



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA

EFEITOS DA TERAPIA LASER DE BAIXA INTENSIDADE
NA REGENERAÇÃO MUSCULAR DE RATOS APÓS CRIOLEÇÃO

NATÁLIA CAMARGO RODRIGUES

SÃO CARLOS – SP
2013

NATÁLIA CAMARGO RODRIGUES

**EFEITOS DA TERAPIA LASER DE BAIXA INTENSIDADE
NA REGENERAÇÃO MUSCULAR DE RATOS APÓS CRIOLESÃO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

**Orientadores: Profa. Dra. Ana Cláudia Muniz Renno
Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto**

**SÃO CARLOS - SP
2013**

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

R696et

Rodrigues, Natália Camargo.

Efeitos da terapia laser de baixa intensidade na regeneração muscular de ratos após criolesão / Natália Camargo Rodrigues. -- São Carlos : UFSCar, 2013.
91 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2013.

1. Biotecnologia. 2. Expressão gênica. 3. Imunohistoquímica. I. Título.

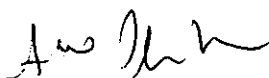
CDD: 660.6 (20^a)

Natália Camargo Rodrigues

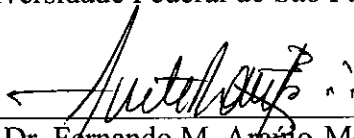
Tese de Doutorado submetida à
Coordenação do Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia, da
Universidade Federal de São
Carlos, como requisito parcial para
a obtenção do título de Doutor em
Biotecnologia

Aprovado em: 01/03/2013

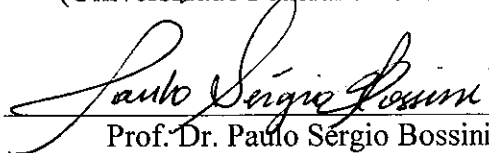
BANCA EXAMINADORA



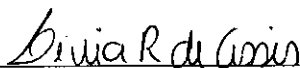
Prof.^a Dr.^a Ana Claudia Muniz Renno (Orientadora)
(Universidade Federal de São Paulo)



Prof. Dr. Fernando M. Araújo-Moreira
(Universidade Federal de São Carlos)



Prof. Dr. Paulo Sérgio Bossini
(Universidade Federal de São Paulo)



Dr.^a Livia Ribeiro de Assis
(Universidade Federal de São Paulo)



Prof.^a Dr.^a Raquel Agnelli Mesquita-Ferrari
(Universidade Nove de Julho)

A parte experimental desse trabalho foi desenvolvida no Laboratório de Eletrotermofototerapia do Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos, sob orientação da Profa. Dra. Ana Cláudia Muniz Renno e do Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto. Os créditos referentes às disciplinas foram obtidos junto ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Profa. Dra. Ana Claudia Muniz Renno, pela orientação e confiança em meu trabalho durante o doutorado. Pelo meu crescimento e amadurecimento científico: desde a elaboração dos projetos, dos artigos, até a elaboração dessa tese. Por seu apoio durante meu estágio no exterior, foi muito importante para mim. Obrigada pelos ensinamentos, pela amizade e muito obrigada pelos conselhos pessoais e profissionais.

Ao Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto, pela orientação não somente durante o doutorado, mas desde quando me recebeu em seu laboratório como aluna especial. Obrigada pelos ensinamentos, conselhos e pela amizade ao longo desses anos, que contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional.

Serei sempre grata aos dois!!

AGRADECIMENTOS

À Deus.

À minha família, pelo apoio, amor e carinho incondicional.

Ao meu marido, por todo o seu amor e empenho para me ajudar em todo momento. Quanto carinho e paciência para estar sempre presente, mesmo quando ficamos tão distantes. Obrigada por ser tão especial na minha vida. Te amo.

À minha amiga Tais, quanto eu devo a você. Muito obrigada pelos conselhos e por sempre estar presente.

À minha amiga Dinora, pelos ensinamentos, conselhos e amizade.

Aos amigos, Aderson, Lú, Lucca, Rossana e Maiquel, pela grande ajuda e pela amizade construída durante meu estágio no exterior.

As Profas. Liisa Laakso e Gillian Renshaw, pelo apoio, orientação, ensinamentos e amizade construída durante meu estágio no exterior.

À Profa. Heloisa Sobreiro Selistre de Araujo, por ter aberto as portas de seu laboratório para a realização das análises de expressão gênica.

À Profa. Tânia Salvini por permitir que eu utilizasse o laboratório de plasticidade muscular.

Ao Prof. Dr. Daniel Ribeiro, pela grande ajuda com as análises de imunohistoquímica.

À Profa. Dra. Patricia Driusso pela ajuda com as análises estatísticas.

Ao amigo Paulo Bossini, pelo apoio e conselhos.

À Roberta Brunelli, pela grande ajuda durante todo o período experimental.

À Carlota, pela amizade e pelos momentos de descontração.

À amiga Kelly Fernandes pela ajuda na realização das análises de imunohistoquímica e pela amizade construída entre os vários finais de semana fazendo PCR.

A todos os companheiros de laboratório de Eletrotermofototerapia do Departamento de Fisioterapia da UFSCar, pelos momentos compartilhados.

À secretária Cláudia, do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, pela assistência em todos os momentos necessários.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

Enfim, aos velhos e novos amigos que fizeram parte, diretamente e indiretamente, dessa jornada.

Muito obrigada!!!

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”.
(Albert Einstein)

RESUMO

Lesões do sistema músculo esquelético decorrentes de atividades esportivas são comuns, porém apesar da capacidade regenerativa intrínseca do tecido muscular, este processo pode ser prejudicado de acordo com a extensão da lesão, causando atrofia, fibrose, dor e incompleta recuperação funcional, aumentando o risco de lesões recorrentes. Dentro desse contexto, recursos biofísicos e bioquímicos tem sido estudados na tentativa de acelerar o processo de regeneração muscular, como a terapia *laser* de baixa intensidade (LLLT). Vários estudo demonstram que esta modalidade terapêutica estimula respostas positivas durante o reparo do tecido muscular. Diante disso, foram desenvolvidos dois estudos com o objetivo de verificar os efeitos da LLLT (InGaAlP – 660 nm), com as fluências de 10 J/cm² e 50 J/cm², durante a regeneração do músculo tibial anterior criolesionado. Sessenta e três ratos da linhagem *Wistar* (3 meses de idade, ±300 g) foram distribuídos aleatoriamente em 3 grupos: grupo controle lesado sem nenhum tratamento (GC), grupo lesado e tratado com 10 J/cm² (G10) e grupo lesado e tratado com 50 J/cm² (G50). Ainda, todos os grupos foram subdivididos em 3 subgrupos (n=7), onde os animais foram eutanasiados depois de 7, 14 e 21 dias da indução da lesão. A irradiação laser foi realizada em um único ponto e se iniciou 48 horas após a criolesão, 5 vezes por semana (a cada 24 horas), seguidos de um intervalo de 48 horas. No primeiro estudo, foram analisados os efeitos da LLLT na regeneração muscular em relação aos mecanismos moleculares envolvidos no processo de reparo. Os resultados demonstraram que ocorreu uma redução da expressão do RNAm do Cox-2 em todos os grupos irradiados após 14 e 21 dias. No sétimo dia, a expressão do RNAm do VEGF não aumentou nos dois grupos tratados, entretanto sua expressão aumentou depois de 14 e 21 dias de tratamento, principalmente com a fluência de 50 J/cm². A expressão do RNAm da MyoD foi aumentada com a fluência maior, em todos os períodos analisados, e com a fluência menor apenas depois de 21 dias. A expressão da Miogenina foi reduzida em ambos os grupos tratados em 7 dias, e foram aumentadas com a fluência de 10 J/cm² depois de 21 dias. Estes resultados sugerem que a LLLT pode melhorar a regeneração muscular através da estimulação da expressão gênica. No segundo estudo, foram avaliados os efeitos da LLLT durante a regeneração muscular, nos seus aspectos histológicos e imunohistoquímicos. Uma modulação do processo inflamatório em 7 dias foi visualizada nos grupos tratados. No 14º dia, os animais irradiados, com as duas fluências, apresentaram fibras musculares jovens organizadas e pouco tecido de granulação. Depois de 21 dias de lesão, todos os grupos apresentaram tecido muscular organizado similar ao músculo esquelético sem lesão. Além disso, uma menor área de necrose no primeiro período experimental foi observada nos grupo tratados e uma maior quantidade de vasos sanguíneos depois de 14 e 21 dias foi visualizada no grupo tratado com a fluência de 50 J/cm². A imunohistoquímica demonstrou expressão da Miogenina em todos os grupos experimentais depois de 7 e 14 dias, e no 21º dia, no grupo controle e no grupo tratado com a menor fluência. Maior expressão da MyoD esteve presente nos grupos tratados em todos os períodos avaliados. Concluindo, as duas fluências da LLLT desempenharam efeitos positivos durante o reparo muscular. Tais resultados são fundamentais na elucidação dos mecanismos biológicos e moleculares envolvidos na regeneração muscular.

Palavras-chave: regeneração muscular, terapia laser de baixa intensidade, criolesão, expressão gênica, imunohistoquímica.

ABSTRACT

Skeletal muscle injuries from sport activities are usual, but despite the inherent healing capacity of muscle tissue, this process can be impaired depending on the injury extension, what can lead to atrophy, fibroses, pain and functional recovery incomplete, increasing the risks of recurrent lesions. In addition, biophysical and biochemical resources have been studied in an attempt to enhance the muscle regeneration process, as the low level laser therapy (LLLT). Many studies have showed that this therapeutic modality stimulates positives responses during muscle healing process. Thus, two studies were performed with the aim of evaluating the effects of LLLT (InGaAlP – 660 nm), with the fluences of 10 J/cm² and 50 J/cm², during Tibiales anterior muscle regeneration after cryolesion. Sixty three Wistar rats (3 month of age, ±300 g) were randomly divided into 3 groups: injured control group (CG) – injured animals without any treatment; treated group, at 10 J/cm² (G10) and treated group, at 50 J/cm² (G50). Each group was divided into 3 different subgroups (n=7) and on days 7, 14 and 21 post-injury, were sacrificed. The laser irradiation was performed at a single point and started 48 hours after injury, 5 times per week (each 24 hours), followed by an interval of 48 hours. At the first study, the effects of LLLT were analyzed on the muscle regeneration related on molecular mechanisms involved at repair process. The results showed a downregulation of mRNA Cox-2 expression in all treated groups after 14 and 21 days. On day 7, both treated groups had a downregulation of mRNA Vegf expression, but had a increase after 14 and 21 days of treatment, meanly at 50 J/cm². The mRNA MyoD expression was upregulated with the higher fluence, in all periods evaluated, and with the lower fluence the MyoD levels increased only after 21 days. The Myogenin expression was downregulated in both treated groups on day 7, and was upregulated with dose of 10 J/cm² after 21 days. These responses suggest that LLLT can improve the skeletal muscle regeneration through the gene expression stimulation. At the second study, the effects of LLLT were evaluated during muscle regeneration, through histological and immunohistochemical aspects. The treated groups had an inflammatory process modulation after 7 days. On day 14, the treated animals, with both fluences, showed organized new muscle fibers and less granulation tissue. After 21 days of lesion, all groups had complete tissue repair. Moreover, the irradiated groups had less necrosis area at the first experimental period evaluated, and, also had more blood vases quantity after 14 and 21 days, at 50 J/cm². The immunohistochemistry analysis showed Myogenin expression in all experimental groups after 7 and 14 days, and at day 21st; the immunoexpression was detectable in the control group and in the treated group with lower fluence. Superior MyoD expression appeared in both treated groups during all evaluated periods. Concluding, both fluencies of LLLT played positive effects on muscle repair. Such findings are fundamentals to elucidate the biological and molecular mechanisms involved in the skeletal muscle regeneration

Key-words: muscle regeneration, low level laser therapy, cryolesion, gene expression, immunohistochemical.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABNT = Associação Brasileira de Normas Técnicas

ANOVA = Análise de Variância

ATP = Adenosina Trifosfato

°C = Graus Celsius

Ca = Cálcio

cm = Centímetro

cm² = Centímetro Quadrado

CK: Creatina quinase (do ingles: creatine kinase)

COX = Ciclo-Oxigenase

COX-1 = Ciclo-Oxigenase-1

COX-2 = Ciclo-Oxigenase-2

Ct – Treshold Cicle

DNA = Ácido Desoxirribonucléico E

g = Grama

Ga-Al-As = Arseneto de Gálio e Alumínio

HE = Hematoxilina – Eosina

He-Ne = Hélio-Neônio

Hz = Hertz

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

IgG = Imunoglobulina G

IL-1 β : Interleucina 1 beta

IL-6: Interleucina 6

J = Joule

J/cm² = Joule por Centímetro Quadrado

Laser = Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação (do inglês: Light

Amplification by Stimulated Emission of Radiation)

LLLT = Terapia *Laser* de Baixa Intensidade

mm = Milímetro

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

mW = MiliWatts

mW/cm² = MiliWatts por centímetro quadrado

MyoD: Fator miogênico de diferenciação-1 (do inglês: Myogenic Regulatory Factor 1)

nm = Nanômetro

P = Fósforo

PBS = Solução de Tampão Fosfato (do inglês: Phosphate Buffered Saline)

PCR – Reação em cadeia da polymerase (do inglês: Polymerase Chain Reaction)

pH = Potencial Hidrogeniônico

RNA = Ácido Ribonucléico

RNA_m - Ácido ribonucléico mensageiro

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

TA: Tibial anterior

T_m – Temperatura de *melting*

UA – Unidade arbitrária

VEGF = Fator de Crescimento Endotelial Vascular

≤ = Menor ou Igual

λ = Comprimento de Onda

μm = Micrômetro

μm² = Micrômetro Quadrado

% = Porcentagem

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Esquema ilustrativo do modelo de criolesão realizado no ventre do músculo TA esquerdo. (A) Tricotomia e incisão transversal; (B) Exposição do músculo TA; (C, D) Indução da criolesão; (E) Sutura após procedimento cirúrgico; (F) Bastão de ferro..... 13
- Figura 2:** Equipamento emissor da radiação *laser*..... 15
- Figura 3:** Esquema ilustrativo da divisão do músculo Tibial Anterior esquerdo..... 16
- Figura 4:** Esquema ilustrativo da análise morfométrica da área da lesão. (A) Captura de imagens de cortes histológicos transversais do músculo TA. (B) Mosaico da secção transversal do músculo TA, exemplificando a área total e a área lesada..... 18
- Figura 5:** Esquema ilustrativo da análise dos vasos sanguíneos. (A) Captura de imagens da área da lesão. (B) Fotomicrografia demonstrando os vasos sanguíneos presentes na área lesada..... 19
- Figure 6.** Músculos lesados depois de 7 dias de cirurgia. (A) grupo controle lesado, (B) animais irradiados com 10 J/cm^2 , (C) animais irradiados com 50 J/cm^2 . (*) Indicam tecido de granulação, área de necrose e infiltrado inflamatório; (seta) indicam fibras musculares. (Coloração: H.E., 20 X)..... 35

Figure 7. Músculos lesados depois de 14 dias de cirurgia. (A) grupo controle lesado, (B) animais irradiados com 10 J/cm², (C) animais irradiados com 50 J/cm². (*) Indicam tecido de granulação e infiltrado inflamatório; (seta) indicam fibras musculares. (Coloração: H.E., 20 X)..... 36

