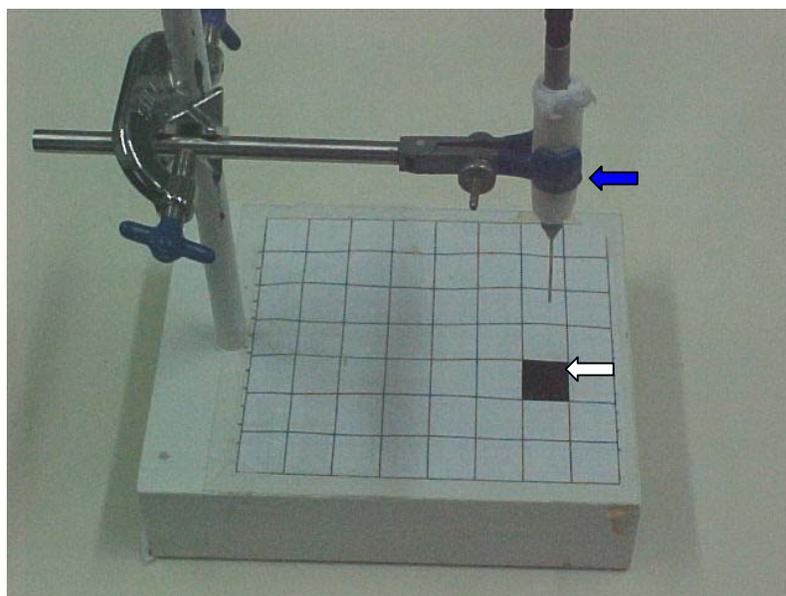


Figura 4: Superfície da base da plataforma de irradiação exibindo a marcação em forma de grade e o quadrado preto que representa o ponto de incidência do feixe da radiação (seta branca). Nota-se, ainda, a fixação da probe de emissão no sistema de hastes, responsável pelo ajuste e manutenção do seu posicionamento (seta azul).

3.1.5 Procedimento de irradiação

Nos dias estabelecidos para a realização das irradiações, assim como para os demais em que a rotina da cultura foi necessária, as técnicas básicas de esterilização do fluxo laminar vertical (VECO) e manuseio asséptico foram mantidas, acrescida pelo fato da plataforma de irradiação e as probes de emissão terem sido introduzidas no fluxo laminar previamente à sua irradiação com luz ultravioleta.

Em virtude dos diferentes graus de divergência nos feixes dos emissores, como já citado anteriormente, houve a necessidade de, para cada equipamento a ser utilizado, ajustar a distância entre a extremidade da probe de emissão e a base da plataforma de irradiação. A verificação desse ajuste foi efetuada através da mensuração do diâmetro do feixe na superfície da plataforma, com o auxílio de um paquímetro. Em relação à área de superfície disponível nos poços da placa de cultura celular estabelecida para a realização das irradiações, no valor de 2cm^2 , o diâmetro dos feixes foi ajustado para 16 mm. A visualização do feixe de radiação infravermelha foi viabilizada

pelo uso de uma câmera de vídeo (SONY) dotada de um sistema de captação deste tipo de radiação.

Tendo em vista que a área de projeção do feixe da radiação coincidiu com a área de superfície dos poços, foi possível estabelecer a média da densidade de potência (DP) das irradiações utilizadas nestes experimentos (aproximadamente 18 mW/cm^2).

Antes do acionamento da emissão da radiação, a placa era posicionada na base da plataforma, tendo como guia a demarcação em grade disposta em sua superfície. Com o término da irradiação iniciava-se um novo ciclo compreendendo o posicionamento da placa, programação do parâmetro dosimétrico e a execução da irradiação (Figura 5).

Durante o procedimento de irradiação, a iluminação interna do fluxo laminar, caracterizada por uma lâmpada fluorescente, foi mantida desligada e as tampas das placas foram removidas (Figura 6).

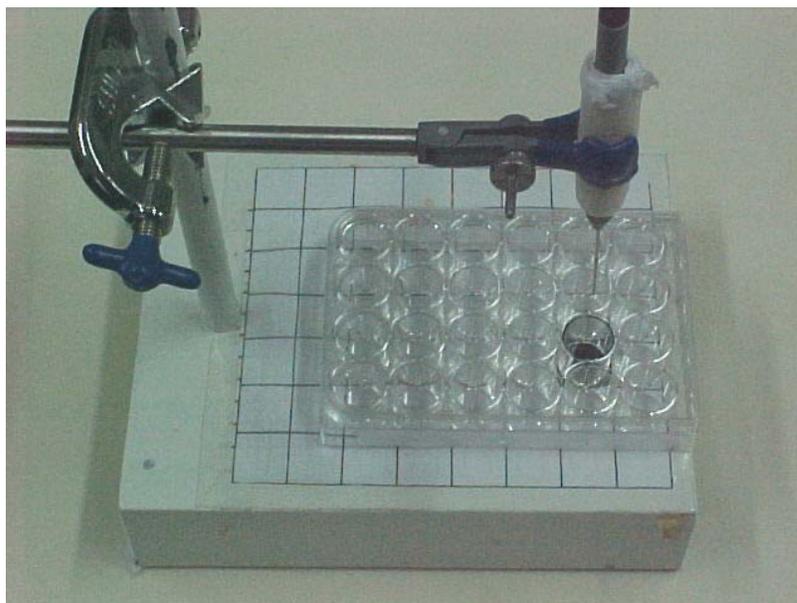


Figura 5: Posicionamento da placa de cultura celular sobre a plataforma para a realização da irradiação das CPMs contidas nos poços das placas de cultura.

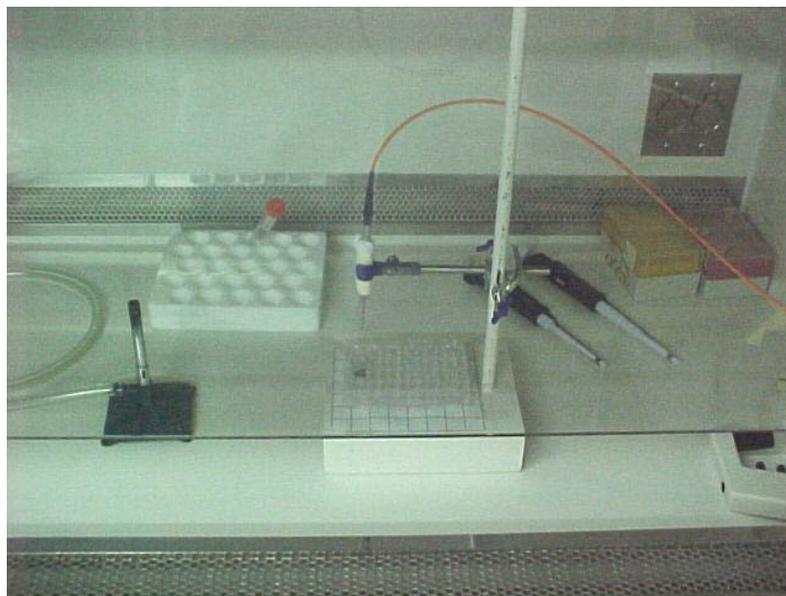


Figura 6: Esquema de irradiação das células no interior do fluxo laminar. A luz ambiente foi mantida desligada durante estes procedimentos.

3.1.6 Taxa de proliferação celular

Para a determinação da taxa de proliferação celular, as CPMs foram inicialmente submetidas ao processo de tripsinização (Tripsina 0,25% - GIBCO), centrifugadas (2000rpm/5 minutos), ressuspensas em 1 ml de DMEM, suplementado com 10% de SFB, e quantificadas por meio de contagem em câmara de Neubauer. A diluição da alíquota utilizada para a quantificação com de azul de Tripán proporcionou a correta identificação das células viáveis, sendo que apenas elas foram consideradas.

Uma das características especiais do meio de cultura utilizado nesse procedimento foi a ausência do componente denominado vermelho de fenol (VF), um indicador de pH freqüentemente adicionado e que transforma a cor originalmente amarela clara do meio em vermelha. Esta opção foi estabelecida com o objetivo de evitar a interferência desse componente na absorção da radiação LASER.

De posse da concentração celular inicial, foi realizada uma diluição, utilizando o mesmo meio de cultura, para a aquisição de uma suspensão com volume total de 10 ml e concentração celular de 10^5 células /ml.

Com o intuito de estabelecer o efeito do parâmetro DE na suposta influência das radiações LASER avaliadas, foi proposto, para cada λ , a realização de uma curva dose-resposta utilizando os valores de 0,3; 0,6; 0,9; 1,2 e 1,5 J/cm². Além dessas, havia em cada curva um controle não irradiado, utilizado posteriormente para o estabelecimento da taxa de proliferação celular. Assim sendo, para o procedimento de irradiação, alíquotas de 400µl da suspensão foram transferidas para 6 poços de uma placa de cultura celular de 24 poços (COSTAR), sendo confeccionada uma placa para cada λ . Nesse tipo de placa, a área da superfície corresponde a 2 cm² e a disposição dos poços semeados foi tal que sempre existiam poços vazios intercalados aos que continham células. O intuito dessa metodologia foi distanciar os poços a serem irradiados e evitar a influência da radiação nos poços vizinhos pelo fenômeno de espalhamento.

Uma vez realizado o plaqueamento, que representa o processo de transferência das células para a placa de cultura celular, a placa foi transferida para a estufa de cultura celular por um período de 5 minutos. Esse foi estabelecido com o objetivo de permitir às células depositarem-se no fundo do poço, sem a ocorrência de adesão, e submetê-las a uma intensidade homogênea de radiação.

Imediatamente após a irradiação, a solução, em cada poço, foi homogeneizada e, utilizando uma micropipeta, transferida em alíquotas de 100 µl para 3 poços individuais de uma placa de 96 poços (COSTAR). Esse procedimento resultou na aquisição de 3 placas de 96 poços contendo os 6 pontos da curva dose-resposta, sendo que para cada ponto existiam 3 amostras (triplicata). Em virtude da diluição realizada, os 100µl semeados em cada poço continham um

contingente aproximado de 10^4 células. Após essa transferência, as placas foram acondicionadas na estufa de cultura celular e mantidas nas condições ideais de crescimento.

Ao final de um período de 24 horas, as células em cada poço foram quantificadas para a determinação da taxa de proliferação celular, que foi expressa de forma percentual em função do valor médio do contingente celular de cada grupo experimental (DE) em relação ao do controle não irradiado.

Esses experimentos foram reproduzidos com a utilização de um meio DMEM suplementado com apenas 5% de SFB, com o intuito de investigar uma possível influência do ambiente nutricional na interação da radiação LASER com as células.

Para a quantificação celular foi utilizada uma técnica indireta baseada na análise colorimétrica a partir do sal de tetrazolium (MTT – [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] - GIBCO). Ela foi inicialmente proposta por MOSMANN (1983), sofreu algumas adaptações técnicas e demonstra-se apropriada para experimentos *in vitro* que objetivam análise de viabilidade e quantificação celular (DENIZOT & LANG, 1986). A clivagem do MTT, em um produto colorido azul (azul de formazana) pela enzima mitocondrial succinatodesidrogenase (SDH), e subsequente quantificação colorimétrica do produto em leitor de ELISA (espectrofotômetro de placas multipoços) constituem os princípios da técnica. A conversão só ocorre em células viáveis e a quantidade de formazana produzido é proporcional ao número de células presentes.

Para a quantificação celular, a placa de cultura contendo as células foi removida da estufa de cultura no momento desejado e, em ambiente estéril dentro do fluxo laminar, o meio de cultura dentro de cada poço foi cuidadosamente removido com micropipetador. Em cada poço foram adicionados 100 μ l de meio de cultura, sem SFB e VF, e 10 μ l de MTT à concentração de

10mg/ml. As placas foram suavemente agitadas e retornaram à estufa onde permaneceram por um período de 3 horas. Ao término do tempo estabelecido, as placas foram removidas da estufa, centrifugadas (3.700rpm/5minutos/4°C) e o meio novamente removido com micropipetador. Cada poço recebeu 100µl de isopropanol para a solubilização do azul de formazan precipitado no fundo do poço. Após vigorosa homogeneização, as placas foram submetidas à análise colorimétrica no leitor de ELISA e determinação da densidade ótica (DO) no λ de 595nm. Uma leitura de referência em 690 nm foi realizada previamente, para melhorar a sensibilidade da técnica.

Para converter os valores de DO obtidos nas leituras colorimétricas em número de células, foi necessária a aquisição prévia de uma curva padrão determinando o valor de DO em amostras contendo quantidades pré-estabelecidas de células (curva DO/cél.). Para isso, contingentes celulares de 10^4 a 5×10^4 , com intervalo de 5×10^3 células, foram preparados em meio DMEM, sem SFB e VF, e semeados em poços de uma placa de 96 poços, sendo que para cada valor estabelecido existiam 3 amostras. Uma hora após o plaqueamento foi adicionado o MTT e dado continuidade ao protocolo da análise colorimétrica. Os valores resultantes da curva DO/cél. foram submetidos à análise estatística de regressão, a fim de, por meio da determinação de uma equação que expressa a correlação entre os valores, proporcionar a conversão dos valores de DO obtidos após os procedimentos experimentais de irradiação.

3.1.7 Taxa de diferenciação celular

A análise da influência das radiações LASER sobre o processo de diferenciação celular foi estabelecida com base nos resultados obtidos em relação à influência dessas sobre a taxa de proliferação, sendo realizada de forma restrita ao valor de DE, denominada $DE_{m\acute{a}x}$, e concentração de SFB responsáveis pelo efeito bioestimulante mais expressivo em cada λ .

A diferenciação das CPMs foi avaliada por meio da determinação da taxa de expressão do RNA mensageiro das isoformas IIa e IIx da cadeia pesada de miosina (MHC), uma proteína sarcomérica músculo-específica freqüentemente utilizada como identificador do processo de diferenciação terminal dentro da linhagem miogênica (BEM-DOV, 1999).

Foram necessárias 5 garrafas confluentes de CPMs, tendo em vista o elevado contingente celular previsto para a execução do protocolo de irradiação. Após a tripsinização, as células dessas garrafas foram misturadas e submetidas à suave homogeneização mecânica antes do processo de centrifugação. A ressuspensão das células foi realizada com 5 ml de DMEM desprovido de VF. A quantificação celular foi estabelecida e proporcionou o posterior ajuste da concentração celular da solução para 2.5×10^6 células/ml, sendo o volume total necessário de 8 ml. Em seguida, alíquotas de 400 μ l foram transferidas para 5 poços de 4 placas de cultura celular de 24 poços, levando em consideração os mesmos procedimentos de plaqueamento adotados para a análise da taxa de proliferação celular.

As irradiações foram realizadas também de forma semelhante às citadas durante a análise da taxa de proliferação celular. Cada placa foi destinada a uma radiação específica, sendo utilizado em seus poços o respectivo valor de $DE_{m\acute{a}x}$. A placa residual foi utilizada como controle e submetida aos mesmos procedimentos experimentais abordados.

Após a irradiação, as soluções dentro de cada poço foram suavemente homogeneizadas e transferidas integralmente para placas de cultura celular individuais, contendo 21 cm² de superfície disponível para crescimento. Em cada placa, foram ainda acrescentados 1.600 μ l de meio de cultura, para atingir o volume ideal sugerido para o cultivo nesta circunstância. Na seqüência, elas foram acondicionadas na estufa.

Levando em consideração o ajuste de concentração celular realizado inicialmente, o contingente celular irradiado e transferido para essas placas foi de aproximadamente 10^6 células. Este valor representa, como demonstrado em estudos prévios, uma quantidade suficiente para determinar a confluência das placas de cultura, o que atua como um potente fator inibitório para a ocorrência de proliferação celular.

Ao término de um período de 12 horas após a irradiação deu-se início ao processo de indução de diferenciação das CPMs, estabelecido por meio da diminuição da concentração de soro no meio de cultura celular (2 % de SFB). A partir de então, o meio de cultura foi substituído a cada 24 horas (BEN-DOV, 1999).

O cultivo das células foi interrompido no 5º dia após o início da indução da diferenciação, sendo, então, realizado o procedimento de extração do RNA total das culturas por meio do método Trizol[®] (GIBCO-BRL), de acordo com o protocolo estabelecido pelo fabricante, sem alterações.

Ao final do procedimento de extração, as amostras foram congeladas em freezer (temperatura de -80° C), sendo, posteriormente, transportadas, em gelo seco, ao Laboratório de Histologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP) em São Paulo para a realização das análises referentes à diferenciação celular. Esta fase das análises foi realizada com a colaboração do Prof. Dr. Anselmo Sigari Moriscot.

Inicialmente, o material extraído foi submetido à quantificação pela análise espectrofotométrica sob luz ultravioleta nos λ de 260 e 280 nm. Além dos valores resultantes, expressos em μ g, essa possibilitou ainda a verificação da relação entre os valores de DO mensurados (DO-260/DO-280 nm), considerada ideal quando entre 1,6 e 2,0. A integridade do RNA obtido, também, foi investigada, avaliando-se os padrões eletroforéticos verificados em gel

de agarose a 1 %, denaturante, corado com brometo de etídeo, de acordo com Sambrook, Fritsch e Maniatis (1982).

Cinco μg de RNA total foram submetidos à técnica de transcrição reversa (RT), para qual foram utilizadas 200 U de transcriptase reversa SuperScript RNase H⁻ (GIBCO-BRL) em 20 μl de solução contendo 4 μl de tampão fornecido pelo fabricante, 0,8 mM de dNTPs, 1 mM de MgCl_2 , 0,02 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de oligo-desoxitimidina *primer* (iniciador) e 4 mM DTT. A reação foi realizada em termociclador de DNA (Gene-Amp PCR System 2.400, PERKIN ELMER), incluindo as seguintes etapas:

Temperatura (° C)	Tempo (minutos)
70	10
42	60
94	10

O produto da reação em cada amostra foi diluído 5 vezes e uma alíquota de 5 μl foi submetida à eletroforese em gel de agarose a 1 %, também corado com brometo de etídeo. A análise do gel, sob luz ultravioleta, teve o objetivo de avaliar qualitativamente o padrão eletroforético das amostras do DNA complementar (cDNA) resultante da reação.

Para a análise da taxa de diferenciação celular, o cDNA das amostras foi submetido à técnica de reação da polimerase em cadeia em tempo real (RT-PCR), utilizando os pares de iniciadores (*primers*) específicos para as isoformas IIa e IIx da MHC. Como controle endógeno do experimento, foi amplificado o cDNA referente ao RNAm do gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). A seqüência dos iniciadores utilizados é apresentada a seguir:

MHC-Iia	
Iniciador	Seqüência
Senso	5' – AGGTTCACTAAAGTCATAAGTGAAGAGT – 3'
Anti-senso	5' – ACATGACCAAAGGCTTCACATTT – 3'
Tamanho do fragmento amplificado	95 pares de base (pb)

MHC-Iix	
Iniciador	Seqüência
Senso	5 – AATCATAAGCGAAGAGTGATCGAT – 3'
Anti-senso	5' – CGTAAGTACAAAATGGAGTGACAAAGA – 3'
Tamanho do fragmento amplificado	97 pb

GAPDH	
Iniciador	Seqüência
Senso	5' – GATGCTGGTGCTGAGTATGTCTG – 3'
Anti-senso	5' – GTGGTGCAGGATGCATTGCTGA – 3'
Tamanho do fragmento amplificado	197 pb

Foram utilizados, para cada gene avaliado, 80 ng da amostra (cDNA), diluída em solução contendo 25µl de água, 25 µl da enzima SYBR Master Mix[®] (APPLYED PHYSIOL) e o par de iniciadores específicos à concentração de 450 nM. Para aumentar a confiabilidade dos resultados, os experimentos foram efetuados em duplicata. A reação foi realizada em termociclador de DNA (Gene Amp[®] 5700 Sequence Detector, APPLYED BIOSYSTEMS) e o protocolo de ciclos utilizado é apresentado abaixo:

Temperatura (° C)	Tempo	
50	2 minutos	
95	10 minutos	
95	15 segundos	40 ciclos
60	1 minuto	

As curvas de amplificação, resultantes da correlação entre a detecção da fluorescência dos iniciadores marcados e dos ciclos de amplificação, foram utilizadas para avaliar a taxa de expressão das isoformas da MHC pelas CPMs dos grupos irradiados em relação ao controle.

3.2 Análise in vivo

3.2.1 Animais

Foram utilizados 28 ratos *Wistar*, machos, com a massa corporal inicial de 434 ± 35 g. Os animais foram fornecidos pelo biotério central da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e alojados em biotério próprio no Laboratório de Neurociências, onde foram mantidos em gaiolas plásticas (máximo de 3 animais por caixa). Todos os animais possuíam livre acesso à água e ração peletizada e foram submetidos a um controle ambiental de luminosidade (ciclo claro/escuro de 12h) à temperatura ambiente. Um período de adaptação de uma semana antecedeu o início dos experimentos. Todo o estudo foi realizado de acordo com normas internacionais de bioética para experimentação animal.

3.2.2 Protocolo de Criolesão

Para a indução da lesão, os animais foram inicialmente pesados e anestesiados por meio de injeção intraperitoneal de solução composta por Cloridrato de Xilazina (12mg/kg) e Cloridrato de Ketamina (95mg/kg). Em seguida, a pele que recobre o músculo tibial anterior direito (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 TA, 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 6 mm de largura e 30 mm de comprimento, 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,

suturando-se em seguida a pele (Fio Nylon 3-0 – SHALON LTDA) e limpando-a com álcool iodado.

Estudo piloto prévio realizado em nosso laboratório demonstrou que esse método determina um sítio de lesão bastante homogêneo e restrito à região superficial do ventre do músculo TA (dados não publicados) .

3.2.3 Grupos experimentais

Os animais foram, aleatoriamente, divididos em 4 grupos experimentais (n = 7), sendo 3 destinados especificamente aos procedimentos de irradiação. Cada um deles foi submetido à radiação em um λ específico. O grupo excedente, denominado grupo placebo, foi submetido aos mesmos procedimentos experimentais, porém sem a emissão de radiação.

3.2.4 Protocolo de irradiação

O protocolo de irradiação foi elaborado na tentativa de adequar temporalmente a possível influência bioestimulante das radiações aos eventos de ativação, proliferação e diferenciação das CPMs durante o processo de regeneração do tecido muscular esquelético. Eles são diretamente responsáveis pelo êxito desse processo e ocorrem, aproximadamente, até o 7º dia subsequente ao início da lesão (CHAMBERS E McDERMOTT, 1996).

O protocolo consistiu de uma aplicação diária (a cada 24 h), durante 5 dias consecutivos, sendo a primeira efetuada 24 horas após a indução da lesão. As irradiações foram realizadas sobre a pele na região do ventre do músculo TAD, com os animais mantidos sob sedação (Cloridrato de Ketamina intraperitoneal, 22mg/Kg).

Os emissores foram os mesmos utilizados durante a irradiação das culturas celulares e a distância entre a extremidade da probe e a pele estabelecida para que se determinasse uma área de

projeção do feixe correspondente a 1 cm^2 . A preservação dessa distância durante os procedimentos de irradiação foi conseguida com a adaptação à extremidade das probes de um anteparo que foi mantido apoiado na perna do animal (Figura 7). Essa metodologia caracterizou a densidade de potência das irradiações na pele dos animais como sendo sua potência de emissão, novamente mensurada antes do início dos experimentos, por cm^2 . Não foram identificadas diferenças significantes entre os valores obtidos nessa aferição da potência dos equipamentos e os encontrados durante a realizada inicialmente aos experimentos *in vitro* (diferenças inferiores a 0,2 mW).

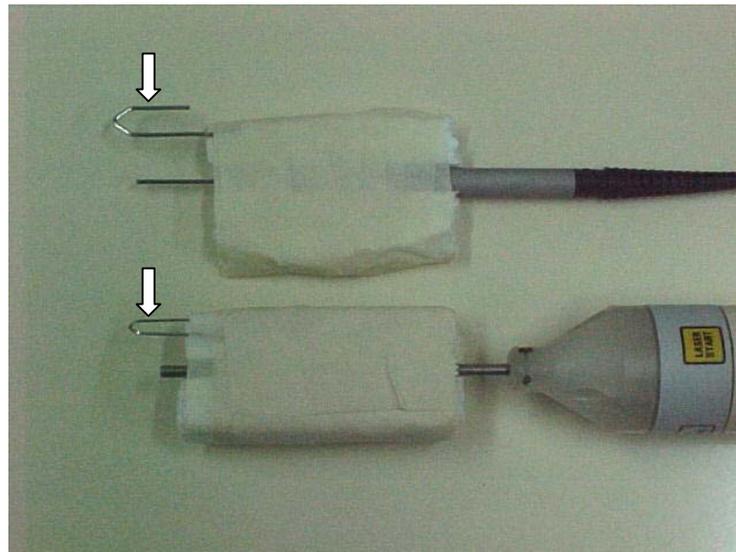


Figura 7: Adaptação de um anteparo (seta) à extremidade das probes de emissão para a manutenção da distância entre elas e a pele dos animais durante as irradiações.

O objetivo, nessa fase da investigação, foi irradiar os músculos lesionados com os valores de DE_{max} para cada λ . Tendo em vista a utilização da técnica transdérmica de irradiação, foi necessária a identificação prévia da atenuação da radiação proporcionada pela pele dos animais, procedimento indispensável para o correto ajuste dos parâmetros de irradiação.

Os experimentos para a determinação da atenuação da radiação foram realizados no Laboratório de Ótica do Instituto de Física da Universidade de São Paulo (IFSC-USP/São

Carlos), em colaboração com o Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato. O método utilizado, descrito por Melo e colaboradores em 2001, é caracterizado pela determinação indireta, com a aplicação um modelo matemático, da perda de intensidade da radiação durante sua propagação pelos tecidos biológicos (atenuação). Aplicado na situação experimental proposta nesta pesquisa, irradiando a pata de 1 rato excedente apresentando massa corporal similar aos demais, foi possível determinar que a radiação atingia a região superficial do músculo TA com cerca de 70 % da intensidade administrada na superfície da pele. Com base nesse resultado, foi possível calcular a provável DP da radiação incidindo no sítio de lesão, específica para cada λ , e o tempo de irradiação necessário para a administração dos respectivos valores de $DE_{m\acute{a}x}$. Os valores de DP das radiações nos músculos, resultante da irradiação transdérmica, foram calculados em 25,5, 25,3 e 25,9 mW/cm^2 respectivamente para os λ de 670, 685 e 830 nm.

No 6º dia após o da indução da lesão, que representa um período de 24 horas após a última irradiação, os animais foram pesados, anestesiados e submetidos à eutanásia com a injeção intracardíaca de cloreto de potássio (KCL – 3M).

3.2.5 Análise histológica e histoquímica

Dos 7 animais de cada grupo, 2 foram, aleatoriamente, separados para a realização da análise histológica e histoquímica dos músculos. O baixo número de amostras justifica-se pelo objetivo central dessa análise que seria proporcionar uma avaliação e descrição qualitativa do processo de regeneração muscular frente à metodologia adotada.

O músculo TAD da cada animal foi dissecado, removido e imediatamente pesado em balança analítica (DENVER INSTRUMENT COMPANY), sendo, posteriormente, fixado com pequenas agulhas, por meio de suas extremidades, a um pedaço de fígado pré-fixado em formol. Esse procedimento foi executado para evitar alterações no comprimento e ou torções dos feixes

musculares durante o processo de congelamento. Os músculos, juntamente com seus suportes de fígado, foram então congelados em isopentano, pré-congelado em nitrogênio líquido, e armazenados em freezer a uma temperatura aproximada de -80°C .

Dando seqüência ao protocolo, os músculos foram seccionados em micrótomo criostato (HM 505E - MICROM), obtendo-se cortes transversais seriados, com espessura de 10 μm , da região correspondente ao ventre dos músculos TAD.

As lâminas histológicas com os cortes seriados foram, alternadamente, coradas com Azul de Toluidina (TB) ou submetidas à reação enzimática para Succinato Desidrogenase (SDH, NACHLAS et al., 1957). A coloração com TB possibilitou a caracterização do padrão morfológico do tecido muscular esquelético durante o processo de regeneração. Já a reação histoenzimática para SDH permitiu avaliar, de maneira qualitativa, a densidade mitocondrial das fibras musculares.

3.2.6 Dosagem da atividade das enzimas CS e LDH

Os animais restantes em cada grupo ($n = 5$) foram destinados à dosagem da atividade das enzimas CS e LDH. Para a realização dessa análise, foi preconizada a utilização prioritária do tecido muscular correspondente ao sítio de lesão no TAD, facilmente visualizado ao ser removida a pele do animal para a remoção do material. Com o auxílio de um bisturi, duas incisões foram realizadas na espessura total do músculo delimitando um fragmento de 1 cm de extensão, mensurado com paquímetro, contendo o sítio de lesão. Uma nova incisão foi necessária, para isolar a parte superficial, sendo executada exatamente na região de transição entre a pequena camada superficial constituída de fibras menos vascularizadas (região mais clara correspondendo a aproximadamente 1/3 da espessura) e a camada profunda de fibras mais vascularizadas (região mais escura) do músculo. O fragmento removido foi, imediatamente, pesado em balança analítica

e novamente seccionado, resultando em duas partes distintas. Uma delas, abrangendo aproximadamente 1/3 da massa inicial, foi direcionada para a análise da cinética da enzima CS, sendo a outra (aproximadamente 2/3) destinada à cinética da enzima LDH. Os fragmentos foram, então, congelados por meio da imersão em nitrogênio líquido e armazenados em freezer à temperatura de -80° C. O mesmo procedimento de extração foi realizado no músculo TAE dos animais para a aquisição de um grupo controle, que foi determinado pela escolha aleatória de 5 músculos entre os grupos experimentais e serviu como parâmetro para a identificação da atividade dessas enzimas em situação de integridade tecidual.

As análises foram realizadas no Laboratório de Evolução Molecular, pertencente ao Departamento de Genética e Evolução Molecular da Universidade Federal de São Carlos (DGE/UFSCar), com a colaboração da Profa. Dra. Maria Luiza B. Schwantz. Para a obtenção dos extratos dos tecidos os fragmentos destinados a cada cinética enzimática em cada grupo experimental foram homogeneizados conjuntamente (*pool*). Os tampões de homogeneização foram específicos para cada cinética e utilizou-se uma relação peso/volume de 1/4. Na cinética para a enzima CS, foi utilizado o tampão contendo 1 mM de EDTA (SIGMA), 20 mM de HEPES (N-[2-hidroxietil] piperazine-N'-[ácido 2-etanosulfônico] - SIGMA) e TRITON X-100 (SIGMA) a 1 %. Já para LDH, foi utilizado o tampão contendo 150 mM de Imidazol (SIGMA), 1 mM de EDTA, 5 mM de DTT (Ditioneitol - SIGMA) e TRITON X-100 a 1 %. Os homogeneizados foram então centrifugados durante 15 minutos a 27.000 g sob a temperatura de 4° C (SORVALL RC-5B). Ao término desta fase, o sobrenadante foi removido e utilizado para a determinação da atividade enzimática através de análise espectrofotométrica. Para este procedimento foi utilizado um espectrofotômetro (UV-Vis G1107 A Diode Array – HEWLETT-PACKARD), com unidade ótica modelo 8452-A controlada pelo software de cinética multicélula, e controlador de temperatura tipo Peltier, utilizando técnicas revistas por Driedzic & Almeida-Val (1996).

Para a realização das análises, substratos e cofatores foram dissolvidos em um tampão de ensaio e ajustados para o pH experimental. Os constituintes desse tampão para as cinéticas da enzima CS foram 0,4 mM de Acetil Coenzima-A (SIGMA), 0,25 mM de DNTB (5,5'-Dithio-bis(ácido 2-nitrobenzóico) – SIGMA) e 75 mM de Tris-HCl em pH 8,0. Para LDH, foram utilizados 0,15 mM de NADH (forma reduzida do composto adenina dinucleotídeo nicotinamida- β - SIGMA), 1 mM de KCN e 50 mM de Imidazol em pH 7,4.

A atividade das enzimas foi mensurada em volume final de 1 ml, sendo realizada triplicata de cada amostra. As reações foram iniciadas pela adição de substrato, sendo utilizado 1 e 10 mM de Piruvato (SIGMA) para a LDH e 0,5 mM de Ácido Oxalacético (SIGMA) para a CS.

A determinação da atividade da LDH foi obtida com o monitoramento (variação dos valores de DO) da redução do NADH a 340 nm. Para a CS, foi monitorada a produção do ânion reduzido de DNTB a 412 nm.

O cálculo para a determinação da atividade enzimática seguiu a equação descrita a seguir:

$$\mu\text{moles substrato} / \text{g}^{-1}(\text{tecido fresco}) / \text{minuto} = \frac{\text{fd (amostra)} \times \text{fd (cubeta)} \times \Delta \text{DO}/\text{minuto}}{\text{CEM}}$$

onde:

- ✓ fd = fator de diluição;
- ✓ $\Delta\text{DO}/\text{minuto}$ = variação da DO por minuto;
- ✓ CEM = Coeficiente de extinção molar para a enzima:
 - CS = 13,6
 - LDH = 6,22

3.3 Análise Estatística

Tanto os dados referentes aos experimentos in vitro (taxa de proliferação e diferenciação celular) como in vivo (atividade enzimática das enzimas CS e LDH) foram submetidos ao teste de variância (ANOVA One-Way), permitindo a análise comparativa entre os grupos experimentais. O teste de Tukey foi eleito para a caracterização das diferenças entre grupos específicos. O nível de significância aceito foi de 5 % ($p \leq 0,05$).

Para o estabelecimento da equação e coeficiente de correlação entre os valores de DO e contingente celular após a elaboração da curva padrão DO/cél, realizada durante a análise da influência das radiações sobre a taxa de proliferação celular, foi utilizada a regressão polinomial quadrática.

4 Resultados

4.1 Análise *in vitro*

4.1.1 Taxa de proliferação celular

Os resultados referentes ao estabelecimento da curva padrão DO/cél. são apresentados a baixo, evidenciando a relação diretamente proporcional entre o contingente celular de CPMs e os valores de DO adquiridos com as leituras colorimétricas pela técnica do MTT-formazana (Figura 8). Como previamente mencionado, a DO representa a quantidade de azul de formazana presente nos poços, que, por sua vez, é fruto da atividade metabólica das células viáveis existentes.

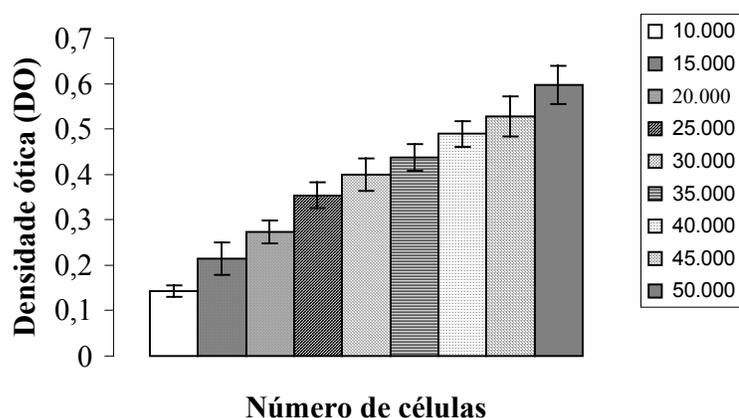


Figura 1: Curva padrão (DO/cél.) demonstrando os valores da DO, obtidos por meio do método colorimétrico MTT-formazana, das amostras contendo contingentes celulares de CPMs pré determinados.

Ao submetê-los ao procedimento estatístico de regressão, tornou-se perceptível, por meio da análise de ajuste dos valores (Figura 9) e distribuição dos resíduos (Figura 10), que o comportamento da relação entre os parâmetros (DO e número de células) apresentou uma função quadrática, determinando a análise de regressão polinomial quadrática como a mais apropriada para representá-la.

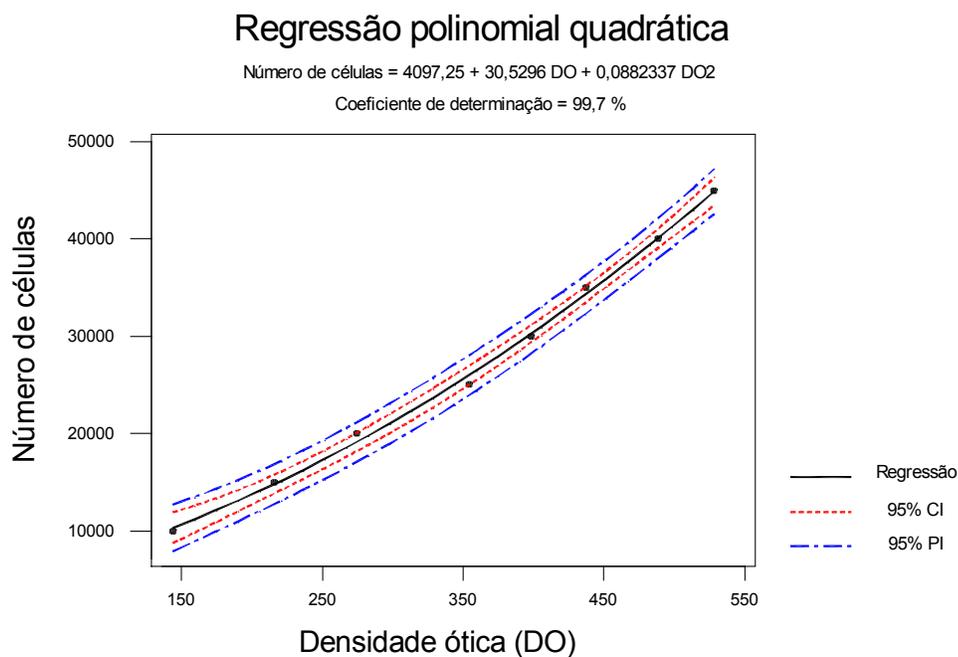


Figura 2: Análise estatística de regressão polinomial quadrática representando a correlação entre os valores de DO e número de células da curva DO/cél. São demonstrados ainda a equação de conversão e o coeficiente de determinação.

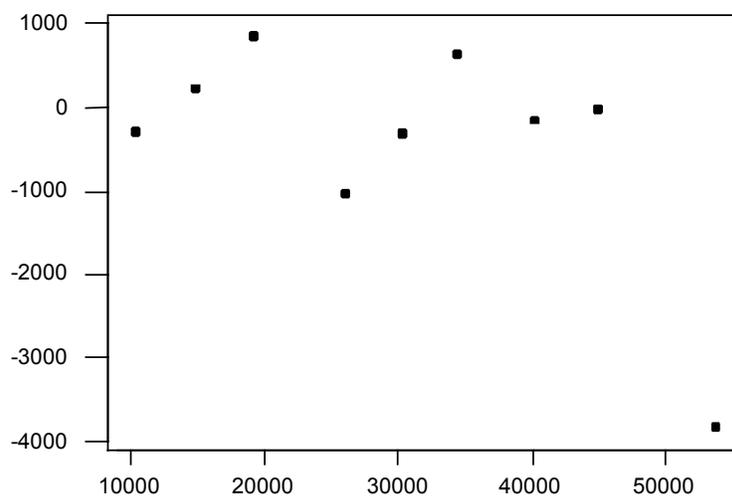


Figura 3: Distribuição dos resíduos referentes à análise de regressão polinomial quadrática que representa a correlação entre os valores de DO e número de células da curva DO/cél. Observa-se uma distribuição aleatória dos valores, com exceção do ponto correspondente ao limite superior da curva.

O coeficiente de determinação identificado nessa análise foi de 99,7% e a equação de conversão dos valores encontra-se abaixo:

Equação

$$\text{Número de células} = 4097,25 + 30,5296 \times \text{DO} + 0,0882337 \times \text{DO}^2$$

Aplicando-se os valores de DO obtidos após os procedimentos de irradiação à equação, foi possível estabelecer, para todas amostras dos grupos experimentais (DE) dos 3 λ utilizados, o contingente celular nos poços, necessário para a subsequente determinação dos valores da taxa de proliferação celular.

Para o λ de 670 nm, na concentração de 10% de SFB adicionado ao meio de cultura celular, nota-se que, quando administrada nas densidades energéticas de 0,9 e 1,2 J/cm², a radiação foi responsável pelo aumento significativo no número de células em relação ao controle não irradiado ($p \leq 0,02$). Esse efeito bioestimulante demonstrou-se mais intenso na dose de 1,2 J/cm², sendo também, embora não representado graficamente, significativamente maior que em 0,9 J/cm² ($p = 0,01$). A DE de 1,5 J/cm² demonstrou um valor médio de contingente celular menor que o controle, porém sem ter apresentado diferença estatisticamente significativa (Figura 11).

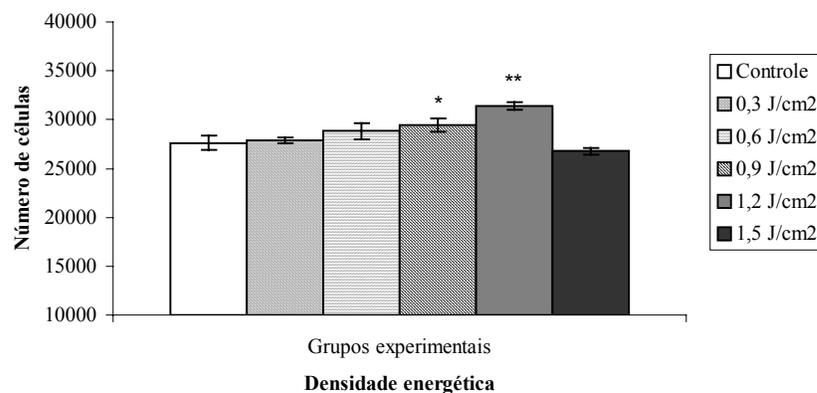


Figura 4: Efeito dose-dependente da radiação LASER no λ de 670 nm sobre a proliferação celular de CPMs mantidas em meio de cultura suplementado com 10% de SFB. São apresentados os valores da média e desvio padrão do contingente celular das réplicas nos grupos experimentais 24h após a irradiação. * $p \leq 0,02$ em relação ao controle não irradiado.

Apresentados sob a forma da taxa de proliferação celular, verifica-se que a radiação, nessas condições experimentais, foi responsável pelo aumento, em relação ao controle, de aproximadamente 13,6% na DE de 1,2 J/cm² e 6,6% na DE de 0,9 J/cm² (Figura 12).

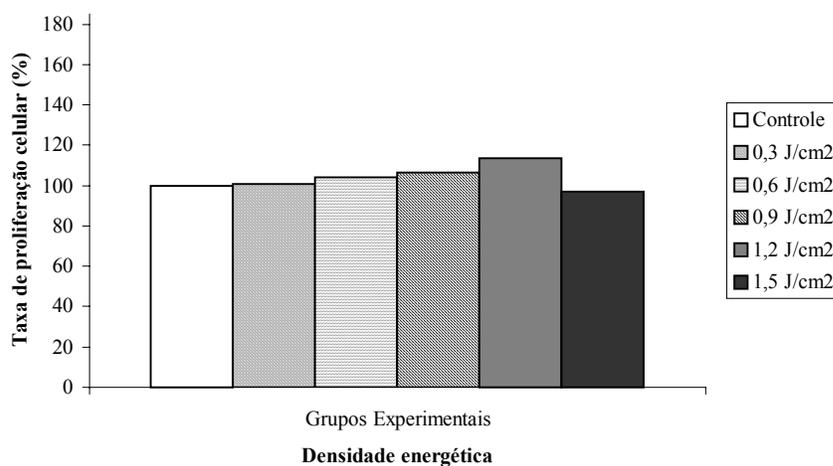


Figura 5: Representação sob a forma de taxa de proliferação celular do efeito dose-dependente da radiação LASER no λ de 670 nm sobre cultura de CPMs mantidas em meio de cultura celular suplementado com 10% de SFB.

Já quando os mesmos parâmetros de irradiação foram utilizados em ambiente nutricional menos favorável (5% de SFB), pôde-se comprovar que o efeito estimulante, além de mais intenso, foi desencadeado em todas as doses utilizadas (Figura 13).