Figure 8. Músculos lesados depois de 21 dias de cirurgia. (A) grupo controle lesado, (B) animais irradiados com 10 J/cm², (C) animais irradiados com 50 J/cm². (*) Indicam núcleos. (seta) indicam fibras musculares. (Coloração: H.E., 20 X)..... 37

Figure 9. Média e desvios padrão da expressão do RNAm do gene COX-2. (GC) grupo controle lesado, (G10) animais irradiados com 10 J/cm², (G50) animais irradiados com 50 J/cm². * P<0,05 versus GC em 7, 14 e 21 dias..... 38

Figure 10. Média e desvios padrão da expressão do RNAm do gene VEGF. (GC) grupo controle lesado, (G10) animais irradiados com 10 J/cm², (G50) animais irradiados com 50 J/cm². * P<0,05 versus GC em 7, 14 e 21 dias; # P<0,05 versus G10 em 14 dias; † P<0,05 versus G10 em 21 dias..... 39

Figure 11. Média e desvios padrão da expressão do RNAm do gene MyoD. (GC) grupo controle lesado, (G10) animais irradiados com 10 J/cm², (G50) animais irradiados com 50 J/cm². * P<0,05 versus GC em 7, 14 e 21 dias; ≠ p<0,05 versus G10 em 7 dias e # p<0,05 versus G10 em 14 dias..... 40

Figure 12. Média e desvios padrão da expressão do RNAm do gene Miogenina. (GC) grupo controle lesado, (G10) animais irradiados com 10 J/cm², (G50) animais irradiados com 50 J/cm². * P<0,05 versus GC em 7 e 21 dias; ≠ P<0,05 versus G50 em 21 dias..... 41

Figura 13: Fotomicrografias da secção transversal dos músculos lesados depois de 7 dias de cirurgia. (GC) grupo controle lesado, (G10) animais irradiados com 10 J/cm², (G50) animais irradiados com 50 J/cm². (TG) Indicam tecido de granulação; (setas) Indicam fibras musculares jovens com núcleo centralizado; (CI) indicam células inflamatórias e degeneração miofibrilar. (Coloração: H.E., 10 X)..... 57

Figura 14: Fotomicrografias da secção transversal dos músculos lesados depois de 14 dias de cirurgia. (GC) grupo controle lesado, (G10) animais irradiados com 10 J/cm², (G50) animais irradiados com 50 J/cm². (TG) Indicam tecido de granulação; (setas) Indicam fibras musculares jovens com núcleo centralizado; (CI) indicam células inflamatórias. (Coloração: H.E., 10 X)..... 58

Figura 15: Fotomicrografias da secção transversal dos músculos lesados depois de 21 dias de cirurgia. (GC) grupo controle lesado, (G10) animais irradiados com 10 J/cm², (G50) animais irradiados com 50 J/cm². (setas) Indicam fibras musculares jovens com núcleos centralizados e diferentes diâmetros (Coloração: H.E., 10 X)..... 59

Figura 16: Fotomicrografias representativas da imunoexpressão da Miogenina após 7 dias. (A) grupo controle lesado (GC); (B) grupo lesado e irradiado com 10 J/cm² (G10); (C) grupo lesado e irradiado com 50 J/cm² (G50). Imunoexpressão da Miogenina (seta). (Imunohistoquímica, 40 X)..... 60

Figura 17: Fotomicrografias representativas da imunopressão da Miogenina após 14 dias. (A) grupo controle lesado (GC); (B) grupo lesado e irradiado com 10 J/cm² (G10); (C) grupo lesado e irradiado com 50 J/cm² (G50). Imunopressão da Miogenina (seta). (Imunohistoquímica, 40 X)..... 60

Figura 18: Fotomicrografias representativas da imunopressão da Miogenina após 21 dias. (A) grupo controle lesado (GC); (B) grupo lesado e irradiado com 10 J/cm² (G10); (C) grupo lesado e irradiado com 50 J/cm² (G50). Imunopressão da Miogenina (seta). (Coloração: Imunohistoquímica, 40 X)..... 61

Figura 19: Fotomicrografias representativas da imunopressão da MyoD após 7 dias. (A) grupo controle lesado (GC); (B) grupo lesado e irradiado com 10 J/cm² (G10); (C) grupo lesado e irradiado com 50 J/cm² (G50). Imunopressão da MyoD (seta). (Imunohistoquímica, 40 X)..... 62

Figura 20: Fotomicrografias representativas da imunopressão da MyoD após 14 dias. (A) grupo controle lesado (GC); (B) grupo lesado e irradiado com 10 J/cm² (G10); (C) grupo lesado e irradiado com 50 J/cm² (G50). Imunopressão da MyoD (seta). (Imunohistoquímica, 40 X)..... 62

Figura 21: Fotomicrografias representativas da imunopressão da MyoD após 21 dias. (A) grupo controle lesado (GC); (B) grupo lesado e irradiado com 10 J/cm² (G10); (C) grupo lesado e irradiado com 50 J/cm² (G50). Imunopressão da MyoD (seta). (Imunohistoquímica, 40 X)..... 63

Figure 22: Média e desvio padrão das áreas lesadas. GC: grupo controle lesado; G10: grupo lesado e tratado com 10 J/cm²; G50: grupo lesado e tratado com 50 J/cm². * p≤0.05 versus GC..... 64

Figure 23: Média e desvio padrão do número de vasos sanguíneos. GC: grupo controle lesado; G10: grupo lesado e tratado com 10 J/cm²; G50: grupo lesado e tratado com 50 J/cm². # p≤0.05 versus G10, @ p≤0.05 versus GC..... 65

Apresentação da tese

Essa tese foi estruturada na forma de artigos, sendo dividida em três partes e redigida de acordo com as normas metodológicas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

A primeira parte é constituída de uma contextualização, objetivo, materiais e métodos, com detalhamento da metodologia empregada.

A segunda parte compreende dois artigos que possuem como fundamentação a primeira parte acima descrita. O primeiro trabalho aborda os aspectos relacionados à terapia *laser* com a expressão de genes envolvidos na regeneração muscular, intitulado: “Terapia *laser* de baixa intensidade (LLLT) (660 nm) altera a expressão gênica durante a regeneração muscular em ratos”, Aceito para publicação no periódico “Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology” em janeiro de 2013. O segundo artigo aborda os efeitos da terapia *laser* de baixa intensidade na regeneração muscular de ratos, denominado: “Efeitos da terapia *laser* de baixa intensidade 660 nm no processo de regeneração muscular após criolesão”, Aceito para publicação no periódico “Journal of Rehabilitation Research and Development” em janeiro de 2013.

A terceira parte é composta das considerações finais, perspectivas futuras, referências bibliográficas utilizadas e anexos.

SUMÁRIO

PARTE I	3
1. CONTEXTUALIZAÇÃO	4
2. OBJETIVO	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
3.1. Animais de Experimentação	13
3.2. Criolesão	13
3.3. Delineamento Experimental	15
3.4. Tratamento com Terapia Laser de Baixa Intensidade	15
3.5. Coleta das Amostras	17
3.6. Eutanásia dos Animais.....	18
3.7. Análises.....	18
3.7.1. Análise Histológica	18
3.7.2. Morfometria da Área da Lesão	19
3.7.3. Número de Vasos Sanguíneos	20
3.7.4. Imunohistoquímica	21
3.7.5. Análise de Expressão Gênica através do PCR (Polimerase Chain Reaction) em Tempo Real	22
3.8. Análise Estatística.....	24
PARTE II	25
4. ESTUDO I	26
4.1. INTRODUÇÃO	28
4.2. MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.2.1. Animais e Desenho Experimental.....	31
4.2.2. Criolesão	31
4.2.3. Protocolo de Tratamento.....	32
4.2.4. Análise Histológica	32
4.2.5. Análise de Expressão Gênica.....	33
4.2.6. Análise Estatística	34
4.3. RESULTADOS	35
4.3.1. Análise histopatológicas	35
4.3.2. Análise da expressão gênica	38
4.4. DISCUSSÃO	42
4.5. CONCLUSÃO	46
5. ESTUDO II.....	48
5.1. INTRODUÇÃO	50
5.2. MATERIAIS E MÉTODOS	52
5.2.1. Delineamento Experimental.....	52
5.2.2. Criolesão	52
5.2.3. Protocolo de Tratamento	53
5.2.4. Análise Histológica	53
5.2.5. Morfometria da Área Lesada	54
5.2.6. Número de Vasos Sanguíneos	54
5.2.7. Imunohistoquímica	55
5.2.8. Análise Estatística	56
5.3. RESULTADOS	57
5.3.1. Análises Histológicas	57
5.3.2. Imunohistoquímica	59
5.3.3. Morfometria da Área Lesada	64
5.3.4. Número de Vasos Sanguíneos	65
5.4. DISCUSSÃO	66

5.5. CONCLUSÃO.....	69
PARTE III.....	70
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	71
7. PERSPECTIVAS FUTURAS	72
8. REFERÊNCIAS	73
9. ANEXOS.....	89

PARTE I

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

2. OBJETIVO

3. MATERIAIS E MÉTODOS

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

As lesões do sistema músculo esquelético são decorrentes de vários mecanismos, como lesão mecânica, distrofias musculares e doenças infecciosas (TOUMI e BEST, 2003). As mais comuns são as lesões relacionadas às atividades esportivas, cerca de 10% - 55%, das quais 90 % são causadas por contusões ou estiramentos (JARVINEN *et al.*, 2005; JARVINEN *et al.*, 2007; TURNER e BADYLAK, 2012). A contusão muscular é causada por trauma direto na região muscular, geralmente decorrente de esportes onde ocorre contato direto com outros atletas, e assim, este impacto no músculo acarreta a lesão vascular, resultando em lesão das fibras musculares através do hematoma formado (MACKEY *et al.*, 2012). Já o estiramento induz a ruptura das fibras musculares e do tecido conectivo, ocorrendo principalmente na interface entre as fibras musculares e a aponeurose e entre a junção miotendínea (JARVINEN *et al.*, 2007; MACKEY *et al.*, 2012).

Independente do tipo de lesão muscular o processo de regeneração é ativado imediatamente após a lesão. Vários autores descreveram que este processo envolve uma sequência de respostas celulares compondo três fases: a fase de destruição ou inflamação, a fase de reparo ou regeneração e a fase de remodelamento ou fibrose (HUARD *et al.*, 2002; TOUMI e BEST *et al.*, 2003; BEDAIR *et al.*, 2004; JARVINEN *et al.*, 2005; TIDBALL, 2005; JARVINEN, 2007; LAGROTA-CANDIDO *et al.*, 2010; TURNER e BADYLAK *et al.*, 2012).

Na fase de destruição ou fase inflamatória ocorre a ruptura e necrose das fibras musculares, além da formação de hematoma e a chegada das células inflamatórias, como neutrófilos e macrófagos, responsáveis pela fagocitose do tecido necrosado e pela síntese de citocinas (IL-1, IL-6, IL-8) e fatores de crescimento (IGF-1, HGF, EGF) (HUARD *et al.*, 2002; LAGROTA-CANDIDO *et al.*, 2010). A liberação das citocinas e dos fatores de

crescimento aumentam a resposta inflamatória e recrutam células satélites para o local da lesão (TURNER e BADYLAK *et al.*, 2012).

Na fase de reparo e na fase de remodelamento, as células satélites proliferam e se diferenciam em mioblastos para formar miofibras multinucleadas, substituindo as fibras lesadas (JARVINEN *et al.*, 2005; JARVINEN *et al.*, 2007). Estas fases também são marcadas pela angiogênese (formação de novos vasos sanguíneos), processo regulado pelo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (BEDAIR *et al.*, 2002; BRYAN *et al.*, 2008). Uma vascularização adequada na área lesada é um pré-requisito para a recuperação morfológica e funcional da fibra muscular (HUARD *et al.*, 2002; JARVINEN *et al.*, 2005; MOYER e WAGNER, 2011).

As células satélites ou células precursoras miogênicas, se localizam entre o sarcolema e a lâmina basal das fibras musculares (SABOURIN e RUDNICK, 2000; JARVINEN *et al.*, 2007). Após sua ativação, durante a regeneração muscular, ocorre a regulação da sua função através dos fatores de crescimento e também dos fatores regulatórios miogênicos (MRFs) (MyoD, Myf5, Mrf4 e Miogenina), Os MRFs são divididos em dois grupos: o primeiro constituído pelo MyoD e o Myf5 com a função de ativar a transformação das células precursoras em mioblastos seguido da sua proliferação; e o segundo grupo constituído do MRF4 e a Miogenina, responsáveis pela diferenciação celular dos mioblastos para formar as novas fibras musculares (SABOURIN e RUDNICK, 2000; CHARGE e RUDNICK, 2004; VATANSEVER *et al.*, 2012).

Apesar da capacidade regenerativa do músculo esquelético, o tempo de recuperação pode variar dependendo da intensidade da lesão, podendo causar a formação de fibrose, prejudicando a regeneração muscular (MINAMOTO *et al.*, 2001; HUARD *et al.*, 2002; BEDAIR *et al.*, 2002; RENNO *et al.*, 2011; YUSUF e BRAND-SABERI, 2012). Por isso, várias modalidades terapêuticas tem sido utilizadas, principalmente na área de reabilitação

esportiva, com o intuito de acelerar a regeneração muscular e possibilitar o retorno do atleta aos treinos e competições, prevenindo novas lesões (BEST, 2002; LEAL JUNIOR *et al.*, 2008; GHARAIBEH *et al.*, 2012). Dentre as modalidades, pode-se citar: mobilização (FARIA *et al.*, 2008) e imobilização (ARONEN *et al.*, 2006), crioterapia (BLEAKLEY *et al.*, 2004), drogas anti-inflamatórias não esteroidais (NSAIDs) (O'GRADY *et al.*, 2000), ultrassom terapêutico (WILKIN *et al.*, 2004) e terapia *laser* de baixa intensidade (LLLT) (ALMEIDA *et al.*, 2011).

Desenvolvido desde 1960, a LLLT é uma modalidade terapêutica com propriedades fotoquímicas e fotobiológicas que tem demonstrado resultados positivos em estudos *in vitro*, em modelos animais e em tratamentos clínicos (DEMIDOVA-RICE *et al.*, 2007; BAPTISTA *et al.*, 2009; ASSIS *et al.*, 2012), através de sua capacidade de estimular a regeneração tecidual, modular o processo inflamatório e induzir analgesia (GAVISH *et al.*, 2006; PELOW *et al.*, 2010; ALMEIDA *et al.*, 2011).

Além disso, vários estudos investigaram os efeitos da LLLT durante a regeneração muscular em diversos modelos experimentais (BIBIKOVA e ORON, 1994; AMARAL *et al.*, 2001; CRESSONI *et al.*, 2008; RENNO *et al.*, 2011; SILVEIRA *et al.*, 2012). Em cultura de células, Shefer *et al.* (2008) encontram que a irradiação *laser* estimulou a fusão de mioblastos. Em animais, estudos mostraram que a LLLT no músculo esquelético foi capaz de aumentar a neovascularização (BIBIKOVA *et al.*, 1994; SOUZA *et al.*, 2011), acelerar a regeneração do tecido muscular (BIBIKOVA e ORON, 1995), aumentar o diâmetro da fibra muscular (AMARAL *et al.*, 2001), estimular a proliferação de células satélites (BEN-DOV *et al.*, 1999), aumentar a síntese de mioblastos (SHEFER *et al.*, 2003) e reduzir a resposta inflamatória (RIZZI *et al.*, 2006; CRESSONI *et al.*, 2008; MESQUITA-FERRARI *et al.*, 2010; RENNO *et al.*, 2011). Em humanos, os poucos estudos realizados verificaram a ação da LLLT antes de exercício intenso com o intuito de prevenir lesões (BARONI *et al.*, 2010;

LEAL JUNIOR *et al.*, 2009) e melhorar a recuperação muscular após exercício (LEAL JUNIOR *et al.*, 2008).

Apesar da grande quantidade de estudos explorando os efeitos da LLLT durante a regeneração muscular, existe uma divergência entre os parâmetros dos *lasers* utilizados, dificultando a seleção do melhor protocolo de tratamento (entre fluência, comprimento de onda, energia total, tempo de irradiação e sessões de tratamento) para ser utilizado na clínica, como também, dificultando a reprodução das metodologias e a comparação dos resultados encontrados (Tabela 1).

Assim, ainda existe a necessidade de determinar os mecanismos moleculares ativados pela luz laser que determinam a resposta celular miogênica. Alguns autores vêm analisando os efeitos da LLLT durante a regeneração muscular, através do VEGF (DOURADO *et al.*, 2011; DIAS *et al.*, 2012; ASSIS *et al.*, 2012; VATANSEVER *et al.*, 2012), da ciclooxigenase-2 (COX-2) (RENNO *et al.*, 2011; ALMEIDA *et al.*, 2011), do fator de necrose tumoral - α (TNF- α) (SHEFER *et al.*, 2001; MESQUITA-FERRARI *et al.*, 2010), do fator de crescimento transformador - β (TGF- β) (MESQUITA-FERRARI *et al.*, 2010; LUO *et al.*, 2012; ASSIS, 2012), das MRFs (SILVA *et al.*, 2012; ASSIS *et al.*, 2012; VATANSEVER *et al.*, 2012) e da atividade mitocondrial (AMARAL *et al.*, 2001; DIAS *et al.*, 2008; IYOMASA *et al.*, 2009) na tentativa de desvendar esses mecanismos. Entretanto, grande parte dos estudos utilizaram períodos relativamente curtos (menores que 21 dias), não permitindo a avaliação completa do processo de regeneração muscular, assim como, não permitindo confirmar se essas respostas moleculares ativadas pela LLLT estão relacionadas a uma regeneração muscular acelerada.

Diante do exposto, nota-se que a LLLT demonstra ser uma modalidade terapêutica eficiente no tratamento de lesão muscular. Com isso, foi hipotetizado que a LLLT (660 nm) é capaz de acelerar o processo de regeneração muscular através da modulação do processo

inflamatório, bem como estimular a expressão do fator de crescimento endotelial vascular e dos fatores regulatórios miogênicos.

Tabela 1. Estudos e parâmetros do LLLT utilizados.

Autor	Ano	Tipo de lesão	Modelo Experimental	Parâmetros (Informado pelos autores)	Sessões
WEISS e ORON	1992	Indução cirúrgica	Gastrocnêmio	HeNe (632.8 nm); 6 mW; 2.3 min;	5 sessões 3, 8 e 11 dias
BIBIKOVA e ORON	1993	Criolesão	Gastrocnêmio	HeNe (632.8 nm); 6 mW; 2.3 min; 31.2 J/cm ²	5 sessões 9, 14 e 30 dias
BIBIKOVA e ORON	1994	Criolesão	Gastrocnêmio	HeNe (632.8 nm); 6 mW; 2.3 min; 31.2 J/cm ²	4 sessões (48, 72, 96 e 120 hs PO) 2, 9 e 14 dias
BIBIKOVA e ORON	1995	Criolesão	Gastrocnêmio	HeNe (632.8 nm); 6 mW; 2.3 min; 31.2 J/cm ²	7 sessões 14 dias
MORRONE et al.	1998	Compressão	Isquiotibiais	GaAlAs (780 nm); 2500 mW; (150, 250, 800 J/cm ²); (50, 100, 0 Hz)	5 e 10 sessões 9 e 14 dias
AMARAL et al.	2001	Miotoxina	Tibial Anterior	HeNe (632.8 nm); 2.6 mW; 0.007 cm ² ; (2.6 J/cm ² , 8.4 J/cm ² , 25 J/cm ²); (7, 22, 67 seg)	5 sessões, 5 dias
DOURADO et al.	2003	Veneno de Cobra	Gastrocnêmio	GaAs (904 nm); 0.0176 cm ² ; 62 seg; 0.04J; 4 J/cm ²	1, 5 e 8 sessões durante 24 horas PO
LOPES-MARTINS et al.	2006	Estímulo Elétrico	Tibial Anterior	GaAlAs (655 nm); 2.5 mW; (0.5, 1, 2.5 J/cm ²); (32, 80, 160 seg); (0.08, 0.2, 0.4 J); 0.08 cm ²	1 sessão
RIZZI et al.	2006	Trauma	Gastrocnêmio	GaAs (904 nm); 45 mW; 0.7 cm ² ; 35 seg; 5 J/cm ²	12h PO (1 sessão); 7 dias PO (7 sessões); 14 dias PO (14 sessões)
LUZ et al.	2007	Trauma	Gastrocnêmio	AsGaAl (785 nm); 10 J/cm ²	4 sessões 7 dias
CRESSONI et al.	2008	Indução cirúrgica	Tibial Anterior	AsGaAl (785 nm); 75 mW; 0.9 J; 1071 mW/cm ² ; 0.3 cm ² ; 12 seg	1, 2, 4 sessões 9 dias
DIAS et al.	2008	Desordem temporomandibular	Masseter	GaAlAs (780 nm); 5 mW; (0.5, 1, 2.5, 5, 20 J/cm ²); (4, 8, 20, 40, 160 seg); (0.02, 0.04, 0.1, 0.2, 0.8 J); 0.04 cm ²	10 sessões 21 dias

BARBOSA <i>et al.</i>	2009	Veneno de Cobra	Gastrocnêmio	GaAs (685 nm); 29 seg; 4.2 J/cm ² ; 29 mW; 0.2 cm ²	2 sessões (0, 1 h PO) 4 sessões (0, 1, 3, 12 hs PO) 24 hs
SILVEIRA <i>et al.</i>	2009	Trauma	Gastrocnêmio	GaAs (904 nm); 15-30 mW; 5 J/cm ²	7 sessões (2, 12, 24, 48, 72, 96, 120 hs PO) 5 dias
IYOMASA <i>et al.</i>	2009	Trauma	Tibial Anterior	HeNe (633 nm); 5 e 10 J/cm ²	7 sessões 8 dias
LIU <i>et al.</i>	2009	Exercício Excêntrico	Gastrocnêmio	HeNe (632.8 nm); (12, 28, 43 J/cm ²); (4, 9, 14 mW); 10 seg	3 sessões (0, 18, 24 hs)
BAPTISTA <i>et al.</i>	2009	Criolesão	Tibial Anterior	GaAlAs (660 nm); 20 mW; 5 J/cm ² ; 10 seg; 0.04 cm ² ; 500 mW/cm ²	3, 6, 10 sessões 1, 7, 14, 21, dias
MESQUITA-FERRARI <i>et al.</i>	2010	Criolesão	Tibial Anterior	AlGaInP (660 nm); 20 mW; 5 J/cm ² ; 10 seg; 0.04 cm ² ; 500 mW/cm ² ; 8 pontos	3, 6 sessões 7, 14 dias
LEAL-JUNIOR <i>et al.</i>	2010	Estímulo Elétrico	Tibial Anterior	GaAs (904 nm); 15 mW; 0.2 cm ² ; 75 mW/cm ² ; (7, 20, 67, 200 seg); (0.1, 0.3, 1, 3 J)	1 sessão
Hayworth <i>et al.</i>	2010	-	Temporal	GaAlAs (660 nm); (12, 25, 40 mW); (10.8, 21.6, 32.4 J/cm ²); (20, 40, 60 seg)	1 sessão
Lakyova <i>et al.</i>	2010	Isquemia	Gracil	AlGaInP (670 nm); 1 J/cm ² ; 40 mW/cm ² ; 0.4 cm ²	4 sessões/ dia (2.5, 4, 5.5, 7 hs PO) 12 hs, 1, 2, 3, 5, 6, 10, 14 dias
Nakano <i>et al.</i>	2010	Atrofia	Gastrocnêmio	GaAlAs (830 nm); 60 mW; 0.6 J/cm ² – 3 seg – 60 aplicações; total 180 seg; 0.3 cm ²	2 sessões 14 dias
Servetto <i>et al.</i>	2010	Miopatia	Isquiotibiais	HeNe (632.8 nm); 5 mW; 1 min; GaAs (904 nm); 12 mW; 47 seg; 9.5 J/cm ²	1 sessão
Barbosa <i>et al.</i>	2010	Veneno de Cobra	Gastrocnêmio	(685 nm); 29 mW; 4.2 J/cm ² ; 29 seg; 0.2 cm ²	3 sessões 1, 3, 12 hs
Renno <i>et al.</i>	2011	Criolesao	Tibial Anterior	GaAlAs (830 nm); 47 seg; 30 mW; 0.0028 cm ² ; 50 J/cm ²	6 sessões 13 dias

Dourado <i>et al.</i>	2011	Veneno de Cobra	Gastrocnêmio	HeNe (632.8 nm); 10 mW; 120 seg; 0.07 cm ² ; 4 J/cm ² ; 1.2 J GaAs (904 nm); 35 mW; 18 seg; 4 J/cm ² ; 0.16 cm ² ; 0.04 J	1,2,4,18,22 sessões 3, 12, 24 hs 3, 7, 21 dias
Souza <i>et al.</i>	2011	Criolesao	Tibial Anterior	InGaAlP (660 nm); 20 mW; 10 seg; 0.04 cm ² ; 5 J/cm ² ; 0.2 J; 0.5 mW/cm ²	1, 3, 6, 9 sessões 1, 7, 14, 21 dias
Silva <i>et al.</i>	2011	Crotoxina	Tibial Anterior	GaAs (904 nm); 5 mW; 1.5 J (5 seg); 3 J (10 seg)	5 sessões 8 dias
Almeida <i>et al.</i>	2011	Estímulo Elétrico	Tibial Anterior	GaAs (904 nm); 15 mW; 18 seg; 0.2 cm ² ; 0.1 J – 7 seg; 0.3 J – 20 seg; 1 J – 67 seg; 3 J – 200 seg	1 sessão
Ramos <i>et al.</i>	2012	Trauma	Tibial Anterior	810 nm; 0.028 cm ² ; 100 mW; 35.71 J/cm ² – 1 J; 107.14 J/cm ² – 3 J; 214.29 J/cm ² – 6 J; 321.48 J/cm ² – 9 J	1 sessão
Luo <i>et al.</i>	2012	Trauma	Tibial Anterior	GaAlAs (635 nm); 0.4 cm ² ; 7 mW; 20 seg; 17.5 mW/cm ² ; 21 J/cm ²	10 sessões 0, 1, 2, 3, 7, 14, 21, 28 dias
Assis <i>et al.</i>	2012	Criolesao	Tibial Anterior	AlGaAs (808 nm); 30 mW; 180 J/cm ² ; 1.4 J; 47 seg; 0.00785 cm ²	4 sessões
Silveira <i>et al.</i>	2012	Trauma	Gastrocnêmio	GaAs (904 nm); 400 mW/cm ² ; 18 seg; 0.1 cm ² ; 0.5 J; 12.5 seg; 5 J/cm ²	7 sessões 2, 12, 24, 48, 72, 96, 120 hs
Fernandes <i>et al.</i>	2012	Criolesao	Tibial Anterior	AlGaInP (660 nm); 20 mW; 5 J/cm ² ; 10 seg; 0.04 cm ² ; 500 mW/cm ² ; 8 pontos	3, 6, 9 sessões 1, 7, 14 dias
Vatansever <i>et al.</i>	2012	Criolesao	Tibial Anterior	830 nm; 0.87 J; 29 seg; 30 mW; 0.0028 cm ² ; 30 J/cm ²	5 sessões 7 dias

2. OBJETIVO

Este estudo teve como objetivo analisar os efeitos da LLLT, com comprimento de onda (λ) de 660 nm e com as fluências de 10 J/cm² e 50 J/cm², na regeneração do músculo tibial anterior de ratos durante 7, 14 e 21 dias após indução da criolesão.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- ESTUDO 1: Analisar os efeitos da LLLT (comparando duas fluências diferentes), durante a regeneração muscular através dos aspectos morfológicos e da expressão gênica.
- ESTUDO 2: Avaliar a influência temporal da terapia laser (comparando duas fluências diferentes), no processo inflamatório, tecido de granulação, estrutura tecidual, número de vasos sanguíneos e presença de imunomarcadores durante a regeneração do músculo tibial anterior (TA).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) (Parecer 068/2009) (Anexo A).

3.1. Animais de Experimentação

Foram utilizados 63 ratos machos (*Rattus norvegicus: var. albinus, Rodentia, Mammalia*), da linhagem *Wistar*, com três meses de idade e peso corporal médio de 300 gramas.

Os animais provenientes do Biotério Central da UFSCar foram mantidos no Biotério do Departamento de Fisioterapia da mesma instituição, durante todo o procedimento experimental. Os animais permaneceram individualmente em gaiolas apropriadas de polietileno padrão, em condições ambientais controladas (ciclo claro/escuro de 12/12 horas, temperatura controlada de 19 – 23°C e ambiente higienizado), recebendo ração comercial (Primor rações) e água a vontade. Todos os animais foram manipulados e o procedimento cirúrgico foi estritamente conduzido de acordo com o Guia de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório.

3.2. Criolesão

O procedimento cirúrgico foi realizado no Laboratório de Eletrotermofototerapia da UFSCar.

Os ratos foram previamente pesados e submetidos a anestesia com uma solução de Ketamina/Xilazina (80/10 mg/Kg) proporcional a massa corporal. Após anestesia, as peles

que recobrem os músculos Tibial Anterior (TA) direito e esquerdo foram tricotomizadas e higienizadas. Posteriormente, uma incisão transversal (aproximadamente 1 cm) foi realizada em cada uma dessas regiões, efetuando o afastamento da fáscia nas regiões correspondentes aos ventres musculares. A criolesão foi induzida através de um bastão de ferro com área de 5x5 mm², previamente imerso em nitrogênio líquido e pressionado perpendicularmente contra a porção central do ventre muscular por 10 segundos. Este procedimento foi repetido 2 vezes consecutivas, com intervalo de 30 segundos e em seguida a pele de cada região foi suturada (Fio Náilon 3-0 - Shalon[®]) e limpa com álcool iodado (Figura 1).

A técnica cirúrgica utilizada baseou-se nos trabalhos de Bibikova *et al.* (1994), Baptista *et al.* (2009) e Miyabara *et al.* (2006).