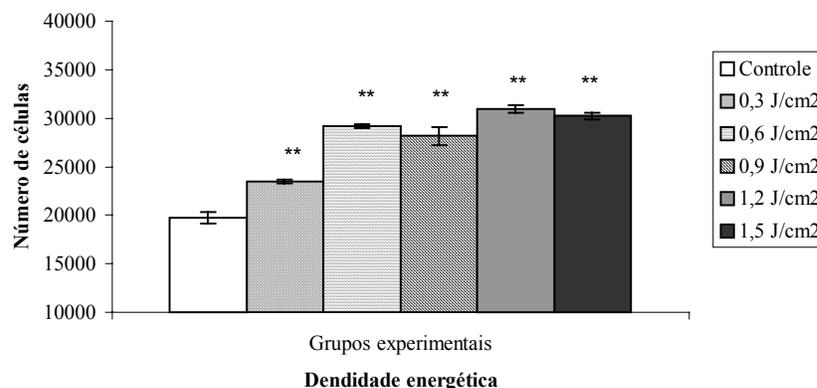


Figura 6: Efeito dose-dependente da radiação LASER no λ de 670 nm sobre a proliferação celular em cultura de CPMs mantidas em meio de cultura suplementado com 5% de SFB. São apresentados os valores da média e desvio padrão do contingente celular das réplicas nos grupos experimentais 24h após a irradiação. ** $p \leq 0,0001$ em relação ao controle não irradiado.

Como haveria de se esperar, o valor de contingente celular do grupo controle foi sensivelmente inferior ao do mesmo grupo sob condições de crescimento celular mais favoráveis (10% de SFB). Analisando, estatisticamente, o comportamento dessa curva dose-resposta em relação aos grupos irradiados entre si, é possível verificar que há, com o aumento das doses de irradiação, uma intensificação do potencial bioestimulante. Embora a dose de 0,9 J/cm² tenha sido responsável por um valor médio inferior quando comparado à dose de 0,6 J/cm², não há diferença significativa entre eles ($p = 0,2$). O mesmo foi evidenciado entre as doses de 1,5 e 1,2 J/cm² ($p = 0,5$). A dose de 1,2 J/cm², de forma semelhante à irradiação realizada com 10% de SFB, foi responsável pelo maior valor médio de contingente celular. Convertido em taxa de proliferação celular, a radiação nessa DE demonstrou ser responsável por um aumento de 56,8%

em relação ao controle não irradiado (Figura 14). Esses resultados permitem considerá-la, para o λ de 670 nm, como a dose mais efetiva, no que se refere ao estímulo à proliferação das CPMs.

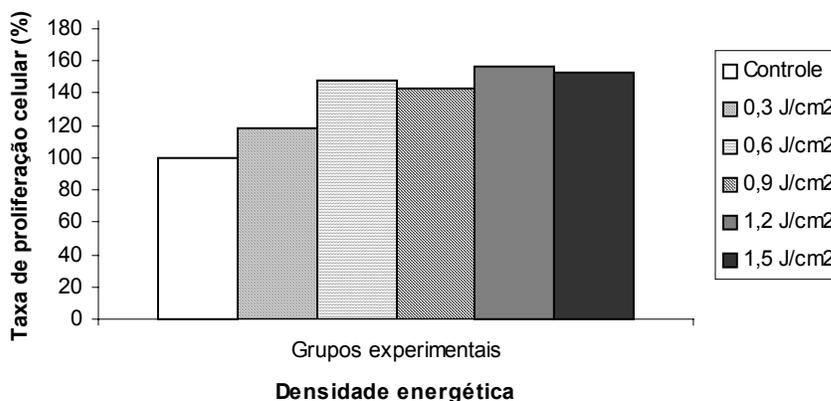


Figura 7: Representação sob a forma de taxa de proliferação celular do efeito dose-dependente da radiação LASER no λ de 670 nm sobre cultura de CPMs mantidas em meio de cultura celular suplementado com 5% de SFB.

Os resultados obtidos frente à irradiação utilizando o λ de 685 nm permitem confirmar a efetividade dessa em também influenciar a capacidade proliferativa das CPMs. As características desse potencial bioestimulante em relação ao evidenciado no λ de 670 nm diferem, principalmente, no que se refere à influência específica de cada valor de DE e a intensidade das respostas.

Em ambiente nutricional mais favorável, foi possível determinar que a efetividade da radiação em estimular a proliferação celular foi restrita às doses de 0,3, 0,6 e 0,9 J/cm² ($p \leq 0,001$). Os valores mais expressivos foram identificados nas duas doses inferiores e, embora o valor médio do contingente celular identificado em resposta à irradiação com a DE de 0,6 J/cm² seja sutilmente maior que em 0,3 J/cm², não há diferença estatisticamente significativa entre eles ($p = 0,99$). Isso sugere a similaridade do potencial bioestimulador dessas doses nesse este tipo

radiação. Com a utilização da DE de $1,2 \text{ J/cm}^2$, não foi identificada diferença nos valores de contingente celular em relação ao controle não irradiado. Já a determinação de um contingente significativamente inferior no grupo irradiado com a dose de $1,5 \text{ J/cm}^2$ ($p = 0,0006$) caracteriza uma influência negativa da radiação, ou seja, um potencial inibitório sobre a atividade proliferativa das CPMs (Figura 15).

Expressos sob a forma de taxa de proliferação celular, foi possível estabelecer que a radiação no λ de 685 nm, administrada nas doses de 0,3, 0,6 e 0,9 J/cm^2 , foi responsável, respectivamente, pelo aumento de 16,7; 17,5 e 8,8 % em relação ao controle. Já a dose de 1,5 J/cm^2 acarretou uma queda na taxa de proliferação de 10% (Figura 16).

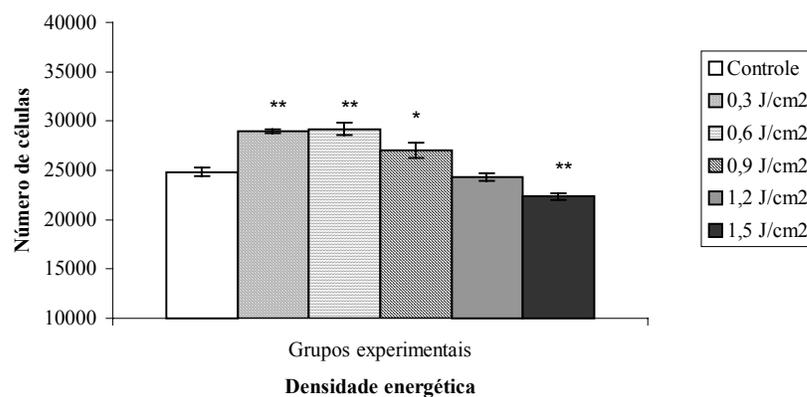


Figura 8: Efeito dose-dependente da radiação LASER no λ de 685 nm sobre a proliferação celular em cultura de CPMs mantidas em meio de cultura suplementado com 10% de SFB. São apresentados os valores da média e desvio padrão do contingente celular das réplicas nos grupos experimentais 24h após a irradiação. ** $p \leq 0,001$ em relação ao controle não irradiado.

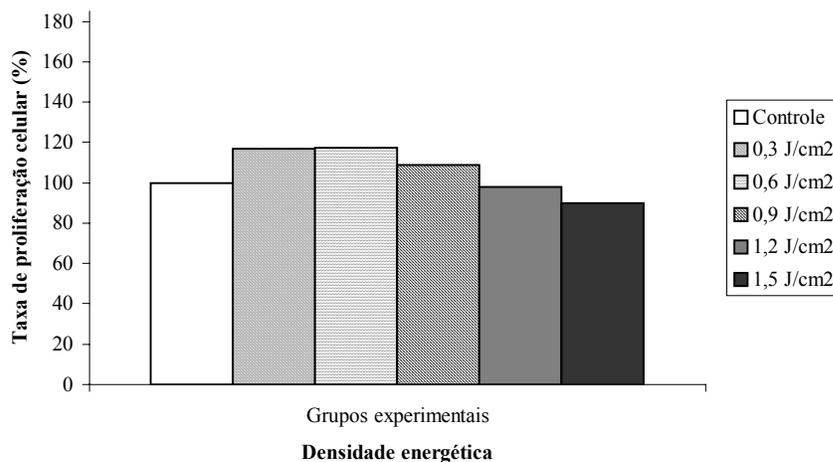


Figura 9: Representação sob a forma de taxa de proliferação celular do efeito dose-dependente da radiação LASER no λ de 685 nm sobre cultura de CPMs mantidas em meio de cultura celular suplementado com 10% de SFB.

De forma semelhante ao evidenciado no λ de 670 nm, o ambiente nutricional interferiu intensamente na influência da radiação no λ de 685 nm sobre o potencial proliferativo das CPMs. A menor disponibilidade de SFB proporcionou à radiação uma maior efetividade, no que se refere ao seu potencial bioestimulante, sendo ele agora demonstrado em níveis altamente significantes ($p \leq 0,0001$) para todos os valores de DE em relação ao controle não irradiado (Figura 17).

O valor médio mais expressivo de contingente celular foi identificado, quando utilizada a dose de $0,6 \text{ J/cm}^2$. A análise estatística entre os grupos irradiados, que não se encontra ilustrada na respectiva figura, demonstra só não haver diferença significativa entre as doses de 0,3 e $0,6 \text{ J/cm}^2$ ($p = 0,09$) e 0,9 e $1,2 \text{ J/cm}^2$ ($p = 0,6$). Com isto é possível considerar que, para essas condições experimentais, o potencial bioestimulante da radiação de 685 nm apresenta um comportamento sugestivo de uma relação inversamente proporcional ao aumento dos valores de DE estabelecidos na curva dose-resposta.

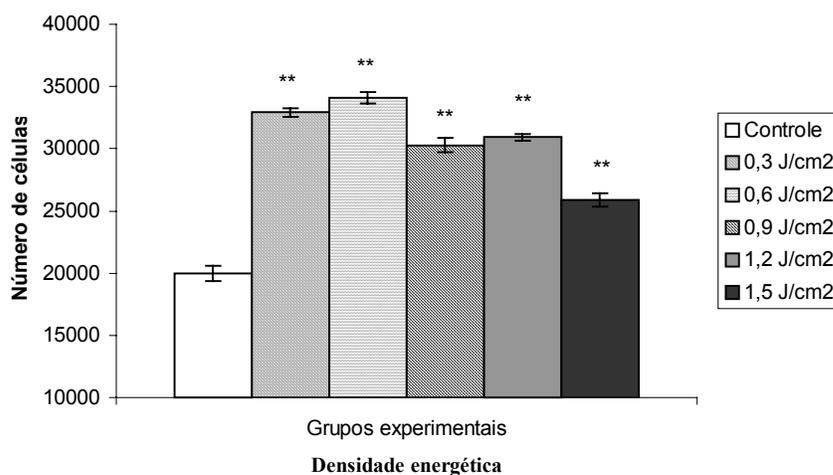


Figura 10: Efeito dose-dependente da radiação LASER no λ de 685 nm sobre a proliferação celular em cultura de CPMs mantidas em meio de cultura suplementado com 5% de SFB. São apresentados os valores da média e desvio padrão do contingente celular das réplicas nos grupos experimentais 24h após a irradiação. ** $p \leq 0,0001$ em relação ao controle não irradiado.

A expressão dos resultados sob a forma da taxa de proliferação celular demonstra que, para as doses crescentes de DE, as elevações em relação ao controle foram respectivamente de 64,7; 70,6; 51,7; 54,9 e 29,7 % (Figura 18).

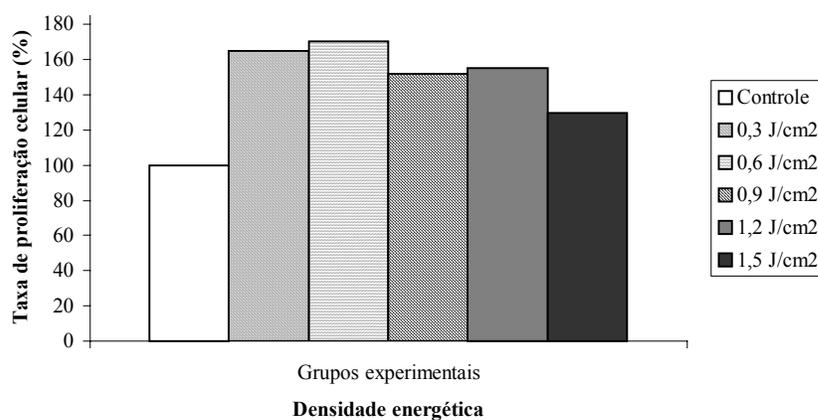


Figura 11: Representação sob a forma de taxa de proliferação celular do efeito dose-dependente da radiação LASER no λ de 685 nm sobre cultura de CPMs mantidas em meio de cultura celular suplementado com 5% de SFB.

Os resultados referentes à utilização da radiação com λ de 830 nm demonstraram um comportamento biomodulador, em ambiente nutricional contendo 10 % de SFB, muito similar ao apresentado com a radiação de 685 nm (Figura 19). O efeito foi evidenciado nos valores 0,3, 0,6 e 0,9 J/cm² ($p \leq 0,0002$), não havendo diferença estatisticamente significativa entre eles ($p \geq 0,05$). Embora a dose de 1,5 J/cm² tenha apresentado valor médio de contingente celular ligeiramente diferente do grupo controle, não exibiu significância estatística ($p \geq 0,05$). Nessas condições experimentais, a radiação foi responsável pelo aumento de, em média, 10,8 % na taxa de proliferação celular (Figura 20).

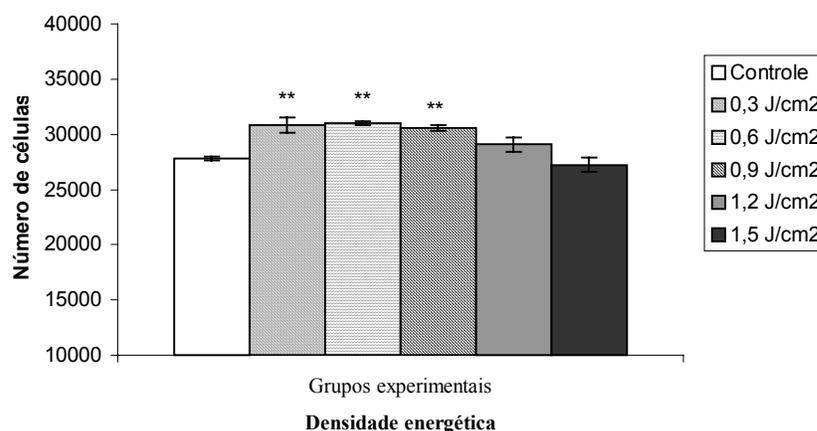


Figura 12: Efeito dose-dependente da radiação LASER no λ de 830 nm sobre a proliferação celular em cultura de CPMs mantidas em meio de cultura suplementado com 10% de SFB. São apresentados os valores da média e desvio padrão do contingente celular das réplicas nos grupos experimentais 24h após a irradiação. ** $p \leq 0,0002$ em relação ao controle não irradiado.

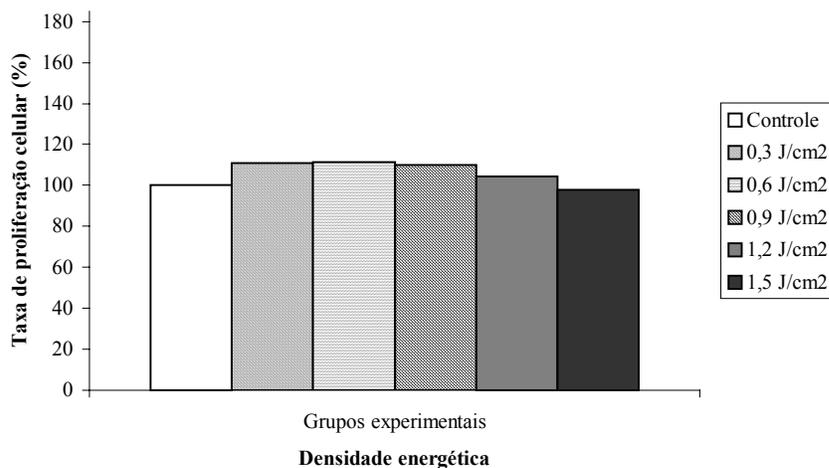


Figura 13: Representação sob a forma de taxa de proliferação celular do efeito dose-dependente da radiação LASER no λ de 830 nm sobre cultura de CPMs mantidas em meio de cultura celular suplementado com 10% de SFB.

Assim como para as demais, a diminuição da concentração do SFB potencializou o efeito bioestimulante da radiação neste λ (Figura 21). O maior valor de contingente celular foi identificado com a utilização de $0,3 \text{ J/cm}^2$. Todas as demais doses também exibiram um potencial bioestimulante ($p \leq 0,0001$), porém com intensidades menores diferenciadas entre si. A análise estatística entre os grupos irradiados demonstrou não haver significância apenas entre as doses de $0,6$ e $0,9 \text{ J/cm}^2$ ($p = 0,99$). Esses resultados caracterizam um comportamento para a curva dose-resposta, onde a efetividade do potencial bioestimulante relaciona-se de forma inversamente proporcional ao valor de DE.

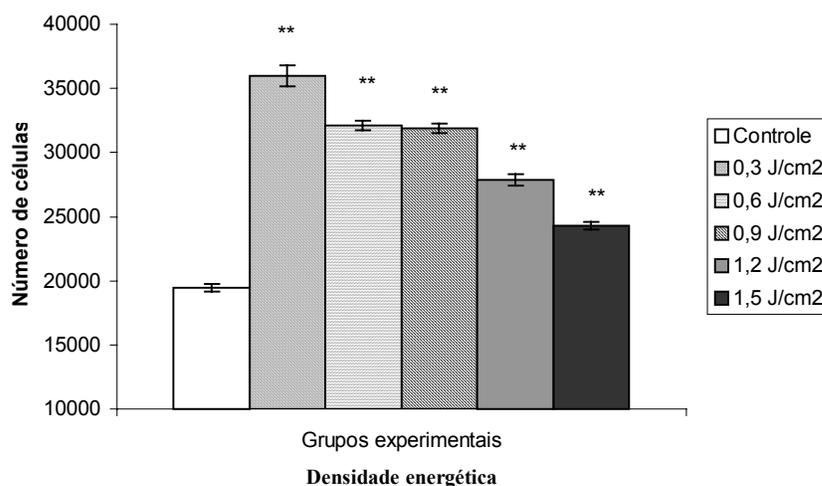


Figura 14: Efeito dose-dependente da radiação LASER no λ de 830 nm sobre a proliferação celular em cultura de CPMs mantidas em meio de cultura suplementado com 5% de SFB. São apresentados os valores da média e desvio padrão do contingente celular das réplicas nos grupos experimentais 24h após a irradiação. ** $p \leq 0,0001$ em relação ao controle não irradiado.

O percentual de aumento na taxa de proliferação celular nessas condições experimentais alcançou 84,8 % com a dose de 0,3 J/cm², seguido pelos valores de 64,9, 63,9, 43,1 e 24,8 % respectivamente para as doses crescentes de radiação (Figura 22).

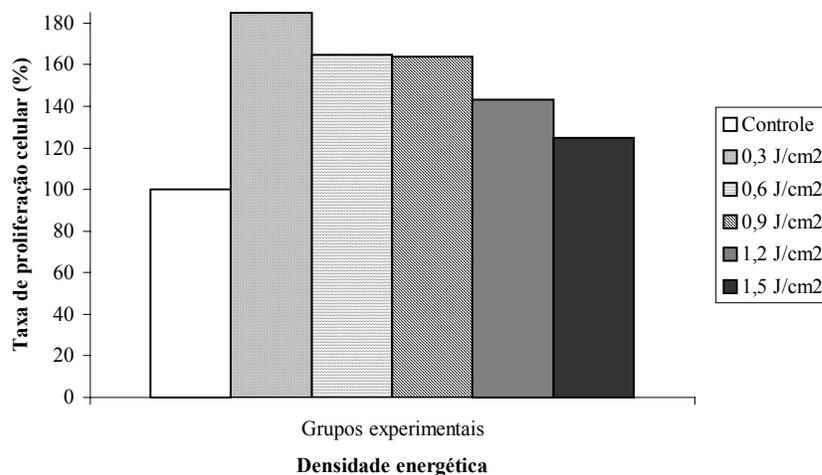


Figura 15: Representação sob a forma de taxa de proliferação celular do efeito dose-dependente da radiação LASER no λ de 830 nm sobre cultura de CPMs mantidas em meio de cultura celular suplementado com 5% de SFB.

Levando-se em consideração os resultados apresentados, é possível identificar um comportamento bastante similar no que se refere à investigação da influência das radiações sobre a capacidade proliferativa das CPMs. Todas foram capazes de estimulá-la com um caráter dose-dependente, sendo que, para cada λ , foi evidenciado um comportamento e efetividade específicos. Em relação aos valores médios de contingente celular, a radiação no comprimento de onda de 670 nm exibiu sua maior efetividade com uma DE considerada elevada dentro dos valores estipulados para a curva dose-resposta ($1,2 \text{ J/cm}^2$), sendo responsável pelo aumento de 56,8% na taxa de proliferação celular. Para as demais radiações, o efeito bioestimulante foi alcançado com menores valores de DE, 0,6 e $0,3 \text{ J/cm}^2$ respectivamente para os λ de 685 e 830 nm, e ocorreu em maior intensidade, como pôde ser constatado pelos valores percentuais de elevação nas taxas de proliferação celular. O λ de 830 nm demonstrou o resultado mais expressivo (84,8 %), seguido pelo valor de elevação proporcionado pela radiação de 685 nm (70,6 %).

Os resultados, também, permitem considerar a influência do ambiente nutricional, representado pela concentração de SFB no meio de cultura, no papel bioestimulante das radiações sobre a função proliferativa das células. Quando investigados com a concentração de SFB em 10 % os valores de elevação nas taxas, considerando todas as radiações, apresentaram-se sempre inferiores a 18 %. Trata-se de valores substancialmente inferiores aos apresentados acima, alcançados na presença de 5 % de soro.

Baseado nos resultados demonstrados, foram determinados os parâmetros referentes ao procedimento de irradiação para a análise da influência das radiações sobre a diferenciação celular. As células foram, inicialmente, mantidas em meio contendo 5 % de SFB e a dose de

irradiação utilizada nos λ de 670, 685 e 830 nm foram respectivamente de 1,2; 0,6 e 0,3 J/cm², o que corresponde aos valores de DE_{máx}.