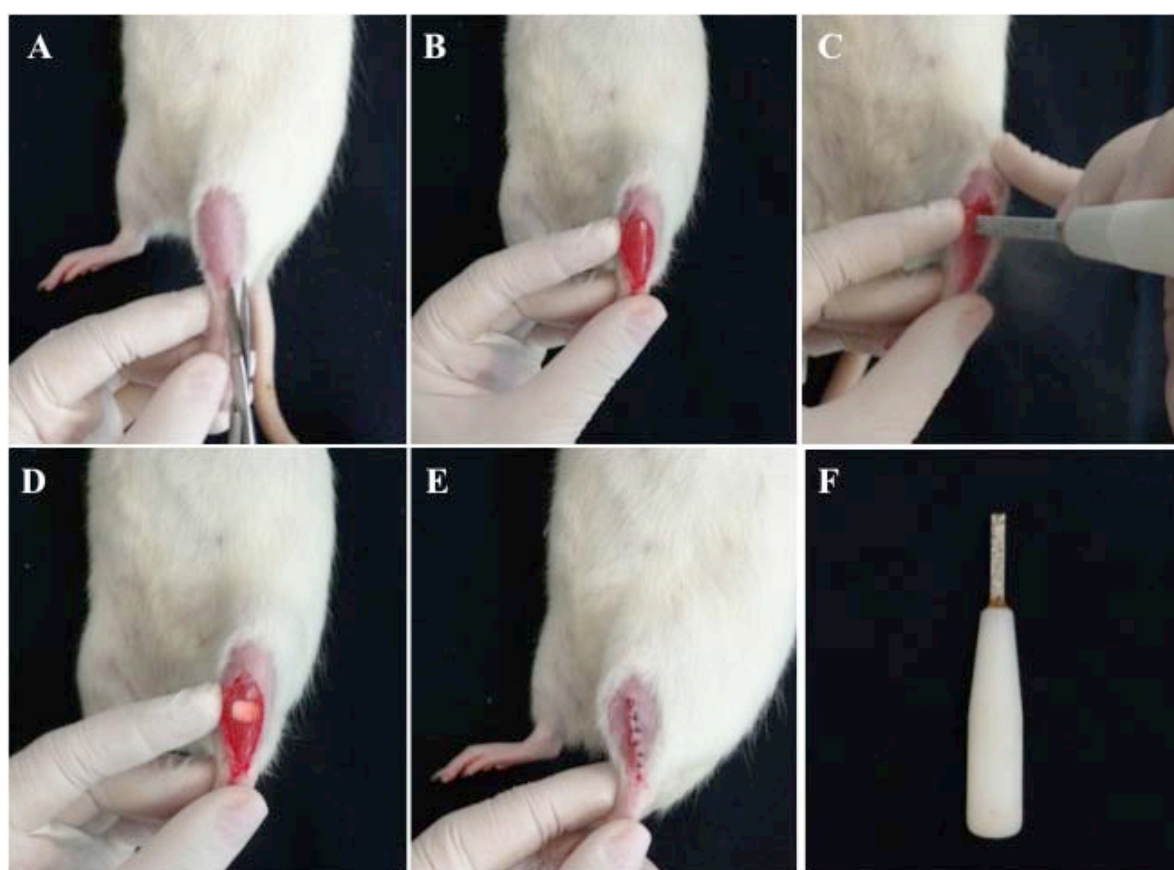


Figura 1: Esquema ilustrativo do modelo de criolesão realizado no ventre do músculo TA esquerdo. (A) Tricotomia e incisão transversal; (B) Exposição do músculo TA; (C, D) Indução da criolesão; (E) Sutura após procedimento cirúrgico; (F) Bastão de ferro.

3.3. Delineamento Experimental

Os 63 ratos foram distribuídos aleatoriamente nos seguintes grupos (com 21 animais cada):

- **Grupo controle lesado (GC):** animais submetidos a criolesão sem tratamento.
- **Grupo laser 10 J/cm² (G10):** animais submetidos a criolesão e tratados com fluência de 10 J/cm², durante 20 segundos.
- **Grupo laser 50 J/cm² (G50):** animais submetidos a criolesão e tratados com fluência de 50 J/cm², durante 50 segundos.

Cada grupo foi dividido em três subgrupos (com 7 animais cada), resultando em três períodos experimentais, com animais submetidos a eutanásia ao 7^o, 14^o e 21^o dia após a criolesão.

3.4. Tratamento com Terapia *Laser* de Baixa Intensidade

O equipamento emissor da radiação *laser* utilizado foi um modelo portátil (MMOptics, São Carlos Equipamento, SP, Brazil) (Figura 2), classe 3B, diodo com meio ativo composto por fosfeto de índio-gálio-alumínio (InGaAlP), comprimento de onda (λ) de 660 nm, emissão contínua, área do feixe de 0,04 cm², utilizado com duas fluências: 10 J/cm² (potência de saída de 20 mW, densidade de potência de 0,5 W/cm², 20 segundos de irradiação, energia total por ponto de 0.4 J) e 50 J/cm² (potência de saída de 40 mW, densidade de potência de 1 W/cm², 50 segundos de irradiação, energia total por ponto de 2 J). A escolha da dosimetria empregada baseou-se em resultados positivos de estudos prévios (IYOMASA *et al.*; RENNO *et al.*, 2011). Este aparelho foi fornecido pelo laboratório de Eletrotermofototerapia, do Departamento de Fisioterapia da UFSCar.

O equipamento foi previamente calibrado no Laboratório de Biofotônica do Grupo de Óptica do Instituto de Física de São Carlos (IFSC), Universidade de São Paulo (USP), com o objetivo de se obter alta confiabilidade na intensidade efetiva da emissão do laser.

Os protocolos de tratamentos se iniciaram 48 horas após a indução da lesão muscular e foram realizados 5 vezes por semana (a cada 24 horas) (SILVA *et al.*, 2011), seguidos de um intervalo de 48 horas. Assim, os grupos eutanasiados após 7 dias receberam 5 sessões de tratamento, os grupos eutanasiados após 14 dias receberam 10 sessões de tratamento e os grupos eutanasiados após 21 dias receberam 15 sessões de tratamento. O *laser* foi aplicado em um único ponto sobre a região da lesão muscular (no ventre do músculo), com uso da técnica pontual em contato, na qual a caneta do equipamento foi posicionada perpendicularmente à superfície da pele que recobre o músculo TA (BAXTER, 1997).



Figura 2: Equipamento emissor da radiação *laser*.

3.5. Coleta das Amostras

Os músculos TA direito e esquerdo foram retirados com os ratos anestesiados com uma solução de Ketamina/Xilazina (80/10 mg/Kg) proporcional a massa corporal. O esquerdo foi dividido em 2 partes (Figura 3), onde uma metade foi utilizada para realizar análises histológicas e imunohistoquímica através de cortes transversais, e a outra metade foi utilizada para a análise de expressão gênica. Enquanto que o direito foi usado apenas para análise histológica através de cortes longitudinais.

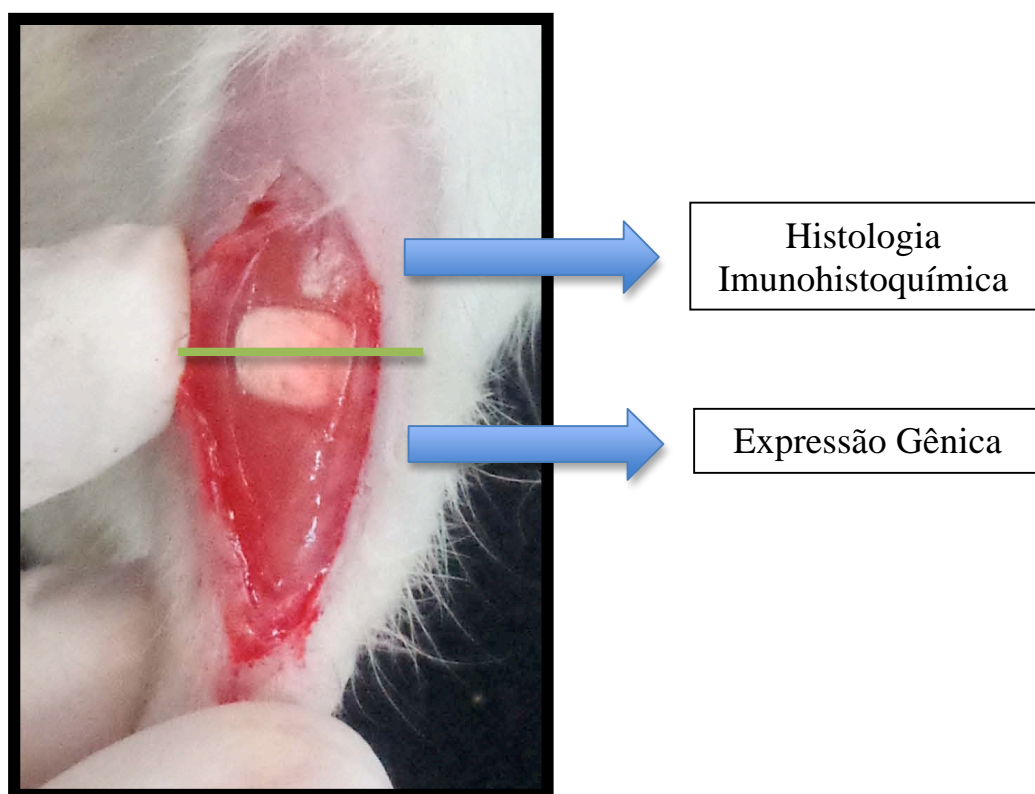


Figura 3: Esquema ilustrativo da divisão do músculo Tibial Anterior esquerdo.

3.6. Eutanásia dos Animais

Os animais foram eutanasiados com uma dose letal de anestésico (Ketamina/Xilazina) injetado por via intraperitoneal (BOSSINI *et al.*, 2009) ao 7^o, 14^o e 21^o dia após a realização da criolesão.

3.7. Análises

3.7.1. Análise Histológica

Para a realização da análise histológica, os músculos TA direito e a metade superior esquerda foram fixadas em formalina a 10% (Merck, Darmstadt, Germany) durante 2 dias, e em seguida, incluídos em blocos de parafina. Dos blocos de parafina foram obtidos cortes seriados com espessura de 5 µm montados em lâminas histológicas, e corados com hematoxilina e eosina (HE, Merck). Os músculos TA direitos foram cortados longitudinalmente, permitindo a visualização da organização estrutural das fibras musculares formadas (BIBIKOVA *et al.*, 1994; CRESSONI *et al.*, 2008; BARBOSA *et al.*, 2009; 2010). A metade superior dos músculos TA esquerdos foi cortada transversalmente, permitindo realizar a morfometria das áreas lesadas (ASSIS *et al.*, 2012) e a contagem de vasos sanguíneos no local da lesão (STRAFACE *et al.*, 2009; VATANSEVER *et al.*, 2012).

A análise qualitativa da região da lesão muscular foi realizada através de um microscópio de luz (Leica Microsystems AG, Wetzlar, Germany) e foram verificadas as seguintes alterações no local da lesão: presença do processo inflamatório, tecido de granulação, degeneração das fibras musculares focal ou difusa, presença de fibras musculares com núcleo centralizado (fibras novas regenerando) e estrutura tecidual (RENNO *et al.* 2011).

3.7.2. Morfometria da Área da Lesão

As morfometrias da área da lesão muscular foram realizadas nos cortes histológicos transversais da região central do músculo lesado para verificar a área lesada e não lesada, usando o software (Axiovision 3.0.6 SP4, Carl Zeiss, Jena, Germany). Para isso, imagens retiradas com a objetiva de 20X foram utilizadas para reconstruir a área de secção transversal total do músculo TA, permitindo identificar e medir as áreas não lesadas e lesadas. Uma avaliação duplo-cega foi executada para realizar as medidas (Figura 4) (ASSIS *et al.*, 2012).

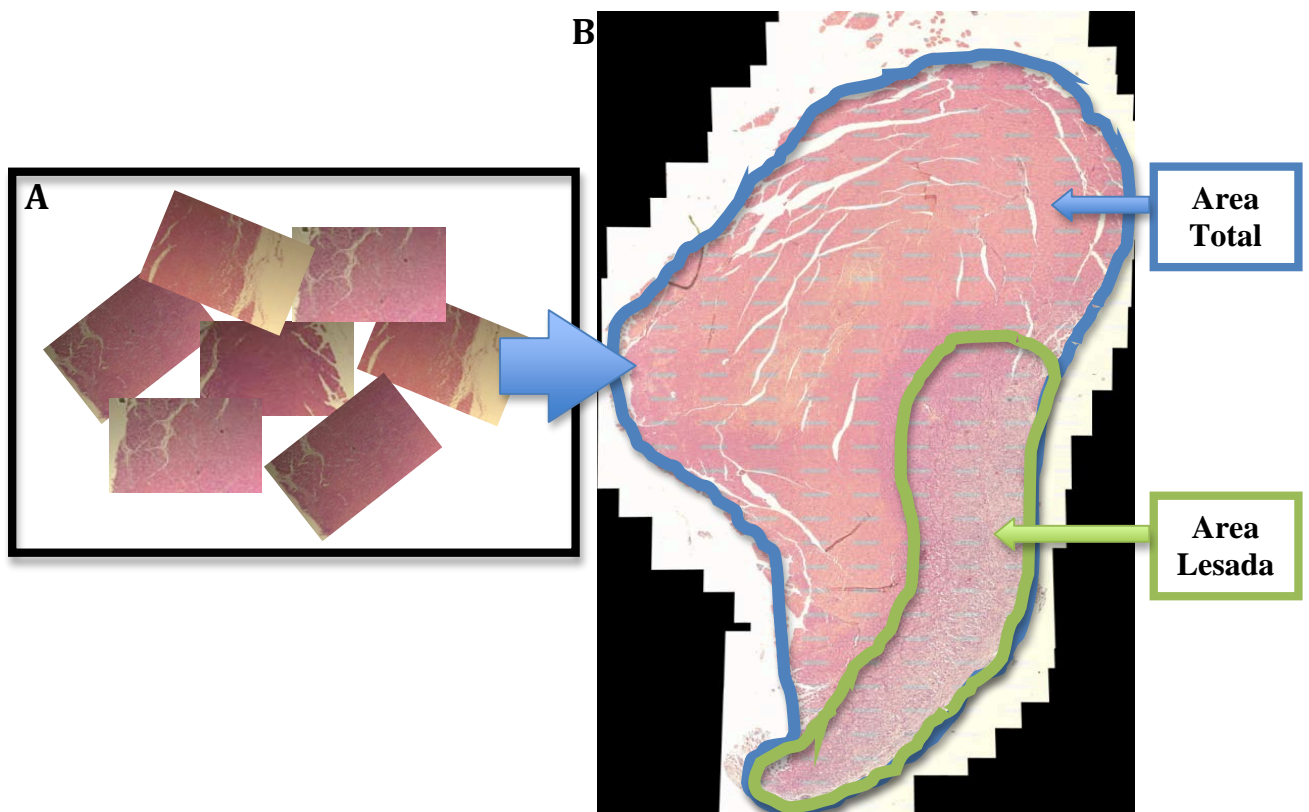


Figura 4: Esquema ilustrativo da análise morfométrica da área da lesão. (A) Captura de imagens de cortes histológicos transversais do músculo TA. (B) Mosaico da secção transversal do músculo TA, exemplificando a área total e a área lesada.

3.7.3. Número de Vasos Sanguíneos

Para determinar o número de vasos sanguíneos, 5 campos diferentes da área lesada de cada músculo TA foram obtidos através de um microscópio de luz (Olympus, Optical Co. Ltd, Tokyo, Japan) com uma objetiva de 40X. O número de vasos sanguíneos de cada campo foram contados através do software (Axiovision 3.0.6 SP4, Carl Zeiss, Jena, Germany) e então a média do número de vasos sanguíneos por animal e por grupo foi calculada (Figura 5) (STRAFACE *et al.*, 2009; VATANSEVER *et al.*, 2012).

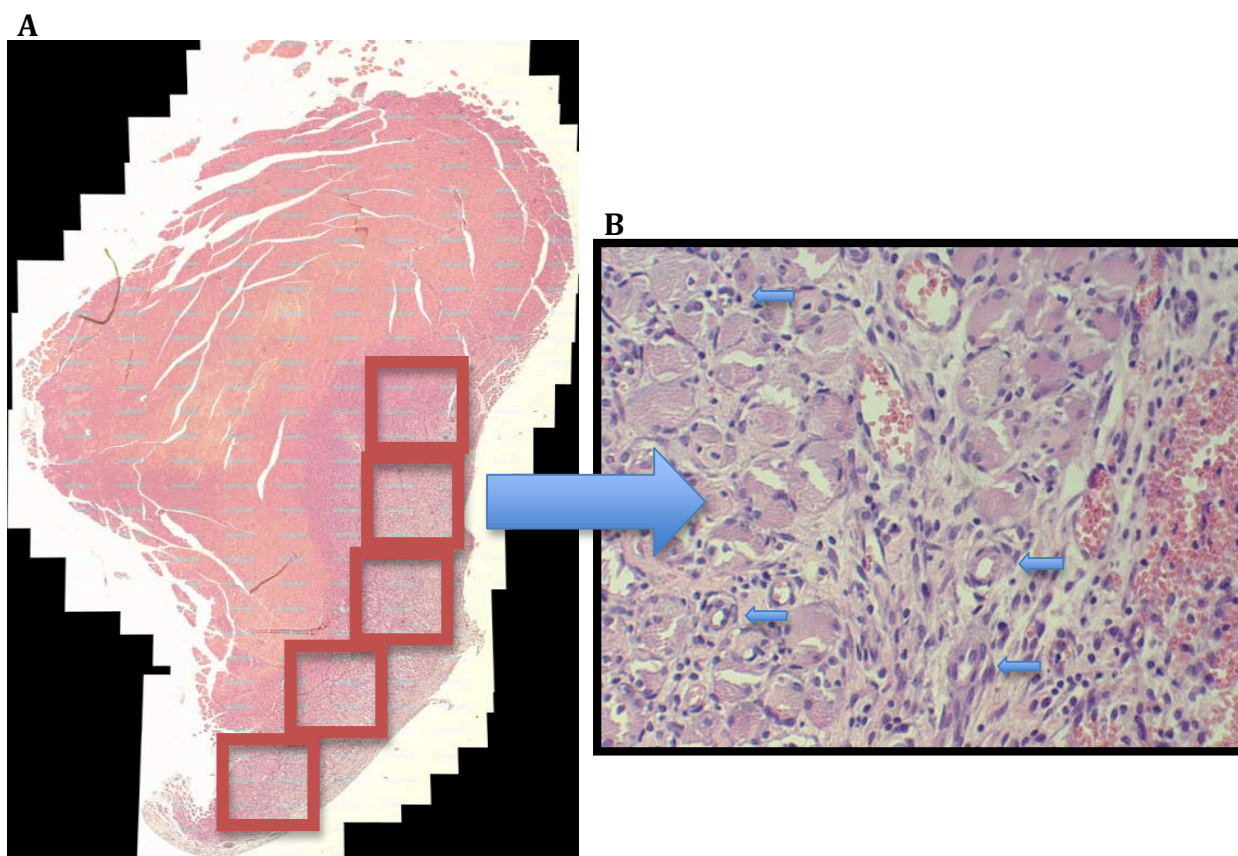


Figura 5: Esquema ilustrativo da análise dos vasos sanguíneos. (A) Captura de imagens da área da lesão. (B) Fotomicrografia demonstrando os vasos sanguíneos presentes na área lesada.

3.7.4. Imunohistoquímica

Para a realização da imunohistoquímica, foram confeccionadas lâminas histológicas com cortes seriados de 5 µm de espessura. As lâminas foram imersas em solução de tampão citrato a 0,01M (pH 6,0) em microondas (850 W - Brastemp, SP, Brazil) por três ciclos de cinco minutos cada para recuperação antigênica. O material foi pré-incubado com peróxido de hidrogênio a 0,3% em solução de tampão fosfato (PBS) por cinco minutos para inativação da peroxidase endógena e, na sequência, bloqueado em soro fetal bovino a 5%, diluído em solução de PBS por dez minutos. As amostras foram incubadas com anti-MyoD e anti-Miogenina, anticorpos primários policlonais (Santa Cruz Biotechnology, USA), na concentração de 1:400. A incubação foi realizada em refrigerador (4°C) por um período de 12 horas, seguida de dois banhos em solução de PBS, com duração de cinco minutos cada.

A seguir, os cortes foram incubados com biotina conjugada ao anticorpo secundário anti-IgG (imunoglobulina G) de coelho (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) na concentração de 1:200 em PBS por uma hora. Na sequência, os cortes foram lavados duas vezes com PBS, seguido por aplicação de complexo pré-formado de avidina-biotina-peroxidase (Vector Laboratories) por 45 minutos. Os complexos foram visualizados por meio da aplicação de solução de 3,3 diaminobenzidina a 0,05% e contra corados com Hematoxilina de Harris. Como controle dos anticorpos, alguns cortes histológicos foram submetidos ao anticorpo de coelho IgG (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) na concentração de 1:200, omitindo-se os anticorpos primários, estes cortes serviram como controle negativo das reações. Além disso, foram realizados controles positivos internos em cada bateria da reação realizada.

A avaliação imunohistoquímica foi realizada no Laboratório Multidisciplinar do Departamento de Biociências da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), por um

patologista experiente, Prof. Dr. Daniel Araki Ribeiro (DAB), por meio de uma análise morfológica subjetiva (RENNO *et al.*, 2011).

3.7.5. Análise de Expressão Gênica através do PCR (*Polimerase Chain Reaction*) em Tempo Real.

Para a realização da análise de expressão gênica a parte inferior dos músculos TA esquerdos removidos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e estocados em freezer -86°C.

A extração de RNA total de cada animal foi obtida utilizando-se o reagente TRIzol (Invitrogen Life Science, Carlsbad, CA, USA). Para determinar a quantidade de RNA foi utilizado um espectrofotômetro, no comprimento de onda de 260 nm (correspondente ao pico de absorção de RNA) e 280 nm (correspondente ao pico de absorção de proteínas). A qualidade do RNA isolado foi determinada pela razão entre as absorbâncias a 260 e 280 nm (razão ≥ 1.8), e também, por meio de eletroforese das amostras (25µg de RNA total) em gel desnaturante de agarose-formamida (1%), em tampão MOPS (40mM de ácido morfolinopropanosulfônico). Posteriormente, os géis foram corados com brometo de etídeo para visualização de bandas sob luz ultravioleta. Além disso, a contaminação potencial com DNA foi removida pelo kit RNase-free DNase I (Invitrogen Life Science, Carlsbad, CA, USA) segundo a indicação do fabricante.

Após o isolamento do RNA, foram realizadas as transcrições reversas (RT) com *M-MLV Reverse Transcriptase* (Promega, Madison, WI, USA), seguindo as normas do fabricante e utilizando 1µg de RNA total para sintetizar o DNA complementar (cDNA).

O cDNA transcrito foi utilizado para a avaliação da expressão do RNA mensageiro por PCR em tempo real dos seguintes genes: gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

(GAPDH) (VATANSEVER *et al.*, 2012), usado como controle interno; VEGF (VATANSEVER *et al.*, 2012), COX-2 (TESTA *et al.*, 2007), MyoD (DURIGAN *et al.*, 2008) e Miogenina (KRAUS e PETTE, 1997). As sequências de *primers* utilizados estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Sequências de *primers* utilizados nos experimentos de PCR em tempo real.

Gene	Sequência de <i>primers</i> Forward	Sequência de <i>primers</i> Reverse	Temperatura Anelamento (°C)
GAPDH	CCACCAACTGCTTAGCCC	GCCAAATTCGTTGTCATACC	56 °C
VEGF	GGAGATCCTTCGAGGAGCACTT	GGCGATTAGCAGCAGATATAAGAA	56°C
COX-2	ACACTCTATCACTGGCATCC	GAAGGGACACCCTTTCACAT	49°C
MyoD	GGAGACATCCTCAAGCGATGC	AGCACCTGGTAAATCGGATTG	52 °C
Miogenina	TGGCTTGTGGCAGCCCAGGG	AGTGAATGCAACTCCCACAGCGCC	47 °C

Em seguida, diferentes frações das RTs foram utilizadas na amplificação em cadeia por Polimerase (PCR) em tempo real através do Termociclador (*Rotor-Gene*, R 3000, Robert Research, Mortlake, Australia). O protocolo consistia de um período de 10 minutos a 95°C, seguidos de 40 ciclos de amplificação. Cada ciclo consistiu de 15 segundos de desnaturação a 95°C, 30 segundos de anelamento com temperatura específica para cada gene (Tabela 2) e 30 segundos de extensão a 72°C. Para isso, as reações foram efetuadas em duplicata, utilizando 25 µL de volume total (0,5 µL cDNA; 1 µL de cada *primer*; 10 µL de SYBR Green PCR Master Mix Applied Biosystems, Carlsbad, California, USA) e água estéril.

Após a reação de RT-PCR, foi possível determinar o início da fase de amplificação exponencial (Ct - Threshold cycle) de cada amostra pela fluorescência emitida durante a fase

de anelamento. A média desses valores foi utilizada para a análise da expressão gênica (GAPDH, VEGF, COX-2, MyoD e Miogenina) pelo método $\Delta\Delta Ct$.

- ΔCt (delta Ct) = Ct VEGF – Ct GAPDH ou Ct COX-2 - Ct GAPDH ou Ct MyoD – Ct GAPDH ou Ct Miogenina – Ct GAPDH (CG, G10 e G50 para cada período experimental), seguindo:
- Cálculo da média S: Média do ΔCt , seguindo:
- $\Delta\Delta CT$ (delta delta CT): ΔCT - média S
- Os $\Delta\Delta CT$ dos GC, G10 e G50 foram calculados em relação ao GC. O valor em UA (unidades arbitrárias) da expressão da VEGF, COX-2, MyoD e Miogenina foi calculado por $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001).

Os experimentos, para a técnica descrita acima, foram realizados seguindo protocolo desenvolvido previamente (FÁVARO-PIPI *et al.*, 2011), e em seguida foram realizadas as análises estatísticas dos dados com os valores em UA.

3.8. Análise Estatística

Os dados foram analisados estatisticamente por meio de técnicas descritivas, na forma de médias e desvios-padrão. O teste de normalidade Shapiro–Wilk’s foi utilizado para todas as variáveis. Todas as variáveis apresentaram distribuição normal da amostra. As comparações entre os grupos foram feitas utilizando testes de análise de variância (ANOVA two-way), seguida do teste post-hoc de Tukey. As análises foram realizadas no software STATISTICA versão 7.0 (StatSoft Inc.). Para as conclusões das análises estatísticas, o nível de significância utilizado foi de 5% ($p < 0,05$).

PARTE II

4. ESTUDO I

“Terapia laser de baixa intensidade (LLLT) (660 nm) altera a expressão gênica durante a regeneração muscular em ratos”

Aceito para publicação no periódico “Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology”. (Anexo B)

5. ESTUDO II

“Efeitos da terapia laser de baixa intensidade (660 nm) no processo de regeneração muscular após criolesão”

Aceito para publicação no periódico “Journal of Rehabilitation Research and Development”.
(Anexo C)

4. ESTUDO I

Terapia laser de baixa intensidade (LLLT) (660 nm) altera a expressão gênica durante regeneração muscular em ratos.

Natalia Camargo Rodrigues ^a, Roberta Brunelli ^b, Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo ^c,
Nivaldo Antonio Parizotto ^a, Ana Claudia Muniz Renno ^d

^a. Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos – UFSCar - Rodovia Washington Luís (SP-310), Km 235 – CEP. 13565-905 - São Carlos, SP – Brazil. Email: parizoto@ufscar.br

^b. Departamento de Cirurgia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP - Rua Vital Brasil, 251 - Caixa Postal. 6142 – Cep. 13083-970 - Cidade Universitária "Zeferino Vaz" Barão Geraldo – Campinas, SP - Brasil. Email: robertabrunelli@hotmail.com

^c. Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos – UFSCar - Rod. Washington Luis, km 235 – CEP. 13565-905 - São Carlos, SP – Brasil. Email: hsaraujo@ufscar.br

^d. Departamento de Biociências, Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP – Avenida Ana Costa, 95 – Vila Mathias - SANTOS, SP - Brasil. Email: a.renno@unifesp.br

RESUMO

Introdução: Os efeitos da LLLT foram estudados durante a regeneração muscular através da expressão gênica. *Métodos:* Foram avaliadas duas fluências diferentes (10 e 50 J/cm²) durante 7, 14 e 21 dias após criolesão, através de análises histopatológicas e de expressão gênica RNAm da MyoD, Miogenina, VEGF e COX-2. *Resultados:* Os grupos irradiados apresentaram menor processo inflamatório do que o grupo controle depois de 14 e 21 dias. Os níveis de RNAm do COX-2 foram menores em todos os grupos irradiados depois de 7, 14 e 21 dias. No sétimo dia, os dois grupos tratados tiveram menores níveis de RNAm do VEGF, e um aumento de sua expressão depois de 14 e 21 dias, principalmente com a fluência de 50 J/cm². A expressão do gene MyoD foi aumentada com a fluência maior em todos os períodos avaliados e com a fluência menor depois de 21 dias. A expressão da Miogenina foi reduzida em ambos os grupos tratados depois de 7 dias, e foram aumentadas com 10 J/cm² depois de 21 dias. *Conclusão:* Estes dados sugerem que a LLLT pode melhorar a regeneração muscular através da estimulação da expressão gênica.

Palavras-chave: terapia *laser* de baixa intensidade; ratos; reparo muscular; expressão gênica; MRFs

ABSTRACT

Introduction: The effects of LLLT were studied during muscle regeneration through gene expression. *Methods:* It was evaluated two different fluences (10 and 50 J/cm²) during 7, 14 and 21 days post cryoinjury, through histopathological analysis and mRNA MyoD, Myogenin, VEGF and COX-2 expression. *Results:* Irradiated groups presented less inflammatory process than control group after 14 and 21 days. COX-2 levels were downregulated in all irradiated groups after 7, 14 and 21 days. On day 7, both treated groups had a downregulation of VEGF levels, and an upregulation after 14 and 21 days, mainly with 50 J/cm². The MyoD levels were upregulated with high fluence in all periods and with low fluence after 21 days. Myogenin expression was downregulated in both treated groups after 7 days, and was upregulated with 10 J/cm² after 21 days. *Conclusion:* These responses suggest that LLLT can improve the skeletal muscle regeneration through the gene expression stimulation.

Key words: low-level laser therapy; rat; muscle repair; genes expression; MRFs

4.1. INTRODUÇÃO

A lesão muscular pode ocorrer em diferentes situações, através de trauma indireto, movimentos explosivos ou resultando de causas indiretas como disfunções neurológicas e defeitos genéticos inatos (CHARGE e RUDNICKI, 2004). Achados clínicos revelaram um alto índice de recorrência de estiramentos musculares, aproximadamente 30 % entre os atletas profissionais (BEDAIR *et al.*, 2004).