4.1.2 Taxa de diferenciação celular

Os resultados referentes à análise espectrofotométrica das amostras após extração do RNA total são apresentados abaixo (Tabela 1). No geral observa-se que para todas as amostras, independente do procedimento experimental adotado, a relação entre o valor de DO260/DO280 apresentou-se muito próximo, por vezes idêntico, a 2,0. Esse representa o valor máximo do intervalo considerado ideal da relação e sugere a elevada qualidade do material extraído.

Em relação à quantidade de RNA, foi possível observar uma discreta diferença na média entre os grupos, justificando a realização de uma análise estatística comparativa com o intuito de investigar alguma influência das radiações sobre o grau de expressão gênica das células. Os resultados dessa análise são apresentados na Figura 23.

Resultados

Tabela 1: Valores resultantes da análise espectrofotométrica sob luz ultravioleta do RNA total extraído das amostras pertencentes ao grupo controle e irradiado com os λ de 670, 685 e 830 nm. São apresentadas as relações entre a DO260/DO280 nm, a quantidade de RNA total das amostras e a média (X) e desvio padrão (SD) destes valores para cada grupo experimental.

Grupo	Amostra	Quantidade de RNA (μ g)	Relação DO260/DO280 nm
Controle	1	23,9	1,9933
	2	24,2	1,9610
	3	22,5	1,9929
	4	25,8	1,9755
	5	25,9	2,0000
X \pm SD		24,4 \pm 1,4	
670 nm	1	25,2	1,9937
	2	23,1	1,9795
	3	27,9	1,8368
	4	24,9	1,9936
	5	25,9	1,9877
X \pm SD		25,4 \pm 1,7	
685 nm	1	23,5	1,9865
	2	27,2	2,0000
	3	27,4	1,9942
	4	28,9	1,9945
	5	27,7	1,9885
X \pm SD		26,9 \pm 2,0	
830 nm	1	28,9	1,9727
	2	27,8	1,9943
	3	27,4	1,9713
	4	27,5	1,9770
	5	28,3	1,9558
X \pm SD		27,9 \pm 0,6	

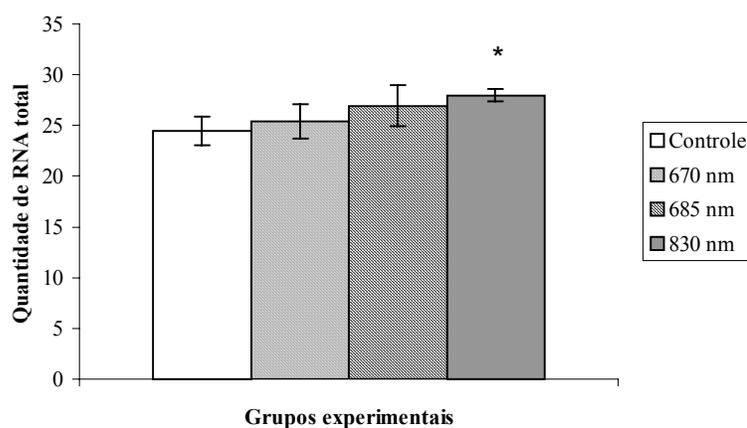


Figura 16: Representação dos valores referentes a média e desvio padrão da quantidade de RNA total (em μ g) extraída das amostras dos grupos controle e irradiados após a indução do processo de diferenciação celular. * $p = 0,01$ em relação ao controle não irradiado

Após a aplicação da análise de variância, seguida pela realização do teste de Tukey, foi possível determinar que há diferença estatisticamente significativa em relação ao controle não irradiado, apenas, para o grupo irradiado com o λ de 830 nm. Pode-se sugerir que essa radiação, administrada nos parâmetros dosimétricos utilizados nesse protocolo experimental, aumentou a taxa de expressão gênica das CPMs.

As amostras irradiadas com o λ de 685 nm, embora não tenham apresentado diferença estatisticamente significativa em relação às amostras controle, demonstraram valores individuais bastante similares aos encontrados nas irradiadas com 830 nm. O baixo valor apresentado pela amostra número 1 acarretou a elevação do desvio padrão, responsável pela ausência de significância em relação ao controle ($p = 0,09$). Esses fatos podem ser constatados avaliando-se os valores individuais das amostras descritos na tabela 1. Levando-os em consideração, seria possível, também, atribuir a essa radiação a efetividade em estimular a expressão gênica das células.

A integridade do RNA extraído, além de poder ser demonstrada quantitativamente, pode sê-lo também de forma qualitativa. O padrão eletroforético exibido pelas amostras no gel de agarose 1 % sob luz ultravioleta (Figura 24) permitiu a detecção das bandas 18 e 28S, referentes ao RNA ribossomal. A ausência do corante brometo de etídeo nos poços permitiu, ainda, descartar a possibilidade de contaminação das amostras com DNA, que poderia ser resultante de falha durante a fase de isolamento do RNA no processo de extração.

Já com a análise eletroforética das amostras de cDNA em gel de agarose 1 %, foi possível identificar o padrão de arraste característico, o que sugere a efetividade da reação de RT e a qualidade das amostras a serem utilizadas para a determinação da taxa de diferenciação celular (Figura 25).

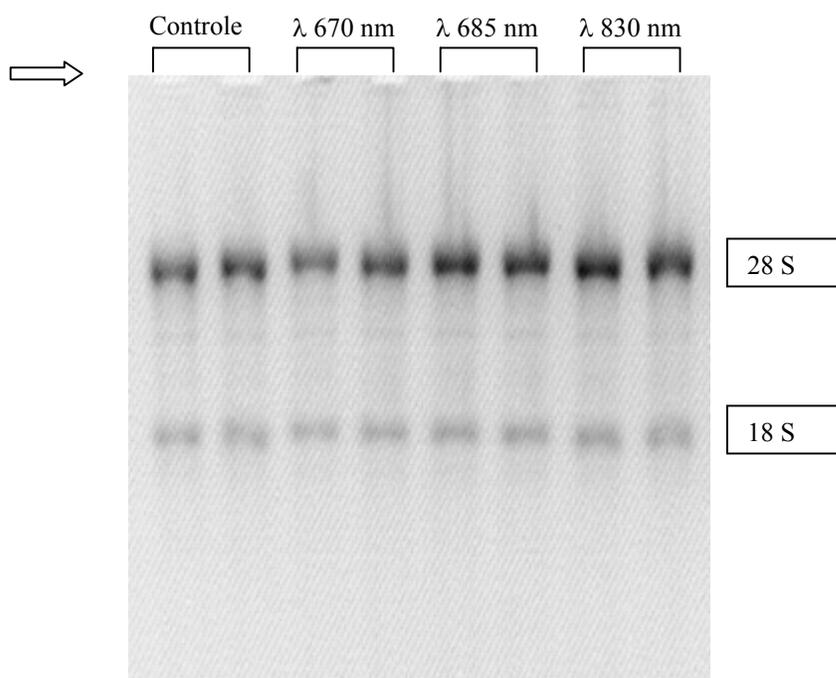


Figura 17: Padrão eletroforético das amostras de RNA total extraídas das culturas de CPMs 5 dias após irradiação e indução do processo de diferenciação celular. São verificadas as 2 bandas referentes aos componentes 28 S e 18 S do RNA ribossomal. Consta-se ainda a ausência de corante nos poços (seta).

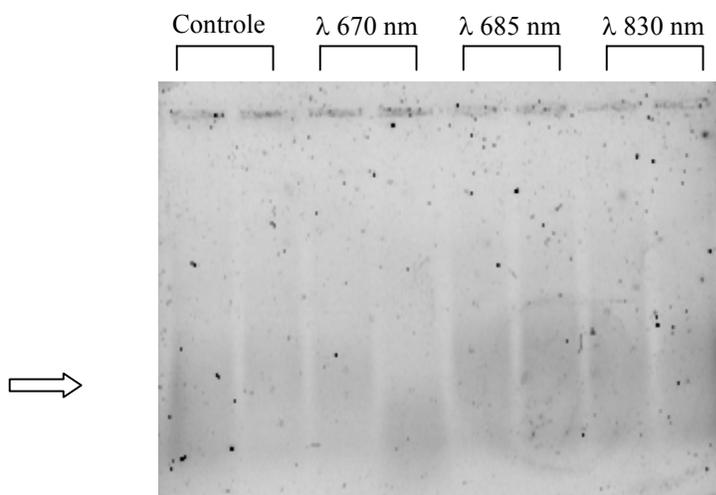


Figura 18: Padrão eletroforético das amostras de cDNA, resultantes da reação de transcriptase reversa, evidenciando o padrão característico de arraste (seta).

A análise dos resultados obtidos com a realização da técnica do RT-PCR consiste em avaliar qualitativamente e quantitativamente as características das curvas de dissociação e curvas de amplificação estabelecidas no transcorrer do procedimento.

Com base da curva de dissociação, foi possível determinar, para cada elemento investigado, a temperatura onde ocorreram as fases de dissociação e anelamento do processo de amplificação das moléculas de cDNA. Há uma relação direta e específica entre a temperatura de dissociação e o tamanho do fragmento amplificado. Já durante a construção dos iniciadores, específicos para a amplificação de uma determinada molécula, é possível pré-estabelecer o tamanho do fragmento ao final do processo, assim como a provável temperatura de dissociação.

Os valores específicos de temperatura de dissociação encontrados para GAPDH, MHC-IIa e MHC-IIx foram de aproximadamente 84, 78 e 76° C respectivamente (Figuras 26 e 27). A proximidade nos valores para as isoformas de miosina deve-se ao fato de seus produtos de amplificação apresentarem um tamanho similar (95 e 97 pares de base respectivamente). A maior temperatura encontrada na amplificação do GAPDH encontra-se relacionada ao tamanho proporcionalmente elevado do seu produto de amplificação (197 pares de base). Esses valores correspondem aos estabelecidos durante a construção dos iniciadores, o que permite atribuir confiabilidade às análises e às interpretações dos resultados.

Outro fator contributivo para assegurar a confiabilidade das análises é a elevada homogeneidade no comportamento entre as curvas de dissociação das amostras nas 3 situações investigadas.

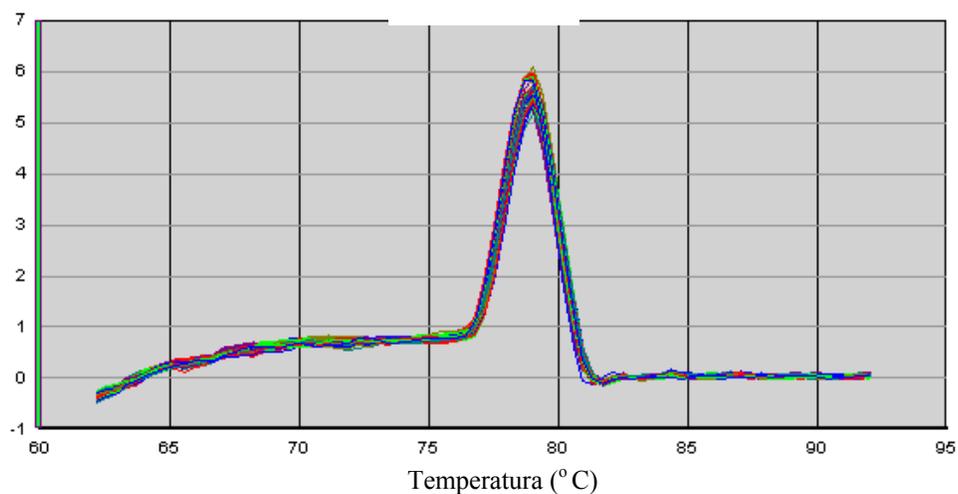


Figura 19: Curva de dissociação resultante da análise de RT-PCR, utilizando os iniciadores específicos para a amplificação do cDNA referente ao RNAm da MCH-IIa. O pico representa a temperatura de dissociação.

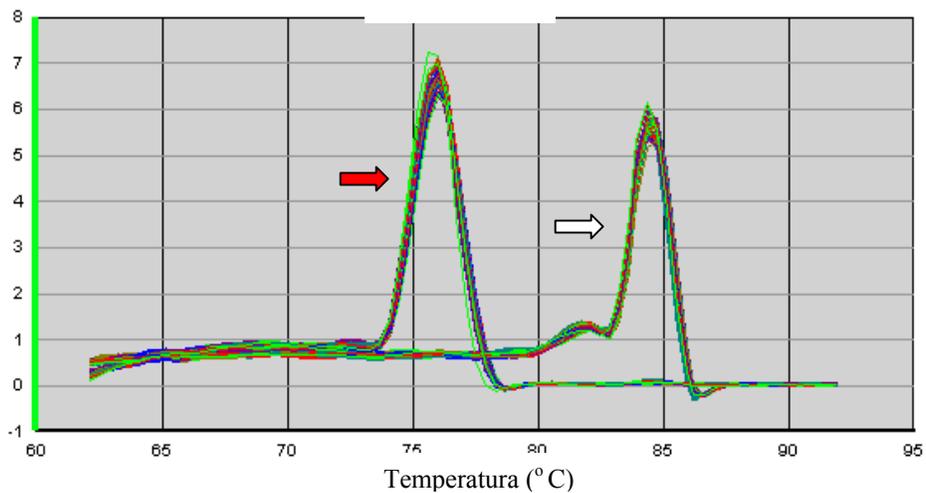


Figura 20: Curvas de dissociação resultantes da análise de RT-PCR, utilizando os iniciadores específicos para a amplificação dos cDNAs referentes aos RNAm da MCH-IIx (seta vermelha) e GAPDG (seta branca). Os picos representam as respectivas temperaturas de dissociação.

As curvas de amplificação obtidas com a realização da técnica de RT-PCR são resultantes da correlação entre o nível de fluorescência detectado para cada marcador (GAPDH, MHC-IIa e MHC-IIx) e o ciclo de amplificação. A análise qualitativa inicial das curvas de amplificação demonstrou que, nas 3 circunstâncias, houve um comportamento homogêneo entre todas as amostras analisadas (Figuras 28 e 29). Assim como nas análises qualitativas realizadas sobre as curvas de dissociação, a homogeneidade entre as curvas das amostras permite assegurar a confiabilidade dos dados. Essa conclusão deve-se à possibilidade de desconsiderar a ocorrência de falhas durante os procedimentos técnicos realizados.

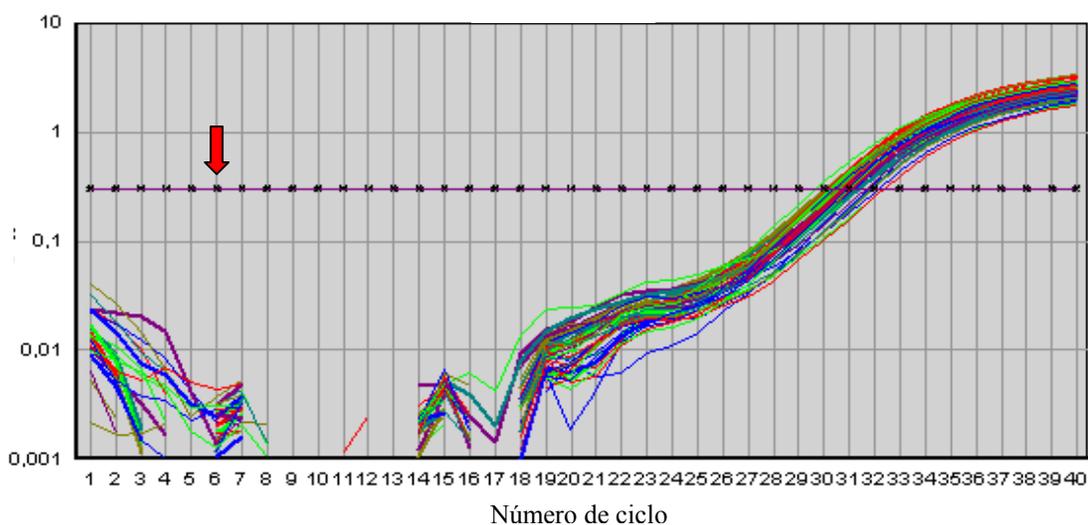


Figura 21: Curvas de amplificação da MHC-IIa das amostras dos grupos controle e irradiados. A linha horizontal pontilhada representa o limiar de fluorescência (seta vermelha).

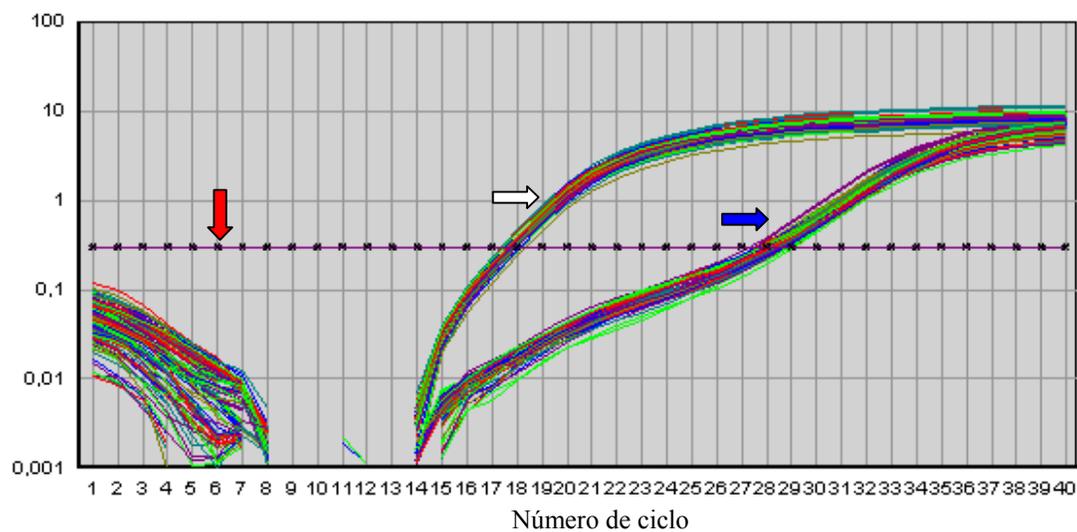


Figura 22: Curvas de amplificação do GAPDH (seta branca) e MHC-IIx (seta azul) das amostras dos grupos controle e irradiados. A linha horizontal pontilhada representa o limiar de fluorescência (seta vermelha).

A partir dessas curvas foi determinado um valor limiar de fluorescência (Figuras 28 e 29) e estabelecido, para cada amostra em cada produto amplificado (GAPDH, MHC-IIa e MHC-IIx), o ciclo em que ele foi alcançado (ciclo limiar-CT). Os valores individuais de CT de cada amostra foram estabelecidos pela média entre os valores adquiridos nas duplicatas. A seguir, os CTs das isoformas de MHC (CT-MHC-IIa e CT-MHC-IIx) foram normalizados em relação ao controle endógeno (CT-GAPDH). Esse procedimento foi efetuado, em cada amostra, pela subtração do valor de CT para cada isoforma de MHC do respectivo valor de CT referente ao GAPDH (Δ CT). Os valores obtidos são apresentados na Tabela 2.

Resultados

Tabela 2: Valores de CT para GAPDH, MHC-IIa e MHC-IIx das amostras pertencentes ao grupo controle e irradiado com os λ de 670, 685 e 830 nm adquiridas após a reação de RT-PCR. São apresentados ainda os valores de média (X) e desvio padrão (SD) para o CT do GAPDH em cada grupo e os valores individuais, M e SD em cada grupo relacionados à normalização (Δ CT) para cada isoforma de MHC.

Grupo	Amostra	CT GAPDH	CT MHC-IIa	CT MHC-IIx	Δ CT MHC-IIa / GAPDH	Δ CT MHC-IIx / GAPDH
Controle	1	17,6	30,4	28,9	12,8	11,3
	2	17,8	30,4	28,5	12,6	10,7
	3	17,5	30,2	28,5	12,6	11,3
	4	17,4	30,6	28,6	13,1	11,1
	5	17,5	30,4	28,6	12,9	11,2
X \pm SD		17,6 \pm 0,1			12,8 \pm 0,2	11,1 \pm 0,2
670 nm	1	17,4	31,1	28,4	13,6	11,0
	2	17,8	30,0	27,7	12,2	9,9
	3	17,4	30,5	28,5	13,1	11,1
	4	17,8	31,2	28,3	13,3	10,5
	5	17,7	30,7	28,3	13,0	10,6
X \pm SD		17,6 \pm 0,1			13,0 \pm 0,5	10,6 \pm 0,4
685 nm	1	17,6	31,9	28,2	14,2	10,6
	2	17,8	31,5	27,8	13,6	10,0
	3	18,0	32,2	28,2	14,2	10,2
	4	17,8	32,1	28,6	14,2	10,7
	5	18,0	31,7	28,3	13,7	10,3
X \pm SD		17,8 \pm 0,1			14,0 \pm 0,2	10,3 \pm 0,2
830 nm	1	17,3	31,0	27,5	13,6	10,1
	2	17,6	30,8	27,6	13,2	10,0
	3	17,6	31,0	27,6	13,4	10,1
	4	17,7	31,2	27,7	13,4	10,1
	5	18,1	31,1	28,0	13,0	9,9
X \pm SD		17,7 \pm 0,2			13,3 \pm 0,2	10,0 \pm 0,09

Os procedimentos estatísticos de análise comparativa entre os grupos experimentais foram direcionados, inicialmente, ao comportamento do controle endógeno. Os resultados encontrados demonstraram haver uma grande similaridade entre os valores individuais e médios de CT dos grupos, não havendo diferença estatisticamente significativa entre eles. Isso significa que o processo de amplificação do cDNA referente ao GAPDH pela técnica de RT-PCR teve início com quantidades muito próximas de substrato, quando comparadas as amostras, independentemente do grupo experimental. Com isso é possível considerar que a quantidade de RNAm para GAPDH expressa pelas CPMs (taxa de expressão), matéria prima extraída das culturas e submetida à conversão em cDNA por meio do RT, não foi influenciada pela radiação

laser de baixa intensidade. Tendo em vista os objetivos da realização de um controle endógeno, de proporcionar a normalização dos resultados referentes à amplificação dos elementos que se deseja investigar, ressalta-se a importância desse comportamento refratário às condições experimentais estabelecidas (influência da radiação) para a confiabilidade dos resultados. A representação gráfica dessa análise é apresentada na figura abaixo (Figura 30)

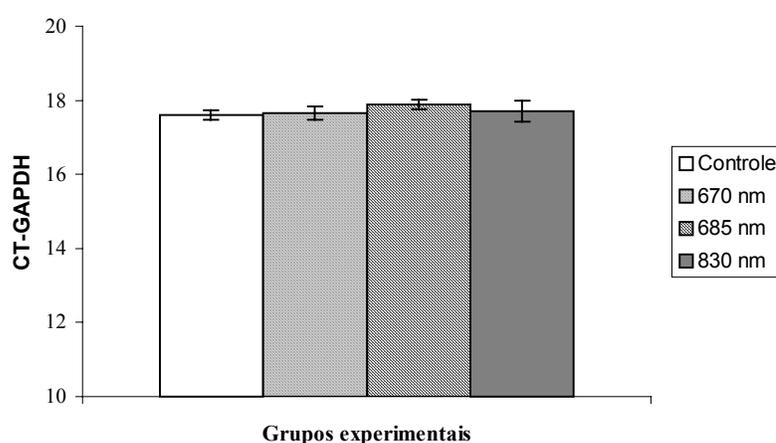


Figura 23: Valores de CT-GAPDH (M±SD) dos grupos controle e submetidos a radiação laser nos λ de 670, 685 e 830 nm.