Sabe-se que o processo de regeneração muscular envolve ativação, proliferação e diferenciação de células musculares, reguladas por citocinas, proteínas e fatores de crescimento, o qual induz ou modula a transformação de células miogênicas em células musculares maduras para reparar o tecido, restaurando a arquitetura e função muscular (YAHIAOUI *et al.*, 2008).

O primeiro ponto do processo sequencial de regeneração muscular é a fase inflamatória, a qual começa imediatamente após a lesão, com a chegada de macrófagos e recrutamento de neutrófilos e monócitos (MOYER e WAGNER, 2011). Nesta fase, a ciclooxigenase tem um importante papel na conversão de ácido aracídico em prostaglandinas (RIBEIRO *et al.*, 2009). Duas isoformas, ciclooxigenase-1 (COX-1) e ciclooxigenase-2 (COX-2), têm sido identificadas. A COX-1 está presente em muitos tecidos e regula a síntese de prostaglandinas requeridas para a função fisiológica normal. A COX-2 é normalmente indetectável na maioria dos tecidos, mas aparece rapidamente após estímulo pro-inflamatório e mitogênico (BONDESEN *et al.*, 2004), e recentemente, tem sido relacionada em diferentes mecanismos celulares, como na angiogênese, na proliferação celular e na prevenção da apoptose (RIBEIRO *et al.*, 2009).

Depois da fase inflamatória, há o recrutamento de células satélites (DE DEYNE *et al.*, 2002; MUSARO *et al.*, 2004; WIETESKA-SKRZECZYNSKA *et al.*, 2011), que são

células precursoras miogênicas responsáveis pela manutenção, crescimento, reparo e regeneração pós-natal do músculo esquelético (CHARGE e RUDNICKI, 2004; KUANG *et al.*, 2007; WARREN *et al.*, 2007). A diferenciação das células satélites dependem da expressão gênica de uma série de precursores, como a expressão de Pax3/Pax7 e dos fatores regulatórios miogênicos (MRFs), incluindo Myf5, MyoD, Mrf4 e Miogenina (KUANG *et al.*, 2007), onde a MyoD e o Myf5 são responsáveis pela proliferação dos mioblastos, enquanto que o MRF4 e a Miogenina tem a função de estimular a diferenciação dessas células até formarem as novas fibras musculares (VATANSEVER *et al.*, 2012)

Além do que, um apropriado reparo muscular depende de uma perfusão sanguínea adequada (BRYAN *et al.*, 2008). O fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) é um potente fator angiogênico que estimula a proliferação e migração de células endoteliais e esta relacionado a formação de novos vasos sanguíneos (PEREIRA LOPES *et al.*, 2011).

Apesar da habilidade de regeneração, dependendo da extensão da lesão, a capacidade regenerativa do músculo esquelético lesado pode ser limitada e, desencadeando à formação de tecido fibrótico e prejudicando a recuperação funcional completa, o que pode causar atrofia, contratura, dor e lesões recorrentes (HUARD *et al.*, 2002; FIASCHI *et al.*, 2010; LAGROTA-CANDIDO *et al.*, 2010).

O tratamento clínico desta condição ainda depende de terapias convencionais, incluindo repouso, gelo e medicamentos anti-inflamatórios, os quais tem eficiência limitada no tratamento ou na prevenção da formação de fibrose muscular pós-traumática (GHARAIBEH *et al.*, 2012).

Neste contexto, muitas técnicas tem sido desenvolvidas com o objetivo de melhorar a restauração muscular (SHEFER *et al.*, 2002), acelerando a proliferação de células musculares e prevenindo fibrose durante o processo de reparo, com o intuito de diminuir o tempo de reabilitação (RENNO *et al.*, 2011).

A terapia *laser* de baixa intensidade (LLLT) tem sido amplamente usada para tratar tecidos lesados (LIU *et al.*, 2009), atuando efetivamente em vários processos biológicos através do aumento da respiração mitocondrial e síntese de ATP, modulando o processo inflamatório, promovendo e acelerando o reparo tecidual (CRESSONI *et al.*, 2008) e estimulando a angiogênese (WEISS e ORON, 1992; BIBIKOVA e ORON, 1993).

Há evidências que a LLLT é capaz de aumentar a proliferação de células musculares *in vitro* e de acelerar o reparo do tecido muscular lesado em animais. Shefer *et al.* (2002), mostraram que a LLLT (632.8 nm; 4.5 mW; 3 segundos) promove a sobrevivência de cultura de células miogênicas, prevenindo apoptose. Silveira *et al.* (2009) observaram que a LLLT (904 nm; 5 J/cm²) é capaz de acelerar a regeneração muscular, reduzindo a produção do ânion superóxido, níveis Tbars, atividade SOD e hidroxiprolina; e também, Amaral *et al.* (2001) evidenciaram que a LLLT (632.8 nm; 2.6 J/cm²; 7 segundos) também acelerou o reparo do músculo tibial anterior depois de criolesão.

Nota-se que o uso da LLLT é uma técnica promissora para aumentar o metabolismo e o reparo muscular. Entretanto, o mecanismo pelo qual esta terapia atua não é inteiramente entendido e assim, seu uso na clínica é ainda controverso. Além disso, o uso de diferentes doses e a falta de uma padronização do modelo experimental torna difícil comparar os resultados entre os diversos estudos. Ademais, antes da LLLT poder ser usada com confiança como um tratamento dentro da clínica, é necessário investigar os efeitos desta terapia a nível celular para determinar sua segurança e eficácia. A partir disso, foi hipotetizado que a LLLT pode melhorar o metabolismo tecidual no local da lesão muscular, modulando o recrutamento das células pelo estímulo da expressão gênica envolvidos na regeneração e maturação celular. Conseqüentemente, o presente estudo objetivou avaliar a influência temporal da terapia laser durante a regeneração do músculo Tibial anterior (TA) criolesionado através dos aspectos morfológicos e da expressão gênica. O processo

inflamatório, tecido de granulação e reorganização tecidual foram avaliados histologicamente. Assim como, o PCR em tempo real foi utilizado para analisar a expressão de genes relacionados com o processo de regeneração muscular depois de 7, 14 e 21 dias após lesão.

4.2. MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1. Animais e Desenho Experimental

Sessenta e três ratos machos *Wistar* (pesando ± 300 g) foram utilizados neste estudo. Os animais foram mantidos sob temperatura controlada (22 ± 2 °C), período claro-escuro de 12 horas, e acesso livre a água e ração comercial. Todos os animais foram manipulados e o procedimento cirúrgico foi estritamente conduzido de acordo com o Guia de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) (Parecer – 068/2009). Os animais foram randomicamente distribuídos em 3 grupos: grupo controle lesado (GC) – animais lesados e sem nenhum tratamento; grupo lesado e tratado com 10 J/cm² (G10) e grupo lesado e tratado com 50 J/cm² (G50). Cada grupo foi dividido em 3 subgrupos diferentes (n=7) e nos dias 7, 14 e 21 após lesão os animais foram submetidos a eutanásia. Os tratamentos começaram 48 horas depois da indução da lesão e foram realizados a cada 24 horas durante 5, 10 e 15 sessões.

4.2.2. Criolesão

A criolesão foi baseada no trabalho de Miyabara *et al.* (2006), e foi realizada sob anestesia com solução de Ketamina/Xilazina (80/10 mg/Kg). Depois da anestesia, a pele que recobre o músculo TA direito foi tricotomizada e limpa. Então, uma incisão transversal (aproximadamente de 1 cm) foi realizada na pele para expor o músculo. A extremidade (0.5 cm²) de uma barra de ferro retangular, pré-congelada em nitrogênio líquido, foi pressionada por 10 segundos no centro do ventre muscular. O procedimento foi repetido 2 vezes consecutivas, com um intervalo de 30 segundos. Finalmente, a pele foi suturada e os animais colocados em lugar aquecido (37°C) para prevenir hipotermia.

4.2.3. Protocolo de Tratamento

O laser InGaAlP com comprimento de onda contínuo de 660 nm (MM Optics, São Carlos equipamento, SP, Brasil), área do feixe de 0.04 cm², com 10 J/cm² (potência de saída de 20 mW, densidade de potência de 50 W/cm², 20 segundos de irradiação, energia total por ponto de 0.4 J) e 50 J/cm² (potência de saída de 40 mW, densidade de potência de 100 W/cm², 50 segundos de irradiação, energia total por ponto de 2 J), foi usado neste estudo. A irradiação foi realizada em um único ponto, sobre a área lesada, através da técnica pontual em contato. O tratamento começou 48 horas após a lesão e foi efetuado 5 vezes/semana (cada 24 horas), seguido de um intervalo de 48 horas. Nos dias 7, 14 e 21 os animais foram sacrificados por overdose de anestésico.

4.2.4. Análise Histológica

Os músculos TA esquerdos obtidos de todos os grupos experimentais e controles foram fixados em formalina tamponada 10% (Merck, Darmstadt, Germany) por 48 horas, e

em incluídos em parafina. Secções longitudinais seriadas (5 µm) foram realizadas usando um micrótomo (Leica Microsystems SP 1600, Nussloch, Germany). Cinco secções de cada amostra foram coradas com Hematoxilina e Eosina (HE, Merck) e examinadas através de um microscópio de luz com uma objetiva 20X (Leica Microsystems AG, Wetzlar, Germany). As análises qualitativas consideraram qualquer alteração na área lesada, como: presença de processo inflamatório, área de necrose, degeneração das fibras musculares focais ou difusas e estrutura tecidual (SHEFER *et al.*, 2002).

4.2.5. Análise de Expressão Gênica

Os músculos TA esquerdos foram cuidadosamente removidos e dissecados com os animais anestesiados antes do sacrifício. O músculo foi estocado em -86°C até a realização da análise quantitativa PCR (Polimerase Chain Reaction) em tempo real. Para isso, o RNA total de cada amostra foi isolado usando o reagente TRIzol (Invitrogen). Possíveis contaminações com DNA foram removidas utilizando RNase-free DNase I (Invitrogen). A integridade do RNA foi verificada através de eletroforese em gel de RNA por um espectrofotômetro. Cinco genes foram selecionados (Tabela 3), os quais representam o processo relacionado a miogênese, angiogênese e também relacionado ao processo inflamatório. Para cada gene, sequências de *primers* específicos foram designados. Após isso, o DNA complementar (cDNA) foi sintetizado para cada amostra de RNA. As reações de PCR em tempo real foram realizadas com um volume total de 25 µL. Seguindo com a fase inicial de desnaturação, e posteriormente com a amplificação de cada gene através de 40 ciclos (Rotor-Gene, R 3000 – Robert Research, Mortlake, Australia). As amplificações gênicas foram mensuradas pela fluorescência emitida pelo reagente SYBR green (Applied Biosystems, Carlsbad, California, USA) durante as fases de anelamento e alongamento.

Todas as amostras foram avaliadas em duplicata e a média foi usada para análise estatística. Essas medidas (Ct – threshold cycle) foram normalizadas através da expressão do GAPDH de cada músculo. E assim, foram obtidos os valores da expressão para cada gene de interesse dos grupos LLLT e dos grupos controles em 7, 14 e 21 dias após lesão (FAVARO-PIPI *et al.*, 2010).

Tabela 3: Sequência de primers e temperatura de anelamento de cada gene analisado.

GAPDH (VATANSEVER *et al.*, 2012); VEGF (VATANSEVER *et al.*, 2012), COX-2 (TESTA *et al.*, 2007), MyoD (DURIGAN *et al.*, 2008) e Miogenina (KRAUS e PETTE, 1997).

Gene	Sequência de primers Forward	Sequência de primers Reverse	Temperatura Anelamento (°C)
GAPDH	CCACCAACTGCTTAGCCC	GCCAAATTCGTTGTCATACC	56 °C
VEGF	GGAGATCCTTCGAGGAGCACTT	GGCGATTTAGCAGCAGATATAAGAA	56°C
COX-2	ACACTCTATCACTGGCATCC	GAAGGGACACCCTTTCACAT	49°C
MyoD	GGAGACATCCTCAAGCGATGC	AGCACCTGGTAAATCGGATTG	52 °C
Miogenina	TGGCTTGTGGCAGCCCAGGG	AGTGAATGCAACTCCCACAGCGCC	47 °C

4.2.6. Análise Estatística

Os dados foram analisados estatisticamente por meio de técnicas descritivas, na forma de médias e desvios-padrão. Os dados da expressão gênica foram avaliados utilizando testes de análise de variância (ANOVA two-way), seguidos do post-hoc de Tukey. As análises foram realizadas no software STATISTICA, versão 7.0. Para as conclusões das análises estatísticas foi utilizado o nível de significância de 5 % ($p \leq 0.05$).

4.3. RESULTADOS

4.3.1. Análise histopatológica

No sétimo dia após a cirurgia, os animais do GC apresentaram intensa resposta inflamatória, como zonas destruídas e presença de um importante recrutamento multifocal de células inflamatórias e extensa degeneração miofibrilar (caracterizada pela ruptura e desorganização das fibras musculares) com tecido de granulação (Figura 6A). O G10 apresentou alta concentração de células inflamatórias, tecido de granulação e degeneração miofibrilar, porém menos intenso do que no GC (Figura 6B). Uma alta concentração de células inflamatórias, tecido de granulação e presença difusa de degeneração das fibras musculares, foram encontradas especialmente no G50 quando comparado com G10 (Figura 6C).

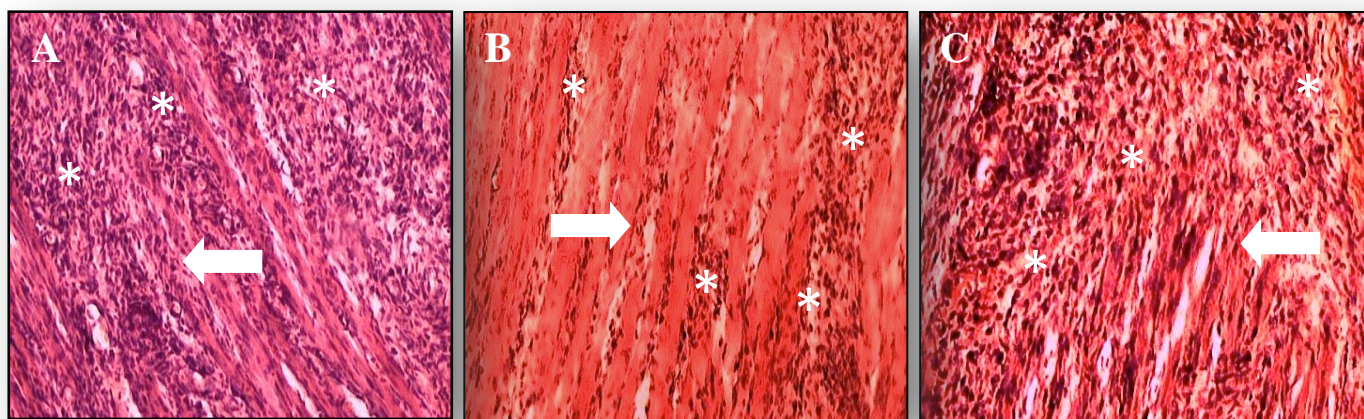


Figure 6. Músculos lesados depois de 7 dias de cirurgia. (A) grupo controle lesado, (B) animais irradiados com 10 J/cm^2 , (C) animais irradiados com 50 J/cm^2 . (*) Indicam tecido de granulação, área de necrose e infiltrado inflamatório; (seta) Indicam degeneração das fibras musculares. (Coloração: H.E., 20 X).