Avaliando-se os valores de CT para as isoformas Iia e Iix de MHC (Tabela 2), é possível verificar que são maiores que os encontrados para o GAPDH. Isso indica que foram necessários mais ciclos de amplificação para que o limiar de fluorescência fosse alcançado (número de cópias amplificadas). Conclui-se, dessa forma, que a taxa de expressão das isoformas MHC nas CPMs foi proporcionalmente menor que a do GAPDH nas condições experimentais utilizadas.

A análise comparativa dos resultados referentes à expressão da MHC-Iia entre os grupos experimentais, após o procedimento de normalização (Δ CT MHC-Iia), representada graficamente é apresentada na Figura 31.

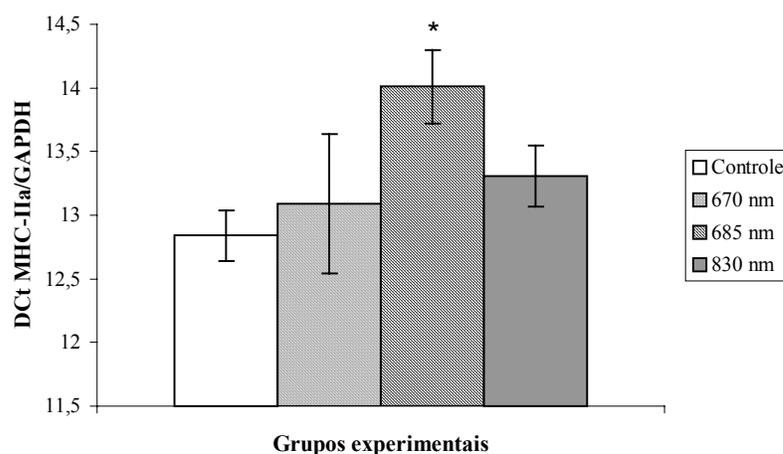


Figura 24: Valores de ΔCT MHC-IIa/GAPDH ($M \pm SD$) dos grupos controle e submetidos a radiação laser nos λ de 670, 685 e 830 nm. * $p = 0,0005$ em relação ao grupo controle.

Os resultados demonstram que os grupos irradiados apresentaram valores médios de ΔCT MHC-IIa superiores ao grupo controle. A maior diferença foi evidenciada com irradiação no λ de 685 nm, sendo a única a demonstrar significância estatística ($p = 0,0005$) em relação ao controle. Embora não demonstrada graficamente, a análise estatística demonstrou diferença também dessa radiação com as demais, sendo identificado um nível de significância (p) de 0,004 e 0,03 respectivamente para os λ de 670 e 830 nm.

Em concordância com os conceitos abordados sobre a relação entre os valores de CT e a taxa de expressão, pode-se considerar que a elevação nos valores de ΔCT MHC-IIa são sugestivos de uma diminuição, induzida pela radiação laser, na taxa de expressão desta isoforma de MHC nas CPMs, sendo a radiação no λ de 685 a mais efetiva em desencadear tal alteração.

Prosseguindo as análises, foi possível ainda estabelecer um parâmetro quantitativo desta influência inibitória exercida pela radiação laser sobre a expressão de MHC-IIa. Para isso foi calculada a diferença entre o valor de ΔCT MHC-IIa de cada grupo irradiado em relação ao referido valor do grupo controle. Os valores calculados para os λ de 670, 685 e 830 nm foram

respectivamente de 0,25, 1,17 e 0,5 CT. Desde que a variação de 1 CT representa uma diferença de 100% na taxa de expressão, pode-se considerar que as radiações foram responsáveis por diminuir em 25, 117 e 50 % a taxa de expressão da isoforma IIa da MHC. Vale ressaltar que esse procedimento de análise considerou, exclusivamente, os valores médios de Δ CT MHC-IIa e que a diferença estatística em relação ao controle se restringiu ao λ de 685 nm.

Os mesmos procedimentos de análise foram estabelecidos para a isoforma IIx da MHC. A representação gráfica dos valores de Δ CT nos grupos experimentais é apresentada na Figura 32.

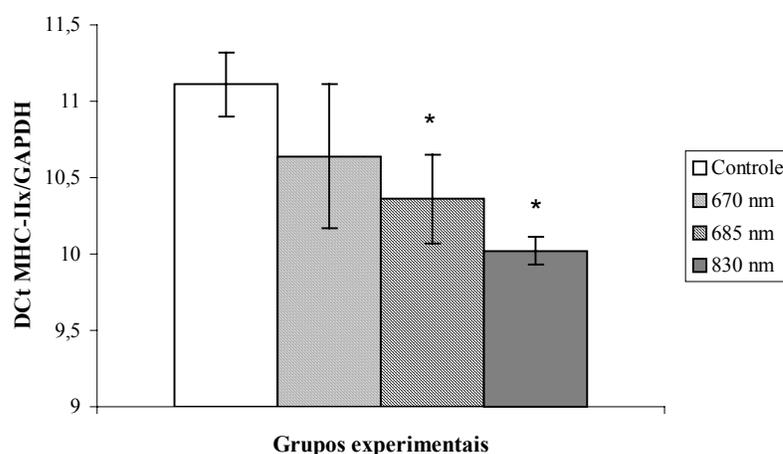


Figura 25: Valores de Δ CT MHC-IIx/GAPDH ($M \pm SD$) dos grupos controle e submetidos a radiação laser nos λ de 670, 685 e 830 nm. * $p \leq 0,006$ em relação ao grupo controle.

Verifica-se que, ao contrário da isoforma IIa da MHC, os valores médios nos grupos irradiados foram inferiores ao grupo controle. A magnitude dessa diferença demonstrou-se dependente da radiação, sendo progressivamente maior com o aumento do λ . A análise estatística demonstrou diferença significante em relação ao controle apenas para os λ de 685 ($p = 0,006$) e 830 nm ($p = 0,0003$). Já a comparação entre as radiações evidenciou diferença significante entre os λ de 830 e 670 nm ($p = 0,02$).

Esses resultados permitem atribuir à radiação laser a capacidade de elevar a taxa de expressão dessa isoforma de MHC nas CPMs. A análise quantitativa desse efeito demonstrou valores percentuais de elevação em relação ao controle de 50, 80 e 110 %, respectivamente para os λ de 670, 685 e 830 nm.

Analisando conjuntamente os resultados referentes aos efeitos da radiação laser sobre a taxa de expressão das isoformas IIa e IIx da MHC, é possível sugerir que ela foi capaz de influenciar o padrão de expressão gênica das CPMs, diminuindo a taxa de expressão da isoforma IIa e elevando a taxa da isoforma IIx. Embora todas as radiações tenham apresentado essa tendência, fica evidente o comportamento comprimento de onda-dependente desse potencial. No λ de 670 nm, embora tenham sido detectados valores médios sugestivos desta influência modulatória em relação ao controle, não foram identificadas diferenças estatísticas. Já os comprimentos de onda de 685 e 830 nm demonstraram efeitos mais pronunciados, sendo o primeiro responsável pela maior diminuição na expressão da isoforma IIa e o segundo o mais efetivo em aumentar a expressão da isoforma IIx.

Pelo fato da MHC representar uma proteína estrutural específica do tecido esquelético maduro, sua detecção indica a ocorrência do processo de diferenciação celular terminal. A relação da taxa de expressão de suas isoformas poderia, assim, contribuir para a investigação sobre os efeitos da radiação laser nesse contexto. Em virtude dos resultados encontrados, indicando um efeito oposto sobre a expressão das isoformas, não são possíveis inferências sobre a influência da radiação no processo de diferenciação celular das CPMs, sendo possível apenas destacar evidências sobre a capacidade dessa em modular o seu padrão de expressão gênica.

4.2 Análise *in vivo*

4.2.1 Análise histológica e histoquímica

Os dados referentes aos dois animais de cada grupo que foram utilizados para a realização da análise qualitativa da influência da radiação laser sobre o processo de regeneração muscular são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Massa corporal inicial e final, perda de massa corporal e massa do músculo TAD dos animais destinados à análise qualitativa histológica e histoquímica do padrão de regeneração muscular.

Grupo experimental	Animal	Massa corporal inicial (g)	Massa corporal final (g)	Perda de massa corporal (%)	Massa do músculo TAD (g)
Controle	1	447	407	8,9	0,630
	2	442	398	9,9	0,612
670 nm	1	467	394	15,6	0,584
	2	451	424	5,9	0,604
685 nm	1	447	344	23	0,530
	2	423	382	9,6	0,570
830 nm	1	405	370	8,6	0,594
	2	447	389	12,9	0,541

Os animais apresentaram massa corpórea inicial similares, exceto o animal 1 do grupo 830 nm que apresentou um valor discretamente inferior a média geral. Pode-se identificar nesses resultados que os animais, no dia estabelecido para a interrupção do experimento, apresentaram massa corporal inferior a inicial. Acredita-se que esse fato seja uma consequência do estresse causado pelo procedimento de indução de lesão muscular e pela manipulação diária (sedação), necessária à realização das irradiações. Essa perda na massa corporal mostrou-se generalizada e pouco homogênea, tal como pode ser observado na relação percentual de perda de massa corporal estabelecida para cada animal. Além disso, fica evidente que não houve correlação específica entre a perda na massa e os grupos experimentais. Finalizando os dados quantificáveis dessa análise são apresentadas as massas dos músculos TAD. Embora seja possível identificar

diferenças aparentes entre os valores comparando-se os grupos, o baixo número de animais não permite o estabelecimento de uma correlação confiável entre eles.

Por meio dos procedimentos histológicos e histoquímicos realizados, foi possível analisar de forma qualitativa o processo de regeneração muscular, ocorrido tanto sob condições normais como sob a influência das radiações laser, e correlacioná-lo ao modelo de indução de lesão utilizado.

As análises demonstraram que os aspectos morfológicos exibidos foram similares em todos os grupos experimentais. Isso permite concluir que, em relação ao protocolo de investigação proposto, as radiações laser aparentemente não influenciaram o padrão de regeneração do tecido muscular esquelético de ratos após lesão criogênica.

A região comprometida pela criolesão, que se apresentou restrita à região superficial do músculo TA, pode ser facilmente identificada tanto nos cortes corados com TB como nos submetidos à reação enzimática para SDH. Uma demarcação bem definida delimita a interface entre a área intacta e o sítio de lesão (Figuras 33 e 34). As fibras contidas na região intacta demonstram as características peculiares de um tecido muscular esquelético saudável, apresentando um formato poligonal, núcleos periféricos, organização fascicular e um padrão pouco homogêneo de distribuição das fibras em relação ao seu conteúdo mitocondrial. Na região do sítio de lesão próxima à interface, são identificadas fibras jovens, caracterizadas por núcleos centralizados, menor área de secção transversa, aspecto basofílico e um padrão homogêneo de reação à enzima SDH, sugestivo de similaridade entre as fibras no que refere à concentração de mitocôndrias. Já na região mais superficial da lesão, pode-se identificar uma elevada concentração de células mononucleadas (inflamatórias e/ou miogênicas), ausência de fibras musculares jovens e matriz extracelular abundante.

Os achados são condizentes com um processo de reparo tecidual inicial. A presença de fibras jovens próximo à interface delimitando a zona de lesão indicam a ocorrência dos processos de ativação, proliferação, diferenciação e fusão das CPMs. A ausência dessas fibras na região mais superficial do sítio de lesão sugerem um atraso do processo de reparo. Isto pode ser atribuído às características de progressão do processo de revascularização, que se inicia a partir da região intacta do músculo e se direciona de forma centrífuga à superfície.

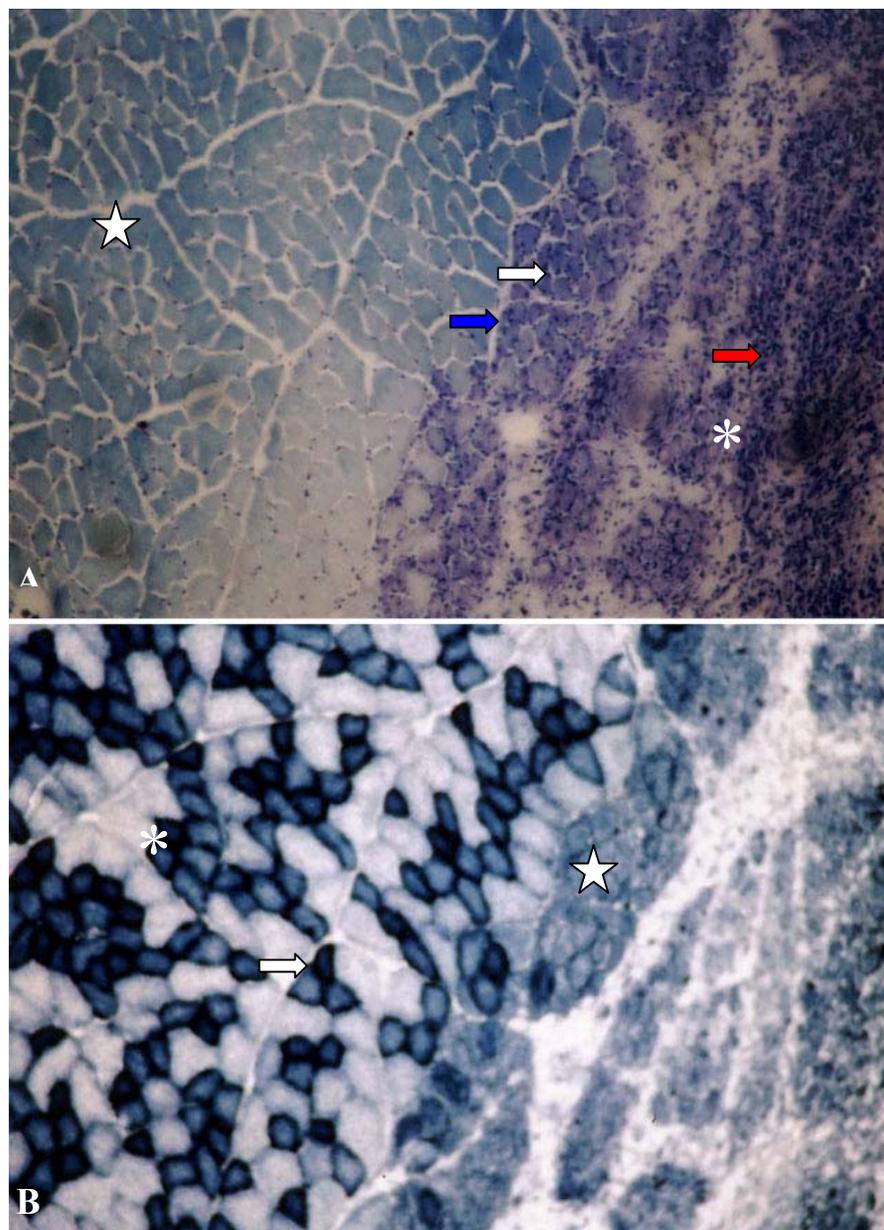


Figura 26: Secções transversais seriadas da região média do músculo TA do rato 6 dias após a indução da criolesão. **A)** Coloração com Azul de Toluidina evidenciando o sítio de lesão na região superficial do músculo (asterisco), a região constituída por fibras intactas (estrela) e a interface entre as duas regiões (seta azul). São identificadas, também, pequenas fibras em regeneração próximo à interface (seta branca) e o acúmulo de células mononucleadas na região mais superficial do músculo (seta vermelha). **B)** Reação enzimática para SDH demonstrando concentrações distintas de mitocôndrias nas fibras musculares intactas, distribuídas, em relação a esse aspecto, com um padrão pouco homogêneo pela região profunda do músculo (asterisco). As reações mais intensas nessa região denotam fibras com elevada quantidade de mitocôndrias em seu citosol (seta). Na região correspondente ao sítio de lesão, próximo à interface, evidencia-se o padrão da reação enzimática apresentado pelas fibras em regeneração, exibindo uma intensidade intermediária de reação um aspecto homogêneo em sua distribuição (estrela). 400X

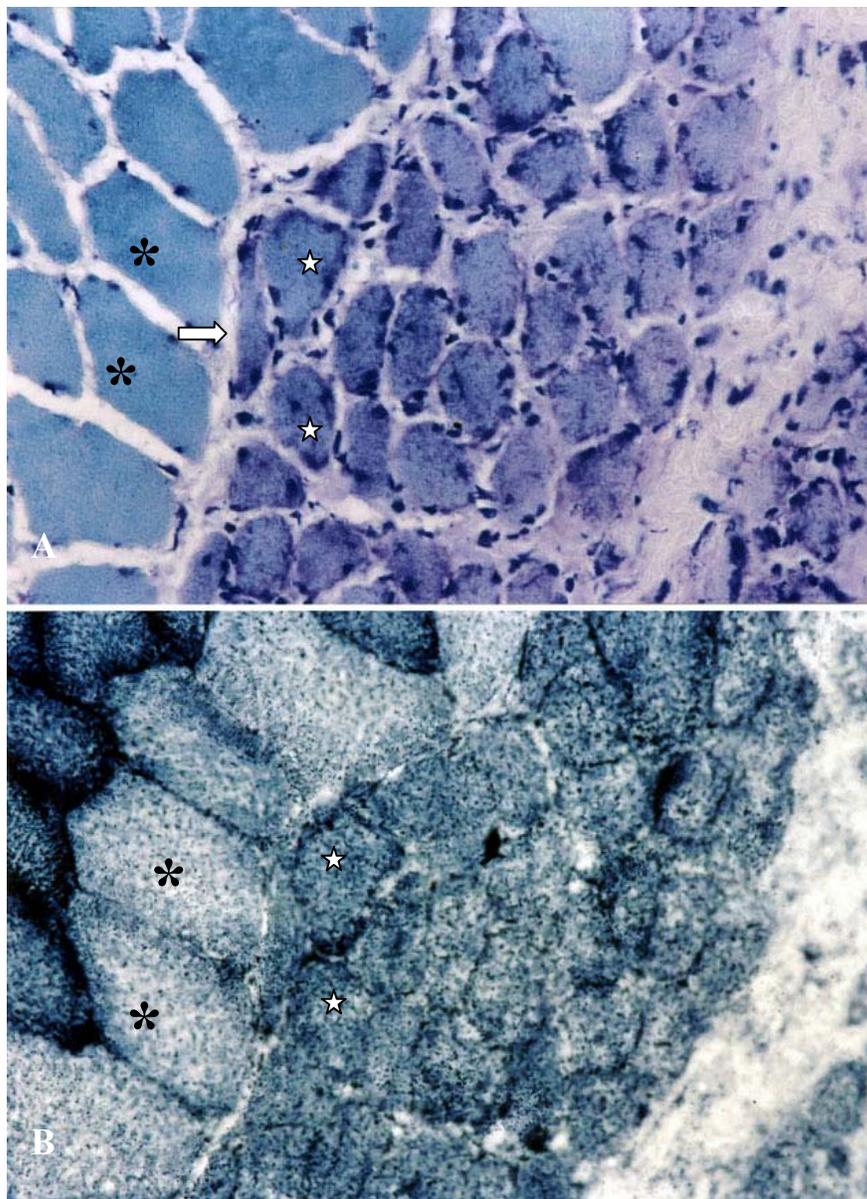


Figura 27: Secções transversais seriadas da região média do músculo TA do rato 6 dias após a indução da criolesão. **A)** Coloração com Azul de Toluidina evidenciando a interface entre o sítio de lesão e a região intacta do músculo (seta). As fibras intactas são caracterizadas por uma maior área de secção transversa, formato poligonal e núcleo periférico (asterisco). As fibras em regeneração apresentam aspecto basofílico, núcleo centralizado e menor área de secção transversa (estrela). **B)** Reação enzimática para SDH demonstrando a densidade mitocondrial das fibras intactas (asterisco) e a alteração do padrão de reação das fibras em regeneração (estrela). 850X

4.2.2 Dosagem da atividade das enzimas CS e LDH

Os dados referentes aos 5 animais de cada grupo experimental destinados às análises da atividade enzimática são apresentados na Tabela 4. Os resultados demonstram não haver diferença estatisticamente significativa entre os grupos em todos os parâmetros avaliados.

Tabela 4: Dados referentes ao valor individual das amostras, média (X) e desvio padrão (SD) da massa corporal inicial e final, perda percentual de massa corporal e massas dos músculos TAD e TAE dos animais destinados à análise da atividade das enzimas CS e LDH.

Grupo experimental	Animal	Massa corporal inicial (g)	Massa corporal final (g)	Perda de massa corporal (%)	Massa do músculo TAD (g)	Massa do músculo TAE (g)
Controle	1	410	365	10,9	0,114	0,093
	2	452	405	10,3	0,111	0,118
	3	446	410	8,0	0,103	0,093
	4	469	445	5,1	0,112	0,125
	5	462	447	3,2	0,105	0,116
X ± SD		447,8 ± 22,9	414,4 ± 33,7	7,5 ± 3,3	0,109 ± 0,004	0,109 ± 0,014
670 nm	1	428	395	7,7	0,122	0,132
	2	368	350	4,8	0,091	0,113
	3	424	375	11,5	0,098	0,100
	4	437	400	8,4	0,113	0,115
	5	434	423	2,5	0,120	0,116
X ± SD		418,2 ± 28,5	388,6 ± 27,5	6,9 ± 3,4	0,108 ± 0,013	0,115 ± 0,011
685 nm	1	422	398	5,6	0,107	0,103
	2	447	419	6,2	0,119	0,118
	3	466	436	6,4	0,112	0,119
	4	423	405	4,2	0,113	0,114
	5	370	335	9,4	0,064	0,114
X ± SD		425,6 ± 36,0	398,6 ± 38,4	6,3 ± 1,9	0,103 ± 0,022	0,113 ± 0,006
830 nm	1	370	343	7,2	0,069	0,119
	2	447	421	5,8	0,093	0,109
	3	463	414	10,5	0,115	0,114
	4	451	413	8,4	0,096	0,115
	5	508	451	11,2	0,103	0,117
X ± SD		447,8 ± 49,7	408,4 ± 39,6	8,6 ± 2,2	0,095 ± 0,016	0,114 ± ,003

Assim como ficou evidenciado nos animais destinados à análise histológica e histoquímica do processo de regeneração, pôde-se identificar a perda da massa corporal, expressa em valores percentuais, no transcorrer dos 6 dias compreendendo o procedimento experimental. É possível, ainda, constatar a grande variabilidade nessa perda de massa entre as amostras de

cada grupo, responsável pelos consideravelmente elevados indicadores do desvio padrão da média.

A primeira fase da análise da atividade das enzimas CS e LDH objetivou comparar os valores absolutos de atividade enzimática do *pool*, estabelecidos pela média das leituras (triplicata) e expressos em UI/g de tecido muscular, entre os grupos experimentais (Tabela 5).

Tabela 5: Dados referentes ao valor individual das leituras (triplicata), média (X) e desvio padrão (SD) da atividade das enzimas CS e LDH, nas concentrações de 1 e 10 mM de substrato, do *pool* das amostras dos músculos intactos (controle), placebo e irradiados com os λ de 670, 685 e 830 nm.

Grupo	Leitura	CS	LDH 1 mM	LDH 10 mM
Controle-controle	1	694,54	668,43	605,30
	2	696,96	670,67	613,68
	3	675,75	692,17	575,13
X \pm SD		689,0 \pm 11,6	677,0 \pm 13,1	598,0 \pm 20,3
Placebo	1	644,26	618,13	532,86
	2	624,59	646,45	624,64
	3	618,03	586,68	548,15
X \pm SD		628,9 \pm 13,6	617,1 \pm 29,9	568,6 \pm 49,2
670 nm	1	675,0	688,40	606,95
	2	661,04	668,69	617,68
	3	670,93	650,14	606,95
X \pm SD		668,9 \pm 7,1	669,1 \pm 19,1	610,5 \pm 61,9
685 nm	1	751,97	801,69	691,18
	2	742,10	799,32	726,77
	3	721,05	775,93	663,72
X \pm SD		738,3 \pm 15,7	792,3 \pm 14,2	693,9 \pm 31,6
830 nm	1	825,87	698,34	702,97
	2	800,69	642,55	647,85
	3	776,22	741,25	674,58
X \pm SD		800,9 \pm 24,8	694,1 \pm 49,5	675,1 \pm 27,6

Para enzima CS, cuja representação gráfica dos resultados é apresentada na Figura 35, foi possível determinar inicialmente que houve uma diferença significativa entre a atividade enzimática nos grupos controle e placebo ($p = 0,006$). Isso indica que no momento onde o processo de reparo foi interrompido, 6º dia após a indução de lesão, os músculos do grupo placebo apresentavam uma atividade enzimática inferior à encontrada nessa região do músculo TA em condições normais.

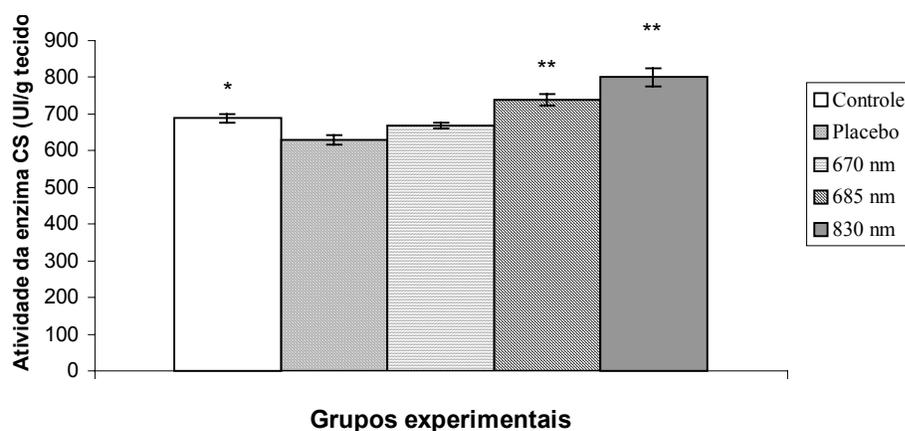


Figura 28: Valores referentes à média e desvio padrão da atividade da enzima CS mensurada nos grupos controle, placebo e irradiados com os λ de 670, 685 e 830 nm. * $p = 0,006$ e ** $p \leq 0,0002$ em relação ao grupo placebo.

Os grupos submetidos à radiação laser apresentaram valores médios de atividade da CS superiores ao encontrado no grupo placebo, sendo a diferença significativa apenas nos λ de 685 e 830 nm ($p = 0,0002$ e $0,0001$ respectivamente). Diferença estatisticamente significativa, não indicada graficamente, foi também encontrada comparando o grupo controle com os grupos 685 nm ($p = 0,02$) e 830 nm ($p = 0,0001$). A análise comparativa realizada entre os grupos irradiados demonstrou haver diferença significativa entre 685 e 670 nm ($p = 0,002$), 830 e 670 nm ($p = 0,0001$) e 830 e 685 nm ($p = 0,004$), sendo a radiação de 830 nm a responsável pelos maiores valores de atividade da enzima CS. O nível de atividade enzimática nesses músculos pode ser relacionado diretamente com a concentração tecidual da enzima. Com base nesses resultados, pode-se concluir que a criolesão acarretou uma queda na concentração da enzima CS, fruto do comprometimento tecidual, e que a radiação laser nos λ 685 e 830 nm exerceu um efeito bioestimulante sobre o tecido em reparo, elevando a concentração enzimática. As diferenças exibidas entre o grupo controle e os irradiados nos referidos λ demonstram que, sob influência da

radiação, os níveis enzimáticos alcançados no foco de lesão foram superiores até mesmo aos níveis encontrados no tecido intacto. Com respeito à efetividade biológica específica das radiações, o λ de 830 nm demonstrou-se superior ao λ de 685, que, por sua vez, superou a radiação no λ de 670 nm.

Para a enzima LDH, na presença de substrato à concentração de 1mM, os resultados demonstraram não haver diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e placebo, mesmo o valor médio de atividade da enzima no grupo controle tendo de se apresentado superior ao placebo (Figura 36).

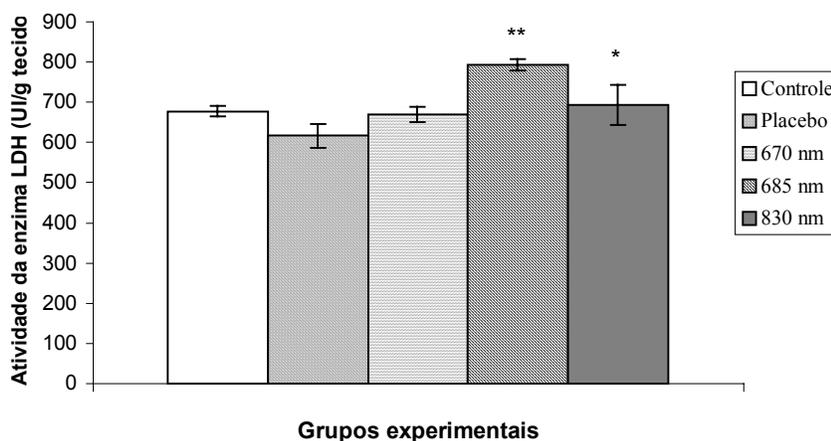


Figura 29: Valores referentes à média e desvio padrão da atividade da enzima LDH, na presença de substrato à concentração de 1mM, mensurada nos grupos controle-controle, placebo e irradiados com os λ de 670, 685 e 830 nm. * $p = 0,04$ e ** $p = 0,0002$ em relação ao grupo placebo.

De forma semelhante ao encontrado nos resultados sobre a atividade da CS, todos os grupos irradiados apresentaram valor médio de atividade da LDH superior ao grupo placebo, sendo a diferença estatisticamente significativa demonstrada apenas para as radiações nos λ de 685 ($p = 0,0002$) e 830 nm ($p = 0,04$). Comparando-se os grupos irradiados, foi possível demonstrar que houve diferença significativa, não indicada graficamente, nas atividades

enzimáticas entre as radiações com 685 e 670 nm ($p = 0,002$) e 685 e 830 nm ($p = 0,01$). Analisados conjuntamente os dados referentes a LDH, é possível concluir que as radiações também exerceram um efeito bioestimulante sobre a concentração enzimática, sendo o λ de 685 nm responsável pelo efeito mais potente. Os níveis alcançados nesse grupo superaram, também, de forma significativa os encontrados no grupo controle, que indicam a atividade dessa enzima em condições de integridade tecidual ($p = 0,004$).

Os resultados encontrados referentes à análise comparativa da atividade da LDH em 10 mM de substrato entre os grupos experimentais são apresentados graficamente na Figura 37. Nele torna-se possível demonstrar que, embora tenham ocorrido mudanças nos valores absolutos de média e desvio padrão, houve um comportamento quase idêntico em relação à atividade dessa enzima sob a menor concentração de substrato (1 mM). A única diferença evidente foi a elevação da efetividade biológica da radiação no λ de 830 nm, que apresentou níveis de elevação da atividade enzimática proporcionalmente maiores. Em consequência dessa alteração, a diferença estatisticamente significativa em relação à radiação no λ de 685 nm desapareceu ($p = 0,9$). O nível de significância (p) representativo da diferença na atividade dessa enzima entre os grupos submetidos às radiações nos λ 685 e 830 nm e o placebo foi respectivamente 0,003 e 0,01. A diferença estatística em relação ao grupo controle em relação ao controle permaneceu restrita à radiação em 685 nm ($p = 0,02$).

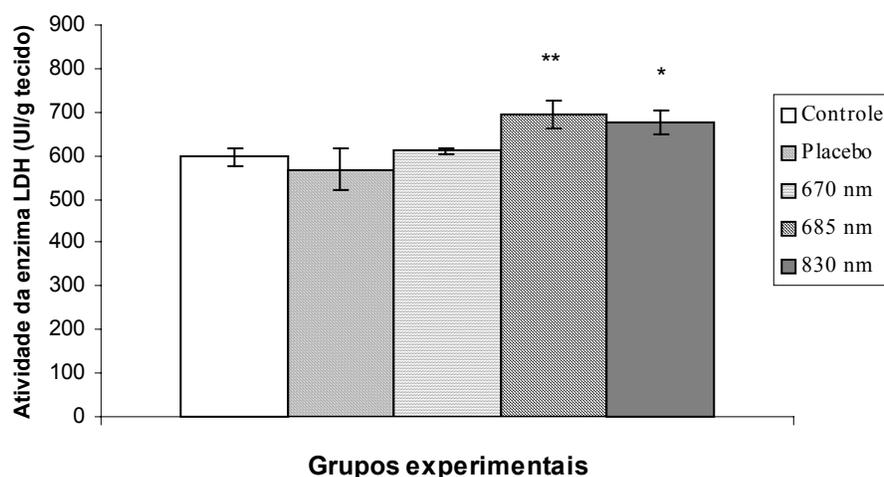


Figura 30: Valores referentes à média e desvio padrão da atividade da enzima LDH, na presença de substrato à concentração de 10mM, mensurada nos grupos controle-controle, placebo e irradiados com os λ de 670, 685 e 830 nm. * $p = 0,01$ e ** $p = 0,003$ em relação ao grupo placebo.

Além da apresentação dos resultados sob a forma comparativa do valor absoluto da atividade das enzimas CS e LDH entre os grupos experimentais, foram estabelecidas as relações entre os valores médios de atividade da enzima LDH nas concentrações de 1 e 10 mM de substrato (LDH-1/LDH-10) e entre atividade da LDH em 1mM e CS (LDH-1/CS). Os resultados encontrados são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6: Relação entre o valor médio da atividade da enzima LDH nas concentrações de 1 e 10 mM (LDH-1/LDH-10) e LDH na concentração de 1 mM e CS (LDH-1/CS) do *pool* das amostras dos músculos intactos (controle-controle), placebo e irradiados com os λ de 670, 685 e 830 nm.

Grupo	LDH-1/LDH-10	LDH-1/CS
Controle-controle	1,1	0,9
Placebo	1,1	0,9
670 nm	1,1	1
685 nm	1,1	1,1
830 nm	1,0	0,9

A relação entre as atividades da enzima LDH nas concentrações de substrato de 1 e 10 mM possibilita a caracterização da subunidade predominante nas isoformas desta enzima em atividade no tecido analisado. Valores dessa relação superiores a 1 são indicativos do predomínio da subunidade B, cuja atividade se encontra relacionada ao metabolismo com abundância de oxigênio (oxidativo). Relação com valores inferiores a 1 indica o predomínio da subunidade A, com atividade direcionada ao metabolismo na menor disponibilidade de oxigênio (glicolítico). Os resultados apresentados demonstram valor de 1,1 para os grupos controle, placebo e irradiados com 670 e 685 nm. O grupo irradiado com 830 nm apresentou um valor discretamente inferior (1,0), o que permite desconsiderar a existência de uma diferença significativa perante os demais. O valor absoluto obtido nessa relação, para todos os grupos experimentais, praticamente coincide com o valor limítrofe de referência para a determinação do predomínio das subunidades (valor igual a 1). Com isso é possível sugerir que, na região superficial do TA dessa espécie de ratos, as subunidades constituintes da enzima LDH apresentam-se em quantidades similares, mesmo com a ocorrência de uma lesão tecidual e a evolução do processo de reparo, que se desenvolveu sob influência ou não da radiação laser nos λ de 670, 685 e 830 nm.

O valor resultante da relação entre a atividade da enzima LDH, na concentração de 1mM de substrato, e CS possibilita a inferência sobre o perfil metabólico tecidual. Valores superiores a 1 determinam o predomínio de um metabolismo anaeróbio. Já valores inferiores a 1 caracterizam o predomínio de um metabolismo aeróbio. Os grupos controle, placebo e irradiado com 830 nm apresentaram uma relação igual a 0,9. Os grupos irradiados com 670 e 685 nm apresentaram os respectivos valores de 1 e 1,1. A análise comparativa qualitativa demonstra a existência de diferenças sutis entre os grupos experimentais, também desaconselhando a elaboração de sugestões sobre a influência da radiação sobre o perfil metabólico tecidual.

Interpretando conjuntamente os resultados, conclui-se que a radiação LASER exerceu um efeito bioestimulante, com um comportamento comprimento de onda-dependente, sobre a concentração das enzimas CS e LDH durante o processo de reparo do tecido muscular esquelético em ratos, após criolesão. Essa elevação é sugestiva de uma maior atividade metabólica e/ou um maior número das células que participam do processo de reparo tecidual, entre elas as CPMs. As radiações que se demonstraram efetivas em desencadear esse fenômeno bioestimulante, com base no índice de significância dos testes estatísticos, são as no λ de 685 e 830 nm. Embora essas radiações tenham sido responsáveis por níveis superiores de atividade enzimática, não foram detectados indícios de qualquer influência das radiações sobre as características constitutivas da enzima LDH (predomínio de suas subunidades) ou perfil metabólico tecidual.

5 Discussão

Um dos objetivos terapêuticos almejados em um programa de reabilitação direcionado às lesões musculares é estimular o processo de regeneração tecidual, elevando as perspectivas em relação ao completo restabelecimento estrutural e funcional do tecido muscular e do indivíduo como um todo. Para atingir essa finalidade é freqüentemente proposta a utilização de recursos terapêuticos denominados bioestimulantes, caracterizados pela capacidade de interagir com as células responsáveis pelo processo reparo tecidual e estimular sua funcionalidade. Acredita-se que em resposta a essa influência modulatória o processo de reparo ocorra em menor tempo e/ou apresente um padrão qualitativamente superior.

Um dos recursos bioestimulantes mais utilizados na prática clínica nessas circunstâncias é a TLBI. Em contrapartida, são escassas as evidências científicas e clínicas que demonstram a efetividade terapêutica da técnica, seus mecanismos de ação, e que até mesmo determinem os parâmetros dosimétricos e metodológicos necessários à aquisição de seus objetivos. Esse panorama confere um grau de empirismo à utilização da TLBI no tratamento das lesões musculares.

A maioria das evidências demonstrando a responsividade do tecido muscular esquelético à ação bioestimulante da TLBI refere-se à radiação no λ 632,8 nm, que se mostrou capaz de acelerar o processo de regeneração muscular em sapos após criolesão (BIBIKOVA & ORON, 1993) e desnervação (BIBIKOVA & ORON, 1995). Trabalhos realizados em músculos esqueléticos de mamíferos também evidenciaram os efeitos bioestimulantes dessa radiação, acelerando o processo de regeneração muscular em porcos da índia (BULYAKOVA, 1994; BULYAKOVA & AZAROVA, 1994) e ratos (WEISS & ORON, 1992; AMARAL,

PARIZOTTO, SALVINI; 2001). No geral, os resultados demonstraram uma aceleração da maturação tecidual (surgimento precoce de miotubos e fibras musculares jovens com maior área de secção transversa) durante o processo de reparo nos músculos irradiados. Para os autores, esses achados são conseqüentes da ação da radiação sobre a proliferação e/ou a diferenciação das CPMs, recrutadas durante a fase inicial da regeneração.

Analisando a influência da TLBI diretamente sobre as CPMs, através de estudos *in vitro*, Ben-Dov e colaboradores (1999) demonstraram que a radiação LASER no λ de 632,8 nm foi capaz de elevar a taxa proliferação e diminuir a taxa de diferenciação celular. Eles atribuíram a esses fatores a possível efetividade dessa radiação sobre o processo de regeneração muscular, tendo em vista que seriam responsáveis pela determinação de um contingente maior de células miogênicas que, posteriormente, sofreriam a diferenciação terminal e fusão celular. A influência dessa radiação sobre a função celular apresentou um comportamento dose-dependente, sendo a dose de 0,54 J/cm² a de maior efetividade biológica.

Embora ainda seja utilizada freqüentemente com fins científicos, a radiação no λ de 632,8 nm encontra-se pouco representativa dentro arsenal das radiações LASER utilizadas atualmente na terapêutica clínica. Isto se deve ao custo proporcionalmente elevado do equipamento e as baixas potências de emissão, que impossibilitam seu uso no tratamento das lesões de tecidos mais profundos tendo em vista a limitada capacidade de penetração diante da técnica transdérmica de aplicação.

Com base neste contexto, foi desenvolvida a presente pesquisa, que teve por finalidade investigar a influência exercida por radiações LASER distintas sobre o tecido muscular estriado esquelético, em específico as CPMs. Estas células são diretamente responsáveis pelo processo de regeneração desse tecido, sendo a caracterização da sua responsividade a cada tipo de radiação

necessária para a compreensão dos possíveis efeitos terapêuticos da técnica sobre o reparo muscular.

Para a realização dos experimentos, foram selecionadas as radiações com os λ de 670, 685 e 830 nm, disponíveis comercialmente e freqüentemente utilizadas na prática clínica. Dentre as vantagens do uso clínico dessas radiações esta a maior potência de emissão de seus emissores. Além disso, elas encontram-se incluídas no espectro de ação da TLBI, que caracteriza radiações cujo λ é reconhecidamente capaz de interagir com biomoléculas fotoreceptoras intracelulares (cromóforos fotoceptores) e de desencadear uma resposta fotobiológica (KARU, 1998b). Embora existam evidências científicas demonstrando a potencialidade biomodulatória dessas radiações (KAWASAKI & SHIMIZU, 2000; ALMEIDA-LOPES et al, 2001; PINHEIRO et al, 2002), não foram identificados relatos a respeito da influência dessas diretamente sobre as CPMs ou o processo de reparo muscular.

Em relação à capacidade proliferativa das CPMs, os resultados encontrados demonstraram que as radiações LASER exerceram um efeito biomodulatório com características λ e dose-dependente.

O comportamento da curva dose-resposta evidenciado nesses resultados se assemelha aos descritos na literatura em relação à característica dose-dependente da foto-resposta induzida pela TLBI. Esse comportamento, também conhecido como “lei de Arndt-Schulz”, é caracterizado inicialmente por desencadear, em conseqüência do aumento progressivo da dose administrada, um aumento progressivo da resposta fotobiológica (bioestimulação). A continuidade da elevação na dose proporciona uma estagnação da resposta (pico), seguida pela diminuição de sua magnitude até a ausência de resposta biológica ou início de um processo de bioinibição (Figura 38 - KARU, 1998a).

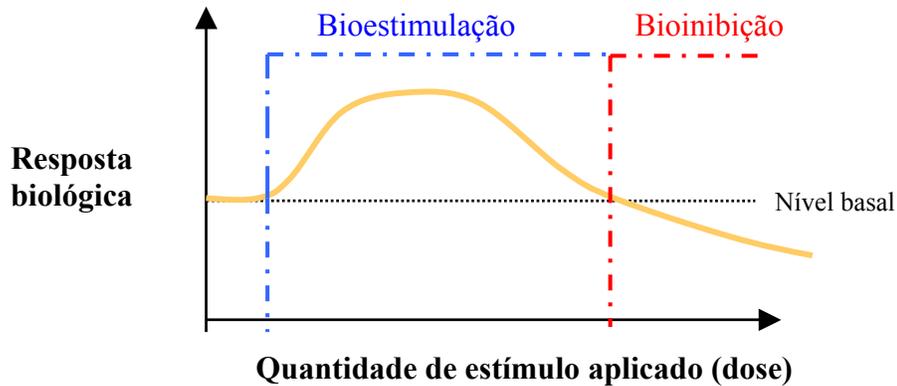


Figura 1: Esquema representativo da “lei de Arndt-Schulz” caracterizando o comportamento dose-dependente da foto-resposta induzida pela TLBI.