Catorze dias após a lesão, as fotomicrografias do GC apresentaram zonas destruídas, infiltrado inflamatório e tecido de granulação, porém mais focal quando comparado com o GC depois de 7 dias de lesão. Ainda é possível verificar neste mesmo grupo fibras musculares multinucleadas de forma mais organizada do que no GC depois de 7 dias (Figura 7A). Nos animais tratados com 10 J/cm^2 foi possível observar a área lesada, porém com menos concentração de células inflamatórias e de tecido de granulação quando comparado com o GC (Figura 7B-7C). O G50 apresentou uma menor concentração de células inflamatórias e de tecido de granulação, com fibras musculares multinucleadas mais organizadas do que o G10 e do que o GC.

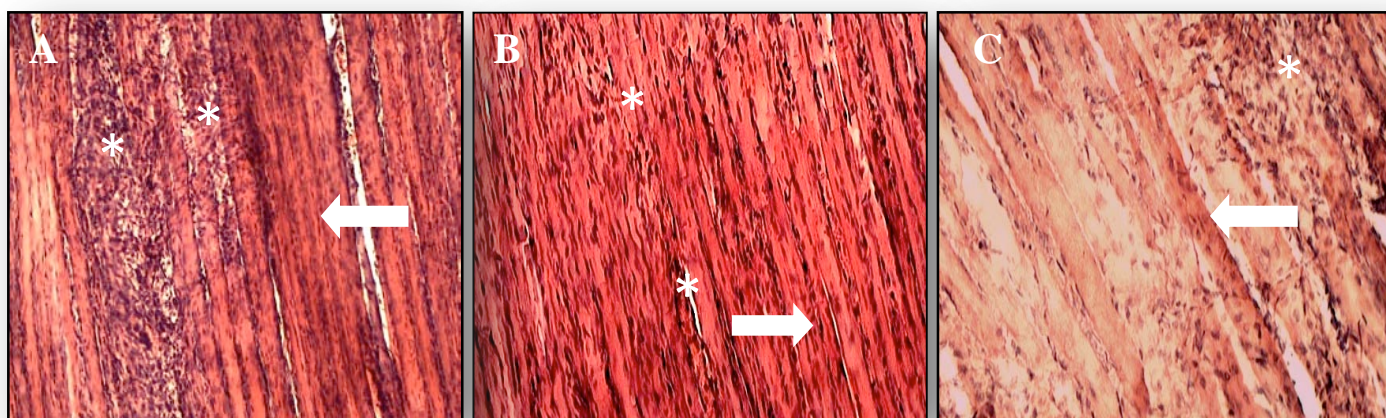


Figure 7. Músculos lesados depois de 14 dias de cirurgia. (A) grupo controle lesado, (B) animais irradiados com 10 J/cm^2 , (C) animais irradiados com 50 J/cm^2 . (*) Indicam tecido de granulação e infiltrado inflamatório; (seta) Indicam fibras musculares multinucleadas. (Coloração: H.E., 20 X).

Após 21 dias de lesão, todos os grupos demonstraram nenhum processo inflamatório. Os animais dos grupos controles lesados apresentaram melhor estrutura tecidual com fibras musculares multinucleadas no local da lesão quando comparado com os GC de 7 e 14 dias após a lesão (Figura 8A). Fibras musculares multinucleadas foram visualizadas no G10, com características similares as do GC (Figura 8B). Em relação ao G50, fibras musculares

multinucleadas mais organizadas e com diâmetros aparentemente maiores do que o GC e o G10 foram observadas (Figura 8C).

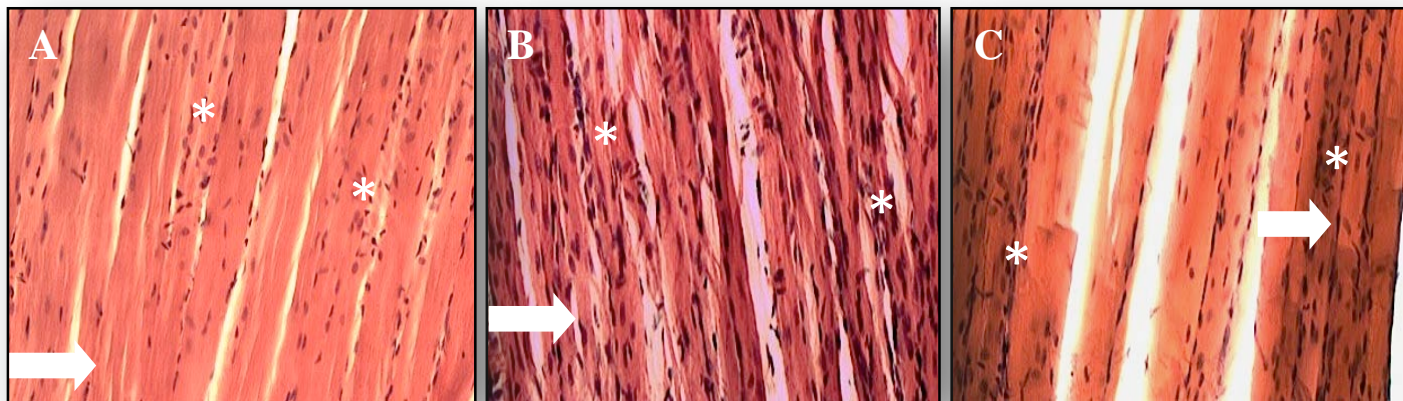


Figure 8. Músculos lesados depois de 21 dias de cirurgia. (A) grupo controle lesado, (B) animais irradiados com 10 J/cm^2 , (C) animais irradiados com 50 J/cm^2 . (*) Indicam fibras musculares multinucleadas; (seta) Indicam o diâmetro das fibras musculares. (Coloração: H.E., 20 X).

4.3.2. Análise da expressão gênica

COX-2

A figura 9 representa a expressão do RNAm COX-2 dos grupos experimentais, em todos os períodos avaliados. A análise de RT-PCR revelou uma diminuição significativa da expressão do RNAm COX-2 nos grupos tratados (G10 e G50) quando comparado com o GC, em todos os períodos experimentais avaliados.

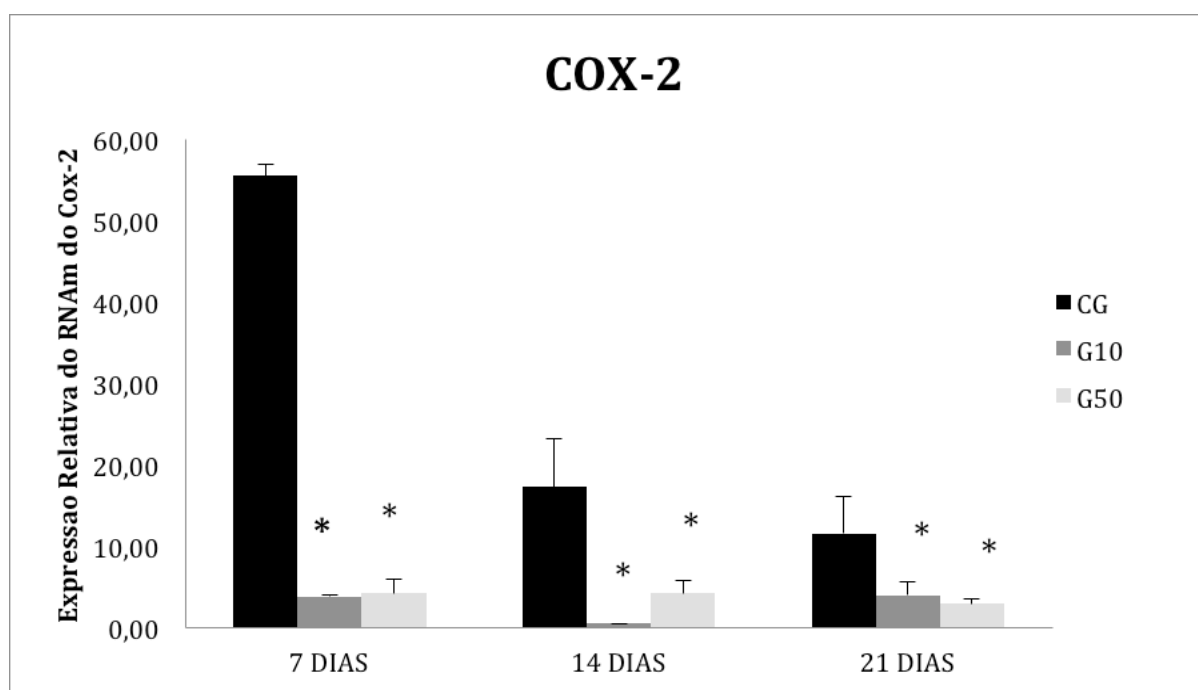


Figure 9. Média e desvios padrão da expressão do RNAm do gene COX-2. (GC) grupo controle lesado, (G10) animais irradiados com 10 J/cm², (G50) animais irradiados com 50 J/cm². * P<0,05 versus GC em 7, 14 e 21 dias.

VEGF

A Figura 10 representa a expressão do RNAm do VEGF dos grupos experimentais, em todos os períodos avaliados. Sete dias após a criolesão, uma redução significativa deste gene foi observada nos grupos irradiados (G10 e G50) quando comparada ao grupo controle. No décimo quarto dia, nos animais tratados foi possível observar um aumento significativo do RNAm do VEGF, nas duas fluências avaliadas, quando comparado com o GC, assim como a expressão gênica do VEGF no G50 foi significativamente maior do que no G10. Após 21 dias, uma redução significativa da expressão gênica do VEGF foi encontrada no G50 em relação ao GC e ao G10.

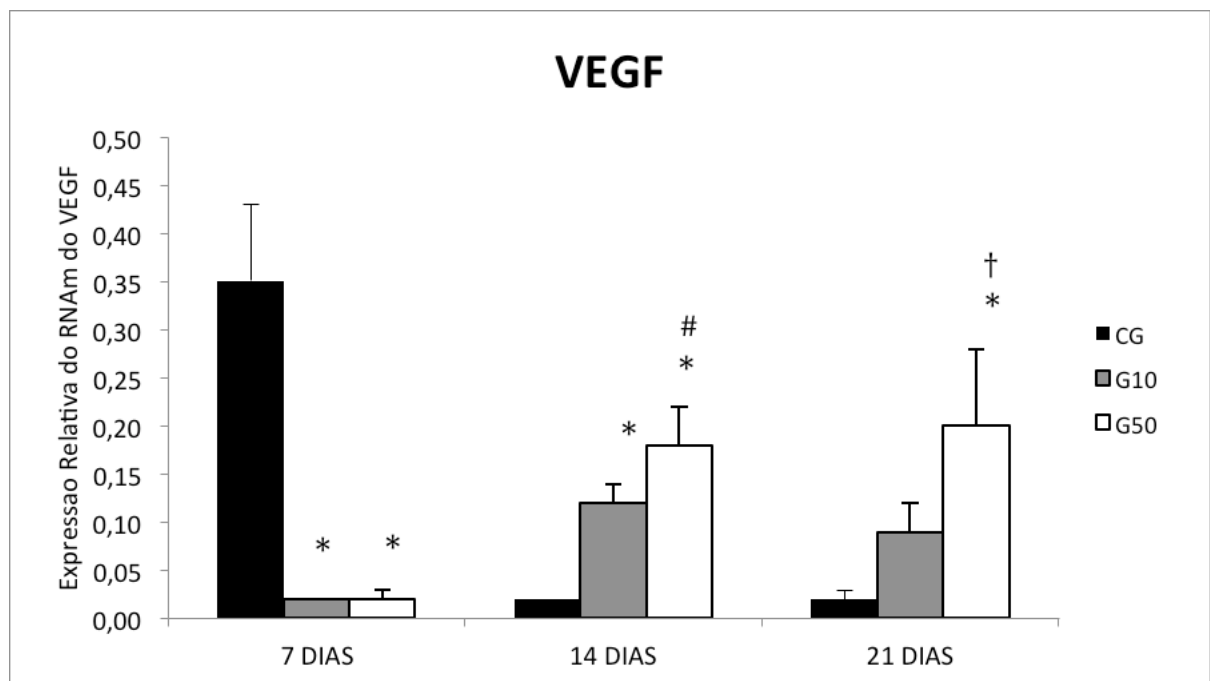


Figure 10. Média e desvios padrão da expressão do RNAm do gene VEGF. (GC) grupo controle lesado, (G10) animais irradiados com 10 J/cm², (G50) animais irradiados com 50 J/cm². * P<0,05 versus GC em 7, 14 e 21 dias; # P<0,05 versus G10 em 14 dias; † P<0,05 versus G10 em 21 dias.

MyoD

Em relação a expressão gênica do RNAm da MyoD é possível verificar que o GC não obteve alteração significativa durante todos os períodos avaliados. O G10 apresentou um aumento significativo da MyoD apenas após 21 dias de tratamento, quando comparado com o GC. Os grupos irradiados com 50 J/cm² apresentaram um aumento significativo da expressão do RNAm da MyoD comparado com o GC e o G10, em 7 e 14 dias após a lesão, e 21 dias depois da cirurgia, quando comparado com o GC (Figura 11).

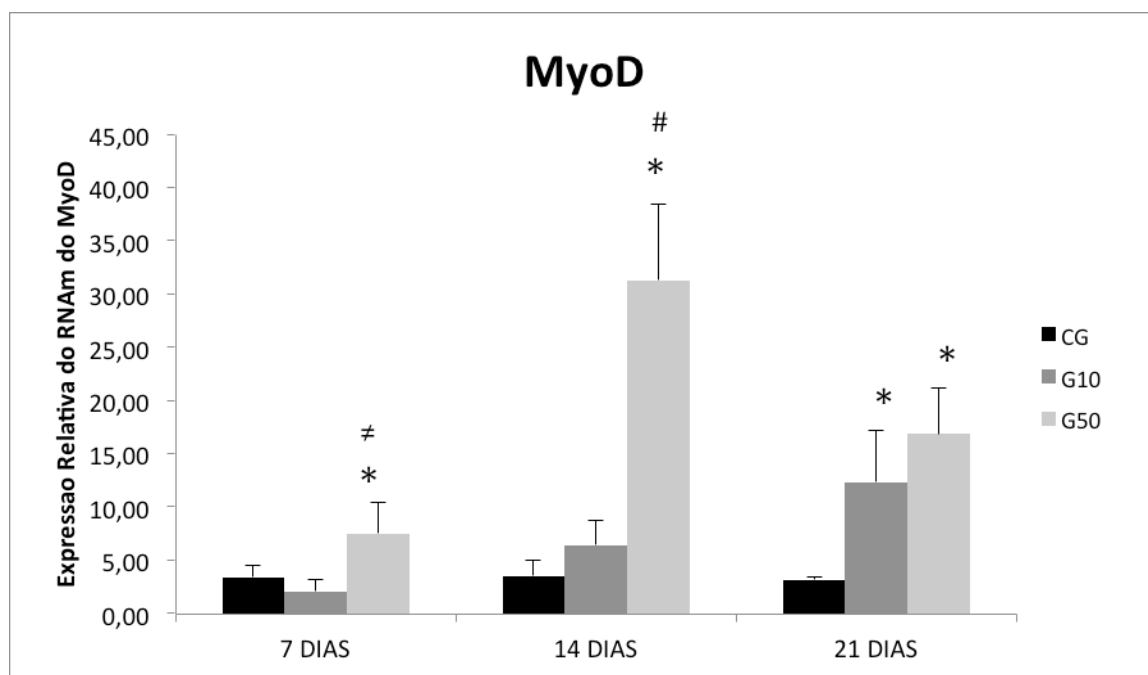


Figure 11. Média e desvios padrão da expressão do RNAm do gene MyoD. (GC) grupo controle lesado, (G10) animais irradiados com 10 J/cm², (G50) animais irradiados com 50 J/cm². * P<0,05 versus GC em 7, 14 e 21 dias; ≠ p<0,05 versus G10 em 7 dias e # p<0,05 versus G10 em 14 dias.