Embora apresentando o mesmo comportamento, foi evidenciado que cada λ apresentou características biomodulatórias específicas (comportamento λ -dependente da TLBI). Também foi possível estabelecer que ele foi influenciado pelo ambiente nutricional.

No geral, um ambiente nutricional mais favorável, apresentando uma maior disponibilidade de SFB (10%), foi responsável por diminuir a responsividade das CPMs às radiações, resultando em taxas de proliferação celular substancialmente menores. Além disso, para todas as radiações foram detectados valores médios de taxa de proliferação celular inferiores ao controle não irradiado, quando utilizada a dose de $1,5 \text{ J/cm}^2$. Isso é sugestivo de que, dependendo das características do ambiente celular a que as CPMs estão submetidas, a utilização de doses locais iguais ou superiores a essa, independentemente do λ investigado, poderia estar desencadeando um efeito bioinibitório sobre a capacidade proliferativa destas células. Vale a pena ressaltar que a ocorrência desse efeito inibitório poderia prejudicar e/ou retardar o processo de reparo do tecido muscular.

Em ambiente nutricional menos favorável (5% de SFB), as radiações alcançaram sua maior efetividade biológica, alcançando níveis de elevação da taxa de proliferação respectivamente de 56,8, 70,6 e 84,4 % para as radiações no λ de 670, 685 e 830 nm. As doses

responsáveis pelos aumentos foram respectivamente de 1,2, 0,6 e 0,3 J/cm². Nessa condição nutricional não foram identificados indícios de queda na taxa de proliferação em relação ao controle não irradiado. Respeitando a teoria de Arndt-Schulz, aplicada a TLBI, acreditamos que para a sua ocorrência seriam necessários níveis maiores de densidade energética.

Tais resultados foram obtidos com a técnica colorimétrica indireta de quantificação celular *in vitro* utilizando os princípios do MTT-Formazana. A técnica, descrita por Mosmman e aprimorada por Denizot & Lang, apresenta validade e sensibilidade comparável à técnica de incorporação de timidina radioativa (H³-timidina), que representa a referência na análise de quantificação celular (DENIZOT & LANG, 1986). Dentre as vantagens de utilização da técnica colorimétrica estão o baixo custo, rapidez na obtenção dos resultados e a ausência de manipulação de materiais radioativos. A confiabilidade dos resultados obtidos pode ser considerada elevada, levando-se em consideração o coeficiente de determinação obtido na curva padrão DO/cél (99,7 %), adequação do modelo estatístico e a consistência dos resultados obtidos nas leituras espectrofotométricas das amostras em cada situação experimental (desvio padrão reduzido).

Nos experimentos realizados por Ben-Dov e colaboradores (1999), demonstrando o efeito da radiação no λ de 632,8 nm sobre a proliferação das CPMs, o potencial bioestimulante foi considerado, tendo em vista o aumento na incorporação de H³-timidina e na expressão do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA). Além disso, foi demonstrado que a radiação induziu um aumento na expressão das ciclinas D1, E e A, que são proteínas responsáveis pela regulação do ciclo celular. A taxa de expressão das ciclinas em culturas irradiadas, mantidas sob ausência de soro, foi similar à encontrada quando células não irradiadas foram submetidas à 10%

de SFB. Isso indica a capacidade da radiação LASER em induzir a determinação (ativação) e proliferação das CPMs.

Estudos prévios em culturas celulares têm demonstrado a habilidade da TLBI em estimular também a proliferação de fibroblastos (FRIEDMANN et al., 1991; WEBB et al., 1998; ALMEIDA-LOPES et al., 2001; PEREIRA et al., 2002), queratinócitos (GROSSMAN et al., 1998), osteoblastos (YAMAMOTO et al., 2001), linfócitos (AGAIBY, GHALI, DYSON, 1998; STADLER et al., 2000), células de Schwan (VAN BREUGEL & BAR, 1993), células endoteliais (GHALI & DYSON, 1992; AGAIBY et al., 2000), células tumorais (PINHEIRO, et al., 2002) entre outras. Na maioria desses trabalhos, a resposta bioestimulante foi atribuída à capacidade da radiação em estimular, com comportamento λ e dose-dependente, a produção de FC ou citocinas, que passariam a estimular de maneira autócrina ou parácrina a capacidade proliferativa das células.

Evidências de que as radiações nos λ de 660, 820 e 870 nm são capazes de induzir a liberação de FC ou citocinas em macrófagos foram apresentados por Young e colaboradores (1989). Neste experimento, o meio de cultura condicionado, removido da cultura de macrófagos em vários momentos após irradiação, foi adicionado em cultura de fibroblastos, promovendo um aumento na taxa de proliferação significativamente superior ao grupo controle, submetido a meio condicionado desprovido da influência das radiações. Utilizando a mesma metodologia Agaiby e colaboradores (2000) demonstraram a capacidade da radiação LASER no λ 820 nm em estimular a produção de agentes mitógenos por linfócitos-T. A resposta foi evidenciada tendo em vista a elevação da taxa de proliferação de células endoteliais.

Estudos demonstrando diretamente a capacidade da TLBI de induzir a produção e liberação de FC e citocinas pelas células fortalecem a hipótese proposta. Yu e colaboradores

(1994a, 1994b) demonstraram a capacidade da radiação LASER no λ de 660 nm em estimular a produção de fator de crescimento de fibroblastos básico (FGF-b), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e TGF- β em fibroblastos. Resultados similares foram obtidos com a radiação no λ de 632,8 nm sobre cultura de queratinócitos, sendo demonstrado o aumento na produção de interleucina-1 α e interleucina-8 (YU et al., 1996).

Sabe-se que as CPMs são capazes de produzir fatores de crescimento que, atuando de forma autócrina, são capazes de regular as funções de proliferação e diferenciação celular (HAWKE & GARRY, 2001). Entre esses pode-se citar os IGF-I e IGF-II (ALLEN & BOXHORN, 1989; ADAMS, HADDAD, BALDWIN, 1999), fator de crescimento de hepatócitos (HGF – ANASTASI et al., 1997; TATSUMI et al., 1998; SHEEHAN et al., 2000), fator de crescimento de fibroblastos II e VI (FGF-II e FGF-VI – CLARKE, KHAKEE, McNEIL, 1993; FLOSS, ARNOLD, BRAUN, 1997), TGF- β (SAKUMA et al., 2000) e fator de inibição de leucemia (LIF – BARNARD, et al., 1994; KUREK et al., 1997). Com exceção do TGF- β , todos os demais FC são reconhecidamente capazes de induzir o processo de proliferação celular.

Com base nesse contexto, é possível sugerir que um dos mecanismos responsáveis pelo efeito bioestimulante das radiações investigadas sobre o processo de proliferação das CPMs pode ser a influência modulatória sobre o padrão de expressão de um ou mais desses FC. Em virtude das características das células utilizadas nesse experimento, encontrando-se na segunda passagem de crescimento *in vitro* após extração, não se pode desconsiderar, mesmo tendo sido realizado o procedimento de pré-plaqueamento, a possível influência das radiações sobre a produção de FC em células não miogênicas contidas na cultura, tais como fibroblastos e macrófagos, caracterizando uma ação parácrina sobre as das CPMs. Trabalhos futuros investigando a influência das radiações LASER sobre o padrão de expressão dos FC em CPMs poderão

contribuir para a elucidação dos mecanismos de ação relacionados aos efeitos biomodulatórios apresentados.

Além do mecanismo indireto de estímulo à proliferação celular via liberação de FC, faz-se necessário ressaltar a provável participação da influência direta das radiações LASER sobre o processo de proliferação celular. Existem relatos sobre a capacidade das radiações, uma vez absorvidas pelas células, iniciarem determinados eventos bioquímicos intracelulares que culminam na entrada da célula no ciclo de divisão celular. Um dos pontos chave deste processo é a alteração na permeabilidade transmembrana, responsável pela regulação da concentração iônica no citosol (KARU, 1998b; GRECO et al., 2001).

Os resultados referentes à análise *in vitro* da expressão das isoformas da MHC demonstraram que as radiações, com um comportamento λ -dependente, foram capazes de modular o padrão de expressão gênica das CPMs. As radiações proporcionaram a diminuição de expressão da isoforma IIa e elevação da isoforma IIx, sendo os λ 685 e 830 nm responsáveis pelos valores percentuais mais significativos.

Inicialmente, essa análise foi destinada à avaliação da influência das radiações sobre o processo de diferenciação celular, sendo a taxa de expressão dessa proteína músculo-específica (MHC) utilizada como indicador do processo de diferenciação celular terminal. Através de um protocolo similar, utilizando apenas a isoforma tipo I de MHC, Ben-Dov e colaboradores (1999) atribuíram a radiação no λ de 632,8 nm a capacidade de inibir a taxa de diferenciação celular, tendo em vista a identificação de diminuição da sua expressão após o processo de irradiação. Frente aos resultados obtidos, demonstrando uma influência oposta sobre as isoformas avaliadas, não foi possível realizar qualquer inferência sobre a capacidade das radiações nos λ de 670, 685 e 830 nm interferirem no processo de diferenciação celular. Assim sendo, torna-se questionável a

validade da utilização de uma isoforma isolada da MHC, ou combinações aleatórias restritas entre as isoformas existentes, para a investigação da influência sobre o processo de diferenciação das CPMs. Acreditamos que uma análise conjunta de todas as isoformas permita a aquisição de um panorama condizente com o comportamento verídico do processo de diferenciação celular.

Entre as hipóteses que podem explicar o mecanismo pelo qual as radiações LASER influenciaram o padrão de expressão gênica das CPMs está a variação nos níveis dos FT músculo-específicos, especialmente os membros da família Myo-D. Atribui-se à orquestração da expressão destes fatores o mecanismo de regulação das fases de ativação, proliferação e diferenciação das CPMs (SEALE & RUDNICKI, 2000). Recentes evidências científicas sugerem que, além de atuarem durante as fases da miogênese, os membros dessa família participam ativamente da regulação da expressão gênica em mionúcleos de fibras musculares esqueléticas (HAWKE & GARRY, 2001; SEWARD et al., 2001).

Hughes e colaboradores (1993) demonstraram a correlação existente entre a elevada taxa de expressão de Myo-D e a expressão de isoformas rápidas de MHC (IIb e IIx) pelos mionúcleos, sugerindo o seu papel na determinação do tipo de fibra muscular. A expressão de Myo-D representa um passo determinante durante a ativação e proliferação das CPMs, fenômenos que demonstramos terem sido estimulados, com o comportamento λ e dose-dependente, pelas radiações LASER utilizadas nesta pesquisa. É possível que o estímulo à proliferação celular encontrado esteja vinculado ao aumento nos níveis deste FT, que, por sua vez, pode ter sido responsável pelo aumento na taxa de expressão da isoforma IIx da MHC.

Por meio da análise *in vivo*, é possível sugerir a capacidade das radiações LASER influenciar a atividade das CPMs durante o processo de regeneração muscular. Embora os aspectos morfológicos, investigados apenas de forma qualitativa, não tenham demonstrado

diferença no padrão de regeneração entre os músculos submetidos ao protocolo de irradiação e placebo, a análise da atividade enzimática evidenciou o potencial bioestimulante das radiações nos λ 685 e 830 nm. O aumento na atividade das enzimas CS e LDH é sugestivo de sua maior concentração no tecido submetido à lesão, que pode ser atribuído, como já mencionado, a maior atividade metabólica e/ou maior contingente das células participantes do processo de regeneração tecidual. Em virtude do período de análise estipulado no protocolo estar relacionado às fases de ativação, proliferação e diferenciação das CPMs (CHAMBERS E McDERMOTT, 1996), pode-se sugerir que, pelo menos em parte, essas respostas se relacionem a influência modulatória das radiações citadas sobre as células mio gênicas.

Os resultados apresentados durante os experimentos *in vitro*, demonstrando uma maior quantidade de RNAm extraído das culturas celulares irradiadas nos λ 685 e 830 nm, reforçam a hipótese sugerida de que a radiação, nesses λ , é capaz de estimular a atividade metabólica das CPMs. Evidências de que a TLBI influencia o metabolismo celular foram reportadas previamente, mas utilizando radiações em λ distinto aos utilizados nesta pesquisa. Vacca e colaboradores (1996) demonstraram a capacidade da radiação no λ 632,8 nm elevar a síntese de proteínas mitocondriais e citosólicas em hepatócitos. Utilizando este mesmo λ , Yasuhiro e colaboradores (1996) relataram o aumento na síntese de pró-colágeno irradiando cultura de fibroblastos humanos. O aumento na síntese de ATP foi demonstrado nos experimentos realizados por Passarella e colaboradores (1984) e Karu e colaboradores (1995).

Analisando conjuntamente os resultados dos experimentos *in vitro* e *in vivo*, é possível concluir que as radiações LASER utilizadas exerceram uma influência biomodulatória sobre as CPMs. O comportamento dessa influência, em concordância com os relatos prévios sobre os fundamentos da TLBI, caracterizou-se pelo padrão λ e dose-dependente. Entre os λ utilizados, as

radiações em 685 e 830 nm apresentaram, frente aos procedimentos experimentais e parâmetros dosimétricos utilizados, os maiores graus de efetividade biológica, sugerindo serem mais apropriadas, quando a TLBI for direcionada ao objetivo de desencadear uma resposta bioestimulante sobre as CPMs.

Um dos principais fatores responsáveis pelas diferenças na efetividade das radiações LASER é o elevado grau de especificidade do processo de interação com as células. São muitas as evidências atribuindo à cadeia transportadora de elétrons das mitocôndrias a capacidade de absorver as radiações LASER, que se encontram nos limites visível e infravermelho próximo do espectro eletromagnético, e transformá-las em energia capaz de influenciar as reações bioquímicas e, conseqüentemente, a função celular (PASSARELLA et al., 1983; PASSARELLA et al., 1988; GRECO et al., 1989; VACCA et al., 1993). Correlacionando o espectro de ação das radiações laser ao espectro de absorção dos componentes da cadeia transportadora de elétrons, é possível considerar que cada radiação, em função do seu λ característico, interage com sítios específicos do complexo protéico citocromo-oxidase. Esse representa o complexo enzimático terminal da cadeia respiratória em células eucarióticas, sendo responsável pelo transporte final dos elétrons, redução da molécula de O_2 para a produção de energia biologicamente disponível (ATP) e água (H_2O). Assim sendo, acredita-se que a magnitude da foto-resposta induzida por uma radiação específica esteja, em parte, diretamente relacionada à função inerente do seu respectivo cromóforo fotoceptor dentro das reações bioquímicas vinculadas a esse complexo (KARU, 1998b). Porém não se pode descartar a influência da especificidade das vias de transdução de sinais ativadas na determinação da natureza e intensidade da foto-resposta induzida (KARU, 1998a).

O presente estudo demonstrou indícios de que a radiação LASER, desde que administrada em parâmetros adequados (λ , dose), é capaz de estimular a proliferação e o metabolismo das CPMs. Acredita-se que, em consequência dessa influência bioestimulante, a radiação possa estimular o processo de regeneração e contribuir para o restabelecimento estrutural e funcional após lesão muscular. Embora os resultados permitam estas suposições, novos estudos devem ser realizados antes da concretização desta técnica como uma modalidade terapêutica efetiva e segura. Infelizmente, isto não é o que se pode verificar na rotina das clínicas de fisioterapia, onde se identifica o uso indiscriminado da técnica sem a apropriada fundamentação científica. A influência de aspectos como a ação de outros λ , modo de emissão da radiação (contínua ou pulsada), densidade de potência, densidade de energia, efetividade de penetração das radiações e melhor caracterização da responsividade celular à TLBI (mecanismos de ação e interação radiação/célula) necessitam ainda de melhor compreensão.

6 Conclusões

6.1 Experimentos *in vitro*

- ✓ As radiações LASER nos λ de 670, 685 e 830 nm demonstraram-se capazes de influenciar, com um comportamento λ e dose-dependente, a capacidade proliferativa das CPMs;
- ✓ O maior nível de efetividade biológica (elevação na taxa de proliferação celular) foi desencadeado pela radiação no λ de 830 nm (84,8 %), seguido pelos níveis alcançados pelas radiações em 685 (70,6 %) e 670 nm (56,8 %). As densidades energéticas específicas responsáveis pelo fenômeno bioestimulante foram, respectivamente, de 0,3, 0,6 e 1,2 J/cm²;
- ✓ A disponibilidade de soro (SFB) contido no meio de cultura celular influenciou a responsividade das CPMs às radiações, sendo a magnitude da foto-resposta induzida mais pronunciada na presença de uma menor concentração de SFB (5%);
- ✓ Além de determinar uma menor efetividade biológica, a concentração de SFB em 10% contribuiu para o aparecimento, no limite superior da curva dose-resposta proposta estabelecida (1,5 J/cm²), do potencial inibitório exercido pelas radiações LASER sobre a proliferação das CPMs;
- ✓ Embora não tenham permitido avaliar a influência das radiações sobre o processo de diferenciação das CPMs, a análise da expressão das isoformas de MHC demonstrou a capacidade das radiações nos λ de 685 e 830 nm de influenciar o padrão de expressão

gênica das CPMs, sendo responsáveis pela diminuição da taxa de expressão da isoforma IIa e elevação da taxa da isoforma IIx;

6.2 Experimentos *in vivo*

- ✓ As radiações LASER nos λ de 685 e 830 nm foram responsáveis pelo aumento da atividade das enzimas CS e LDH durante o processo de regeneração do músculo TA após criolesão. A elevação desta atividade é sugestiva do aumento na concentração destas enzimas, que pode resultar da elevação do metabolismo e/ou contingente das CPMs durante o processo de regeneração.

7 Referência bibliográfica

- ADAMS, G.R., HADDAD, F., BALDWIN, K.M. Time course of changes in markers of myogenesis in overloaded rat skeletal muscle. **J Appl Physiol**, v.87, p.1705-1712, 1999.
- ADAMS, V., LENK, K., SCHUBERT, A., GIELEN, S., SCHULER, G., HAMBRECHT, R. Differentially expressed genes in L6 rat skeletal muscle myoblasts after incubation with inflammatory cytokines. **Cytokine**, v.13, p.342-348, 2001.
- AGAIBY, A.D., GHALI, L.R., DYSON, M. Laser modulation of T-lymphocytes proliferation in vitro. **Laser Ther**, v.10, p.153-158, 1998.
- AGAIBY, A.D., GHALI, L.R., WILSON, R., DYSON, M. Laser modulation of angiogenic factor production by T-lymphocytes. **Lasers Surg Med**, v.26, p.357-363, 2000.
- ALLEN, R.E., McALLISTER, P.K., MASAC, K.C. Myogenic potential of satellite cells in skeletal muscle of old rats: A brief note. **Mech Ageing Dev**, v.13, p.105, 1980.
- ALLEN, R.E. & BOXHORN, L.K. Regulation of skeletal muscle satellite cells proliferation and differentiation by transforming growth factor-beta, insulin-like growth factor I and fibroblast growth factor. **J Cell Physiol**, v.183, p.311-315, 1989.
- ALLEN, R.E., SHEEHAN, S.M., TAYLOR, R.G., KENDALL, T.L., RICE, G.M. Hepatocyte growth factor activates quiescent skeletal muscle satellite cells in vitro. **J Cell Physiol**, v.165, p.307-312, 1995.
- ALMEIDA-LOPES L., RIGAU J., ZANGARO R.A., GUINDUGLI-NETO J., JAEGER M.M.M. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. **Lasers Surg Med**, v.29, p.179-184, 2001.
- AL-WATBAN, F.A.H., ZHANG, M.D. Comparison of wound healing process using Argon and Krypton LASERs. **J. Clin. Laser Med. Surg**. v.15. n.5, p.209-215, 1997.
- AMARAL A.C., PARIZOTTO N.A., SALVINI T.F. Dose-dependency of low-energy HeNe laser effect in regenerating of skeletal muscle in mice. **Lasers Med Sci**, v.16, p.44-21, 2001.

Referência Bibliográfica

- ANASTASI, S., GIORDANO, S., STHANDIER, O., GAMBAROOTA, G., MALONE, R., COMOGLIO, P., AMATI, P. A natural hepatocyte growth factor/scatter factor autocrine loop in myoblast cells and the effect on the constitutive met kinase activation on myogenic differentiation. **J Cell Biol**, v.137, p. 1057-1068, 1997.
- ANDREWS, J.R., HARRELSON, G.L., WILK, K.E. **Reabilitação física das lesões desportivas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
- BARNARD, W., BOWER, J., BROWN, M., MURPHY, M., AUSTIN, L. Leukaemia inhibitory factor (LIF) infusion stimulates skeletal muscle regeneration after injury: injured muscle expresses LIF mRNA. **J Neurol Sci**, v.123, p. 108-113, 1994.
- BARUSHKA, O., YAAKOBI, T. e ORON, U. Effect of low-energy LASER (He-Ne) irradiation on the process of bone repair in the rat tibia. **Bone**, v.16, p.47-55, 1995.
- BASFORD, J.R. Low intensity laser therapy: still not an established clinical tools. **Lasers Surg Med**, v.16, p.331-342, 1995
- BAXTER, G.D. Medical lasers and photomedicine. In: _____. **Therapeutic lasers: Theory and practice**. Edinburg: Churchill Livingstone, 1997a.
- BAXTER, G.D. Laser physics. In: _____. **Therapeutic lasers: Theory and practice**. Edinburg: Churchill Livingstone, 1997b.
- BEN-DOV N., SHEFER G., IRINTCHEV A., WERNIG A., ORON U., HALEVY O. Low-energy laser irradiation affects cell proliferation and differentiation in vitro. **Biochem Biophys Acta**, v.1448, p.372-380, 1999.
- BIBIKOVA, A., ORON, U. Regeneration in denervated toad (*Bufo viridis*) Gastrocnemius muscle by low-energy laser irradiation. **Anat Rec**, v. 235, p.374-380, 1993.
- BIBIKOVA, A., ORON, U. Promotion of muscle regeneration in the toad (*Bufo viridis*) Gastrocnemius muscle and the promotion of the process by low energy laser irradiation. **Anat Rec**, v. 241, p.123-128, 1995.
- BISHOFF, R. Interaction between satellite cells and skeletal muscle fibers. **Development**, v.109, p.943-952, 1990.
- BOYNTON, A.L. & WHITFIELD, J.F. The role of cyclic AMP in cell proliferation: a critical assessment of the evidence. In: GREENGARD, P.G., & ROBINSON, G.A. **Advances in cyclic nucleotid research**. New York: Raven Press, 1983.

Referência Bibliográfica

- BROWN, M.C., HOLLAND, R.L., HOPKINS, W.G. Motor nerve sprouting. **Ann Rev Neurosci**, v.4, p.17-42, 1981.
- BULYAKOVA, N.V. Effect of He-Ne laser irradiation on regeneration of skeletal muscle in newborn and aged rats. **Dokl Biol Sci**, v.336, p.287-290, 1994.
- BULYAKOVA, N.V., AZAROVA, V.S. Comparative study of regeneration of skeletal muscle in adult rats and guinea pigs after laser therapy. **Dokl Biol Sci**, v.337, p.406-408, 1994.
- BÜSCHER, D., BELMONTE, J.C.I. Muscle development during vertebrate outgrowth. **Cell Tissue Res**, v.296, p.131-139, 1999.
- CANTINI, M., MASSIMO, M.L., BRUSON, A., CATANI, C., LIBERA, L.D., CARRARO, U. Macrophages regulate proliferation and differentiation of satellite cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v.202, p.1688-1696, 1994.
- CARLSON, B.M., HANSEN-SMITH, F.F., MAGON, D.K. The life history of a free muscle graft. In: MAURO, A. **Muscle Regeneration**. New York: Raven Press, 1979.
- CARLSON, B.M. & FAULKNER, J.A. The regeneration of skeletal muscle fibers following injury: a review. **Med Sci Sports Exerc**, v.15, p.187-198, 1983.
- CARPENTER, S. & KARPATI, G. **Pathology of muscle skeletal**. London: Churchill Livingstone, 1984.
- CHAMBERS, R.L. & McDERMOTH, J.C. Molecular basis of skeletal muscle regeneration. **Can J Appl Physiol**, v.21, p.155-184, 1996.
- CLARKE, M.S., KHAKEE, R., McNEIL, P.L. Loss of cytoplasmic basic fibroblast growth factor from physiologically wounded myofibers of normal and dystrophic muscle. **J Cell Sci**, v.106, p.121-133, 1993.
- COLLINS, T. Inflamação aguda e crônica. In: COTRAN, R.S., KUMAR, V., COLLINS, T. **Patologia estrutural e funcional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
- CORNELISON, D.D.W. & WOLD, B.J. Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells. **Develop Biol**, v.191, p.270-283, 1997.
- DAVID, R., NISSAN, M., COHEN, I., SOUDRY, M. Effect of low-power He-Ne LASER on Fracture healing in rats. **Lasers Surg. Med.**, v.19, p.458-464, 1996.

Referência Bibliográfica

- DeANGELIS, , L.D., BERGHELLA, L., COLETTA, M., DeANGELIS, M.G.C., LATTANZI, L., PONZETTO, C., COSSU, G. Skeletal Myogenic progenitors originating from embryonic dorssal aorta co-express endothelial and myogenic markers and contribute to pos-natal muscle growth and regeneration. **J Cell Biol**, v.147, p.869-878, 1999.
- DENIZOT, F., LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: Modifications to the tatrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **J Immunol methods**, v.89, p.271-277, 1986.
- DIAMANTOPOULOS, C. Bioenergetics and tissue optics. In: BAXTER, G.D. **Therapeutic lasers: Theory and practice**. Edinburg: Churchill Livingstone, 1997.
- DRIEDZIC, W.R., ALMEIDA-VAL, V.M.F. Matching of cardiac oxygen delivery and fuel suply to energy demand in teleosts and cephalopode. **Can J Zool**, v.66, p.1078-1083, 1996.
- ENGEL, A.G. & BIESECKER, G. Complement activation in muscle fiber necrosis: Demonstration of the membrane attack complex of complement in cecrotic fibers. **Ann Neurol**, v.12, p.289-296, 1982.
- ENWEMWKA, C.S., Ultrastructural morphometry of membrane-bound intracytoplasmatic collagen fibrils in tendon fibroblast exposed to He-Ne laser beam. **Tissue Cell**, v.24, p.511-523, 1992.
- FISHMAN, D.A. Myofibrillogenesis and the morphogenesis of skeletal muscle. In: ENGEL, A.G. & BANKER, B.Q. **Myology**. New York: McGraw Hill, 1986.
- FLOSS, T., ARNOLD, H.H., BRAUN, T. A role for FGF-6 in skeletal muscle regeneration. **Genes Dev**, v.11, p.2040-2051, 1997.
- FRIEDMANN, H., LUBART, R., LAULICHT, I. A possible explanation of laser-induced stimulation and damage of cell cultures. **J Photochem Photobiol B: Biol**, v.11, p.87-95, 1991.
- GAL-LEVI, R., LESHEM, Y., AOKI, S., NAKAMURA, T., HALEVY, O. Hepatocyte growth factor plays a dual role in reguleting skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation. **Biochem Biophys Acta**, v.1402, p.39-51, 1998.
- GHALI, L., DYSON, M. The direct effect of light therapy on endothelial cell proliferation in vitro. In: STEINER, R., WEISZ, P.B., LANGER, R. **Angiogenesis: Key principles-science-technology-medicine**. Basel: Birkhauser Verlag, Switzerland, 1992.

Referência Bibliográfica

- GIBSON, M.C., SCHULTZ, E. Age-related differences in absolute numbers of skeletal muscle satellite cells. **Muscle Nerve**, v.6, p.574-580, 1983.
- GOLDSPINK, G. Changes in muscle mass and phenotype and the expression of autocrine and systemic growth factors by muscle in response to stretch and overload. **J Anat**, v.194, p.323-334, 1999.
- GRECO, M., GUIDA, G., PERLINO, E., MARRA, E., QUAGLIARIELLO, E. Increase in RNA and protein synthesis by mitochondria irradiated with helium-neon laser. **Biochem Biophys Res Commun**, v.163, p.1428-1434, 1989.
- GRECO, M., VACCA, R., MORO, L., PERLINO, E., PETRAGALLO, V.A., MARRA, E., PASSARELLA, S. Helium-Neon laser irradiation of hepatocytes can trigger increase of the mitochondrial membrane potential and can stimulate *c-fos* expression in a Ca^{2+} -dependent manner. **Lasers Surg Med**, v.29, p.433-441, 2001.
- GROSSMAN, N., SCHNEID, N., REUVENI, H., HALEVY, S., LUBART, R. 780 nm low power diode laser irradiation stimulates proliferation of keratinocyte cultures: involvement of reactive oxygen species. **Lasers Surg Med**, v.22, p.212-218, 1998.
- GROUNDS, M.D. Towards understanding skeletal muscle regeneration. **Path Res Pract**, v.187, p.1-22, 1991.
- HALLIDAY, D. & RESNICK, R. Ondas eletromagnéticas. In: _____ **Física**. Rio de Janeiro: Livros técnicos e científicos, 1988.
- HAWKE, T.J. & GARRY, D.J. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. **J Appl Physiol**, v.91, p.534-551, 2001.
- HUGHES, S.M., TAYLOR, J.M., TAPSCOTT, S.J., GURLEY, C.M., CARTER, W.J., PETERSON, C.A. Selective accumulation of MyoD and myogenin mRNAs in fast and slow adult skeletal muscle is controlled by innervation and hormones. **Development**, v.118, p.1137-1147, 1993.
- HURME, T. & KALIMO, H. Activation of myogenic precursor cells after muscle injury. **Med Sci Sports Exerc**, v.24, p.197-205, 1992.
- JACKSON, K.A., MI, T., GOODELL, M.A. Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. **Proc Natl Acad Sci**, v.96, p.14482-14486, 1999.
- KARU, T. Photobiological fundamentals of low-power laser therapy. **IEEE J Quantum Electron**, v.23, p.1703-1717, 1987.

- KARU, T. Molecular mechanism of the therapeutic effect of low-intensity laser radiation. **Lasers Life Sci**, v.2, p.53-74, 1988.
- KARU, T., PYATTIBRAT, L., KALENDU, G. Irradiation with He-Ne laser increase ATP level in cells cultivated *in vitro*. **J Photochem Photobiol B: Biol**, v.27, p.219-223, 1995.
- KARU, T. Basics of the Action of monochromatic visible and near infrared radiation on cells. In: _____ **The science of low-power laser therapy**. Amsterdam: Gordon and Breach Publishers, 1998a.
- KARU, T. Primary and secondary mechanisms of the action of monochromatic visible and near infrared radiation on cells. In: _____ **The science of low-power laser therapy**. Amsterdam: Gordon and Breach Publishers, 1998b.
- KAWASAKY, K., SHIMIZU, N. Effect of low-energy irradiation on bone remodeling during experimental tooth movement in rats. **Lasers Surg Med**, v.26, p.282-291, 2000.
- KNIGHT, K.L. **Crioterapia no tratamento das lesões esportivas**. São Paulo: Manole, 2000.
- KUREK, J.B., BOWER, J.J., ROMANELLA, M., KOETGEN, F., MURPHY, M., AUSTIN, L. The role of leukemia inhibitory factor in skeletal muscle regeneration. **Muscle Nerve**, v.20, p.815-822, 1997.
- LAGAN K.M., McDONOUGH, S.M., CLEMENTS, A., BAXTER, G.D. A case report of low intensity laser therapy (LILT) in the management of venous ulceration: potencial effects of wound debridment upon efficacy. **J Clin Laser Med Surg**, v.18, p.15-22, 2000.
- LESCAUDRON, L., PELTÉKIAN, E., FONTAINE-PÉRUS, J., PAULIN, D., ZAMPIERI, M., GARCIA, L., PARRISH, E. Blood borne macrophages are essential for the triggering of muscle regeneration following muscle transplant. **Neuromuscular Disorders**, v.9, p.72-80, 1999.
- LIEBER, R.L. **Skeletal muscle structure and function: Implications for rehabilitation and sports medicine**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1992.
- LOWE, A.S., WALKER, M.D., O'BYRNE, M., BAXTER, G.D., HIRST, D.G., Effect of low-intensity monochromatic light therapy (890nm) on a radiation-impaired, wound-healing model in murine skin. **Lasers Surg Med**, v.23, p.291-298, 1998

Referência Bibliográfica

- LUGER, E.J., ROCHKIND, S., WOLLMAN, Y., KOGAN, G., DEKEL, S. Effect of low-power LASER irradiation on the mechanical properties of bone fracture healing in rats. **Lasers Surg Med**, v.22, p.97-122, 1998.
- MARUENCA, C & ARMSTRONG, C.F. Satellite and invasive cells in frog *sartorius* muscle. **Tissue cell**, v.10, p.749, 1978.
- MAURO, A. Satellite cells of skeletal muscle fibers. **J Biophys Biochem Cytol**, v.9, p.493-495, 1961.
- MAZANET, R. & FREZARINI-ARMSTRONG, G. The satellite cell. In: ENGEL, A.G. & BANKER, B.Q. **Myology**. New York: McGraw Hill, 1986.
- MELO, C.A.S., LIMA, A.L.L.A., BRASIL, I.R.C., CASTRO E SILVA Jr, O, MAGALHÃES, D.V., MARCASSA, L.G., BAGNATO, V.S. Characterization of light penetration in rat tissues. **J Clin Laser Med Surg**, v.19, p.175-179, 2001.
- MOORE, M.A.S. Stem cells concepts. In: MAURO, A. **Muscle regeneration**. New York: Raven Press, 1979.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. **J Immunol Methods**, v.65, p.55, 1983.
- NACHLAS, M.M., TSUO, K.C., DeSOUZA, E., CHENG, C.S., SELIGAM, A.M., Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by the use of a new p-nitrophenil substituted dietrazole. **J Histochem Cytochem**, v.5, p.420-436, 1957.
- OLIVEIRA, N.M., PARIZOTTO, N.A., SALVINI, T.F. GaAs (904 nm) laser radiation does not affect muscle regeneration in mouse skeletal muscle. **Lasers Surg Med**, v.25, p.13-21, 1999.
- PASSARELLA, S., PERLINO, E., QUAGLIARIELLO, E., BALDASSARRE, L., CATALANO, J.M., CINGOLANI, A. Evidence of changes induced by He-Ne laser irradiation in the biochemical properties of rat liver mitochondria. **Bioelectrochem Bioenerg**, v.10, p.185-198, 1983.
- PASSARELLA, S., CASAMASSIMA, E., MOLINARI, S., PASTORE, D., QUAGLIARIELLO, J.M., CATALANO, J.M., CINGOLANI, A. A increase of proton electro-chemical potencial and ATP synthesis in rat liver mitochondria irradiated *in vitro* by He-Ne laser. **FEBS let**, v.175, p.95-99, 1984.
- PASSARELLA, S., OSTUNI, A., ATLANTE, A., QUAGLIARIELLO, E. Increase in the ADP/ATP exchange in the rat liver mitochondria irradiated *in vitro* by He-Ne laser. **Biochem Biophys Res Commun**, v.156, p.978-986, 1988.

Referência Bibliográfica

- PEREIRA, A.N., EDUARDO, C.P., MATSON, E., MARQUES, M.M. Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. **Lasers Surg Med**, v.31, p.263-267, 2002.
- PINHEIRO A.L.B., VIEIRA, A.L.D.B., BRUGNERA A., ZANIN F.A., ROLIM, A.B., DaSILVA P.S. Effect of low-level laser therapy on malignant cells: in vitro study. **J Clin Laser Med Surg**, v.20, p.23-26, 2002.
- REDDY, G.K., STEHNO-BITTEL, L., ENWEMEKA, C.S. Laser photostimulation of collagen production in healing rabbit achilles tendon. **Lasers Surg Med**, v.22, p.281-287, 1998.
- RENAULT, V., PIRON-HAMELIN, G., FORESTIER, C., DiDONNA, S., DECARY, S., HENTATI, F., SAILLANT, G., BUTLER-BROWNE, G.S., MOULY, V. Skeletal muscle regeneration and the mitotic clock. **Exp Gerontol**. V.35, p.711-719, 2000.
- RENDE, M., BRIZI, E., CONNER, J., TREVES, S., CENSIER, K., PROVENZANO, C., TAGLIALATELA, G., SANNA, P.P., DONATO, R. Nerve growth factor influences differentiation and proliferation of myogenic cells in vitro via TrKA. **Int J Devl Neurosciences**, v.18, p.869-885, 2000.
- RIBEIRO, M.S., SILVA, D.F.T., MALDONADO, E.P., ROSSI, W., ZECELL, D.M., Effect of 1047-nm neodymium laser radiation on skin wound healing. **J Clin Laser Med Surg**, v.20, p.37-40, 2002
- ROSENBLAT, J.D., YONG, D., PARRY, D.J. Satellite cell activity is required for hypertrophy of overloaded adult rat muscle. **Muscle Nerve**, v. 17, p. 608-613, 1994.
- SAKUMA, K., WATANABE, K., SANO, M., KITAJIMA, S., SAKAMOTO, K., URAMOTO, I., TOTSUKA, T. The adaptive response of transforming growth factor- β 2 and β RII in the overloaded regenerating and denervated muscles of rats. **Acta Neuropathol**, v.99, p.177-185, 2000.
- SAMBROK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Press, 1989.
- SANES, J.R. The extracellular matrix. In: ENGEL, A.G. & BANKER, B.Q. **Myology**. New York: McGraw Hill, 1986.
- SEALE, P., RUDNICKI, M.A. A new look at the origin, function, and “stem cells” status of muscle satellite cells. **Develop Biol**, v.218, p.115-124, 2000.

Referência Bibliográfica

- SEWARD, D.J., HANEY, J.C., RUDNICKI, M.A., SWOAP, S.J. bHLH transcription factor Myo-D affects myosin heavy chain expression pattern in a muscle-specific fashion. *Am J Physiol Cell Physiol*, v.280, p.C408-C413, 2001.
- SHEEHAN, S.M., TATSUMI, R., TEMM-GROVE, C.J., ALLEN, R.E. HGF is an autocrine growth factor for skeletal muscle satellite cells in vitro. **Muscle Nerve**, v.23, p.239-245, 2000.
- SHIELDS, D & O'KANE, S. Laser photobiomodulation of wound healing. In: BAXTER, G.D. **Therapeutic lasers: Theory and practice**. Edinburg: Churchill Livingstone, 1997.
- SNOW, M.H. Origin of regenerating myoblast in mammalian skeletal muscle. In: MAURO, A. **Muscle Regeneration**. New York: Raven Press, 1979.
- SROKA, R., SCHAFFER, M., FUCHS, C., PONGRATZ, T., SCHRADER-REICHARD, U., BUSCH, M., SCHAFFER, M., DÜHMKE, E., BAUMGARTNER, R. Effects on the mitosis of normal and tumor cells induced by light treatment of different wavelengths. **Lasers Surg Med**, v.25, p.263-271, 1999.
- STADLER, I., EVANS, R., KOLB, B., NAIM, J.O., NARAYAN, V., BUEHNER, N., LANZAFAME, R.J. In vitro effects of low-level laser irradiation at 660nm on peripheral blood lymphocytes. **Lasers Surg Med**, v.27, p.255-261, 2000.
- STPIERRE, B.A. & TIDBALL, J.G. Differential response of macrophage subpopulations to *Soleus* muscle reloading after rat hindlimb suspension. **J Appl Physiol**, v.77, p.290-297, 1994.
- TATSUMI, R., ANDERSON, J.E., NEVORET, C.J., HALEVY, O., ALLEN, R.E. HGF/SF is present in normal adult skeletal muscle and is capable of activating satellite cells. **Dev Biol**, v.194, p.114-128, 1998.
- TIDBALL, J.G. Inflammatory cell response to acute muscle injury. **Med Sci Sports Exerc**, v.27, p.1022-1032, 1995.
- TUNÉR, J., HODE, L. Biostimulation. In: _____ **Low level Laser therapy**. Clinical practice and scientific background. Sweden: Prima Books, 1999.
- VACCA, R.A., MARRA, E., QUAGLIARIELLO, E., GRECO, M. Activation of mitochondrial replication by He-Ne laser irradiation. **Biochem Biophys Res Commun**, v.195, p.704-709, 1993.
- VACCA, R.A., MARRA, E., PASARELLA, S., PETRAGALLO, V.A., GRECO, M. Increase in cytosolic and mitochondrial protein synthesis in rat hepatocytes irradiated in vitro by He-Ne laser. **J Photochem Photobiol B: Biol**, v.34, p.197-202, 1996.

Referência Bibliográfica

- VAN BREUGEL, H.H.F.I., BAR, P.R. He-Ne laser irradiation affects proliferation of cultured rat schwann vells in a dose-dependent manner. **J Neurocytol**, v.22, p.185-190, 1993.
- VIERCKE, J., O'REILLY, B., HOSSNER, K., ANTONIO, J., BYRNE, K., BUCCI, L., DODSON, M. Satelite cell regulation following myotrauma caused by resistance exercise. **Cell Biol. Internat.**, v.24, p.263-272, 2000.
- WALKER, M.D., RUMPF, S., BAXTER, G.D., HIRST, D.G., LOWE, A.S. Effect of low-intensity laser irradiation (660nm) on a radiation-impaired wound-healing model in murine skin. **Lasers Surg Med**, v.26, p.41-47, 2000.
- WATT, D.J., MORGAN, J.E., CLIFFORD, M.A., PATRIDGE, T.A. The movement of muscle precursor cells between adjacent regenerating muscles in the mouse. **Anat Embryol**, v.175, p.527-536, 1987.
- WEBB, C., DYSON, M., LEWIS, W.H.P. Stimulatory effet of 660 nm low level laser energy on hypertrophic scar-derived fibroblast: possible mechanisms for increase in cell counts. **Lasers Surg Med**, v.22, p.294-301, 1998.
- WEISS, N. e ORON, U. Enhancement of muscle regeneration in the rat *Gastrocnemius* muscle by low energy LASER irradiation. **Anat Embryol**, v.186, p.497-503, 1992.
- WHITFIELD, J.F., BOYNTON, A.L., McMANUS, J.P., NIXON, R.H., SIRORSKA, M., TSNAG, B., WALKER, P.R., SWIERENGA, G.H.H. The roles of calcium and cyclic AMP in cell proliferation. **Ann N Y Acad Sci**, v.339, p.216-240, 1980.
- WILLIAMS, P.E., & GOLDSPIK, G. The effect of immobilization on the longitudinal growth of striated muscle fiber. **J Annat**, v.116, p.45-55, 1973.
- YAMAMOTO, Y., KONO, T., KOTANI, H., KASAI, S., MITO, M. Effect of low-power laser irradiation on procollagen synthesis in human fibroblast. **J Clin Laser Med Surg**, v.14, p.129-132, 1996.
- YAMAMOTO, M., TAMURA, K., HIRATSUKA, K., ABIKO, Y. Stimulation of MCM3 gene expression in osteoblast by low level laser irradiation. **Lasers Med Sci**, v.16, p.213-217, 2001.
- YOUNG, S., BOLTON, P., DYSON, M., HARVEY, W., DIAMANTOPOULOS, C. Macrophage responsiveness to light therapy. **Lasers Surg Med**, v.9, p.497-505, 1989.
- YU, W., NAIM, J.O., LANZAFAME, R.J. The direct effect of laser irradiation on the release of bFGF from 3T3 fibroblast. **J Photochem Photobiol B: Biol**, v.54, p.167-170, 1994a.

Referência Bibliográfica

YU, W., NAIM, J.O., LANZAFAME, R.J. The effects of photo-irradiation on the secretion of TGF- β and bFGF from fibroblast in vitro. **Lasers Surg Med**, (suppl), v.6, 1994b.

YU, H.S., CHANG, K, YU, C.L., CHEN, J., CHEN, G. Low-energy Helium-Neon laser irradiation stimulates interleucin-1 α and interleucin-8 release from cultured human keratinocytes. **J Invest Dermatol**, v.107, p.593-596, 1996.