Miogenina

De acordo com a análise da expressão do RNAm da Miogenina, o GC demonstrou um aumento da Miogenina depois de 7 dias de lesão, seguido de uma redução da Miogenina depois de 14 e 21 dias. No sétimo dia, ambos os grupos tratados apresentaram uma redução da Miogenina quando comparados com o GC. Nenhuma modificação da expressão do RNAm da Miogenina foi evidenciada entre todos os grupos em 14 dias. No último período avaliado, os animais irradiados com a dose de 10 J/cm², apresentaram aumento significativo da expressão do RNAm da Miogenina quando comparado com o GC e o G50 (Figura 12).

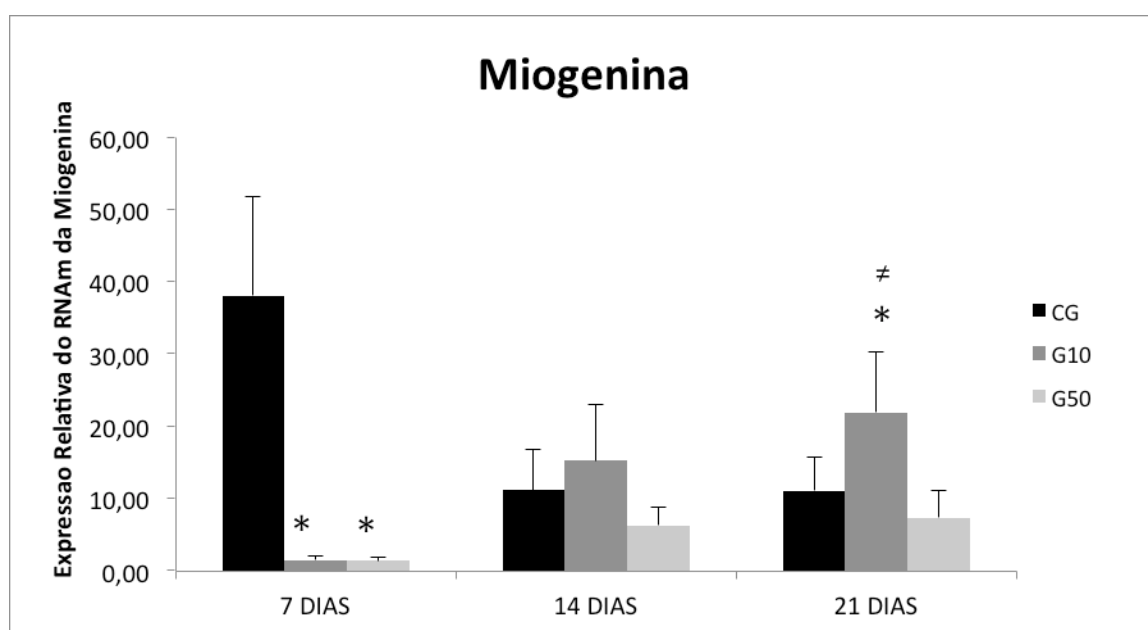


Figure 12. Média e desvios padrão da expressão do RNAm do gene Miogenina. (GC) grupo controle lesado, (G10) animais irradiados com 10 J/cm², (G50) animais irradiados com 50 J/cm². * P<0,05 versus GC em 7 e 21 dias; ≠ P<0,05 versus G50 em 21 dias.

4.4. DISCUSSÃO

Neste estudo, os efeitos da LLLT no modelo experimental de criolesão do músculo TA em ratos foi investigado. Foi hipotetizado que a LLLT pode modular o processo de regeneração muscular, acelerando o processo de reparo por meio do aumento da expressão gênica e estimulando o recrutamento celular. De acordo com os resultados encontrados, as análises histológicas mostraram que a LLLT produziu um recrutamento precoce das células inflamatórias no primeiro período avaliado, assim como, estimulou formação de tecido muscular mais organizado no local da lesão depois de 14 e 21 dias. Além disso, a irradiação laser foi capaz de diminuir a expressão do RNAm da COX-2 e aumentar a expressão do RNAm do VEGF depois de 14 e 21 dias de tratamento. Como também, a expressão do RNAm da MyoD foi aumentada nos grupos irradiados com a dose de 50 J/cm², em todos os períodos analisados, e a expressão do RNAm da Miogenina foi aumentada apenas no grupo tratado com a dose de 10 J/cm², depois de 21 dias.

As análises histopatológicas revelaram que a terapia laser, especialmente com a dose de 50 J/cm², acelerou o processo de regeneração muscular, ativando as células inflamatórias no primeiro período de tratamento. Além disso, uma melhor organização tecidual foi encontrada no local da lesão nos grupos irradiados depois de 14 e 21 dias. Esta resposta tecidual demonstrou que a LLLT provavelmente atua como um recurso pro-inflamatório, induzindo a resolução precoce da primeira fase do processo de reparo. Este fato pode resultar no recrutamento prematuro das células satélites e a formação de novas fibras musculares com uma melhor estrutura tecidual, como visto no grupo irradiado com a maior dose após 21 dias.

Estes achados corroboram com Souza *et al.* (2011), que demonstraram uma redução do processo inflamatório em um modelo de criolesão, depois da irradiação com o laser (660

nm laser, 5 J/cm²). Renno *et al.* (2011) usaram o laser 830nm, com dose de 50 J/cm² (6 sessões), encontrando uma diminuição do processo inflamatório no musculo lesado. Da mesma forma, Servetto *et al.* (2010) comparando dois comprimentos de onda (632,8 nm e 904 nm, ambos com 9,5 J/cm²), verificaram que o laser vermelho foi mais efetivo do que o laser infravermelho para diminuir o infiltrado inflamatório em 7 dias após lesão.

Neste estudo os níveis da expressão do RNAm do COX-2 foram investigados. De acordo com Bondesen *et al.* (2004), a expressão gênica do COX-2, durante a regeneração muscular sem tratamento, alcança seu pico entre o quarto e o sexto dia após lesão, seguida pela sua redução no oitavo dia, o que condiz com os resultados encontrados no GC. As prostaglandinas (PGs) sintetizadas pela COX-2 através do ácido aracdônico tem múltiplas funções, como: quimiotaxia das células inflamatórias, indução do óxido nítrico sintase e vasodilatação com aumento da permeabilidade vascular (PRISK *et al.*, 2003; TIDBALL *et al.*, 2009). Porém, o aumento dos mediadores inflamatórios aumenta ainda mais as PGs, o que pode acarretar a uma degradação excessiva das fibras musculares na área lesada (PRISK *et al.*, 2003). Assim, podemos evidenciar que a LLLT pode modular o processo inflamatório, pois ambos os grupos irradiados apresentaram significativa redução dos níveis do COX-2 em todos os períodos avaliados. Estes resultados estão de acordo com Albertini *et al.* (2007), que observaram uma diminuição da expressão do COX-2 em tendinite de ratos depois da irradiação laser, e também com Herman e Kosla (1989), que mostraram uma redução na expressão da COX-2 no processo inflamatório da artrite reumatóide depois do tratamento com laser (2,3 J/cm²). Com isso, estes resultados indicam que a LLLT pode ser uma alternativa no tratamento de processos inflamatórios, provavelmente pela redução da expressão do COX-2.

O VEGF é o principal regulador da formação de vasos sanguíneos durante a embriogênese e um potente indutor da neovascularização durante a vida adulta (ARSIC *et*

al., 2004). Além disso, o VEGF tem um importante papel na regularização basal da capilarização do músculo esquelético. Durante a regeneração muscular, Durigan *et al.* (2008), mostraram que o gene VEGF aumenta a sua expressão depois de 3 e 7 dias de criolesão. Wagatsuma *et al.* (2006) também avaliaram os níveis protéicos do VEGF durante o 5º, 7º, 10º e 20º dia de regeneração muscular, verificando um aumento do VEGF nos 3 primeiros períodos avaliados e uma redução de seus níveis no vigésimo dia. Esse fato está de acordo com os resultados apresentados pelo grupo controle durante os períodos avaliados neste estudo. Entretanto, ocorreu uma redução da expressão do RNAm do VEGF nos grupos irradiados no 7º dia. Ferrara *et al.* (2003) demonstraram que a fotomodulação vascular pode estar associada com a redução das células inflamatórias e com a estimulação da migração de macrófagos, linfócitos-T e células endoteliais durante o processo de reparo. Seguindo estas descrições, é possível sugerir que a redução da expressão do RNAm do VEGF pode estar relacionada a alta concentração do processo inflamatório no primeiro período avaliado. Ao contrário do que foi evidenciado no 7º dia, um aumento dos níveis do VEGF foi encontrado em ambos os grupos irradiados depois de 14 dias e principalmente no grupo tratado com a maior dose depois de 21 dias de lesão. Estes resultados corroboram com Tuby *et al.* (2006) que observaram um aumento da expressão gênica do VEGF no coração de ratos após enfarte e depois da irradiação com o laser 804 nm, e com Dias *et al.* (2012), que também notaram um aumento da expressão do VEGF depois da irradiação laser com dose de 20 J/cm² no músculo masseter de ratos. Além disso, Borselli *et al.* (2010) sugerem que o aumento da expressão do VEGF está relacionado ao aumento do diâmetro das fibras musculares durante sua regeneração, como também, está relacionado com o aumento do número de fibras musculares jovens com núcleo centralizado. Assim, apesar de não ter sido realizado análises quantitativas em relação ao diâmetro e a quantidade de fibras musculares jovens, é possível visualizar nos grupos irradiados uma melhor organização das fibras musculares, com

diâmetros aparentemente maiores no grupo tratado com a maior dose quando comparado com o grupo controle e com o grupo irradiado com 10 J/cm^2 . Apesar do exposto acima, outros estudos são necessários para elucidar este resultado.

A expressão do RNAm da MyoD aumentou depois da irradiação laser, em todos os períodos analisados, principalmente com a maior dose utilizada neste estudo, enquanto que no grupo controle não ocorreu alteração dos níveis da expressão da MyoD. Estudos mostram que a expressão gênica da MyoD alcança seus níveis mais altos no terceiro ou quarto dia após a lesão, decaindo nos dias subsequentes (YAN *et al.*, 2003; BONDESEN *et al.*, 2004; TANAKA *et al.*, 2008; VANDERPOEL *et al.*, 2011), o que explica os níveis reduzidos da MyoD encontrados nos grupos controles. A regeneração muscular é controlada pelas MRFs (como a MyoD, Miogenina e MRF4) (LIU *et al.*, 2009) e a ação da MyoD está relacionada com a proliferação das células satélites na fase inicial do processo de reparo muscular (HERMAN e KHOSLA, 1989). A chegada das células satélites no local da lesão é um ponto crucial, uma vez que elas se transformam em mioblastos para repor as fibras musculares lesadas (MARSH *et al.*, 1997; DEGENS *et al.*, 2007). Uma maior expressão gênica da MyoD com a maior dose da LLLT utilizada foi encontrada em todos os períodos. Yan *et al.* (2003) relataram que a MyoD tem também a função de manutenção e diferenciação das células miogênicas. Assim, o presente estudo sugere que a terapia laser foi capaz de ativar as células satélites durante o processo de regeneração muscular, o que pode ter estimulado a formação de novas fibras musculares.

O gene Miogenina é também parte das MRFs e é responsável pela diferenciação das células satélites (LE GRAND e RUDNICKI, 2007; FRIEDRICHS *et al.*, 2011). Neste estudo, o grupo controle apresentou uma aumento da expressão da Miogenina no 7º dia seguida de sua redução nos outros períodos avaliados, o que está de acordo com Van der poel *et al.* (2011) que encontrou um aumento da expressão da Miogenina no sétimo dia após

indução de atrofia muscular. Entretanto, Yan *et al.* (2003) evidenciaram que a expressão da Miogenina aumentou no quarto dia depois da lesão, reduzindo significativamente seus níveis até o 14º dia, último período avaliado neste estudo. Nos grupos irradiados o aumento da expressão do RNAm da Miogenina foi encontrado somente depois de 21 dias de lesão com a dose de 10 J/cm². Este resultado está de acordo com Silva *et al.* (2012) que mostraram que a terapia laser não foi capaz de aumentar a expressão da Miogenina em 7 e 14 dias após lesão. Porém, Yan *et al.* (2003) descreveram que a expressão da MyoD precede a indução da expressão da Miogenina. Com isso, podemos sugerir que a terapia laser não foi capaz de estimular a expressão do RNAm da Miogenina com a dose de 50 J/cm², possivelmente por que nos períodos avaliados os níveis do RNAm da MyoD ainda estavam elevados, mas isto não interferiu na formação das fibras musculares novas como visualizado nas análises histológicas.

Nossos resultados mostraram que o laser 660 nm, com a dose de 50 J/cm² foi mais eficiente em estimular modificações morfológicas e aumentar a expressão gênica, o que pode resultar num reparo tecidual acelerado quando comparado com os resultados encontrados nos grupos controles e nos grupos irradiados com a dose de 10 J/cm². Estes resultados podem estar associados com uma resposta tecidual dose dependente à terapia laser.

4.5. CONCLUSÃO

Este estudo revelou que a LLLT teve efeitos positivos no músculo esquelético lesado em ratos e mostrou que a irradiação laser é capaz de atuar na expressão gênica, através do aumento da expressão dos genes MyoD, Myogenin, VEGF e da redução da expressão do gene COX-2, principalmente com a dose de 50 J/cm². Portanto, o aumento da expressão gênica e a modulação do processo inflamatório foram responsáveis pela aceleração da

regeneração muscular. Entretanto, outros estudos para elucidar os mecanismos envolvidos na estimulação do reparo muscular pela LLLT devem ser realizados, contribuindo também para o entendimento da eficácia e segurança desta modalidade terapêutica.

5. ESTUDO II

Efeitos da terapia laser de baixa intensidade (660 nm) no processo de regeneração muscular após criolesão.

Natalia C. Rodrigues,^a Lívia Assis,^b Kelly R. Fernandes,^b Angela Magri,^b Daniel A. Ribeiro,^b
Roberta Brunelli,^c Daniela C. C. Abreu,^d Ana Claudia M. Renno^b

^a Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, SP, Brasil.

^b Departamento de Biociências, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Santos, SP, Brasil.

^c Departamento de Cirurgia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil.

^d Departamento de Biomecânica, Medicina e Reabilitação do Sistema Locomotor, Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brasil.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da terapia *laser* de baixa intensidade (LLLT) de 660 nm na regeneração muscular depois de criolesão do músculo Tibial Anterior (TA) de ratos. Sessenta e três ratos *Wistar* foram randomicamente divididos em três grupos: grupo controle lesado (GC) – animais lesados sem nenhum tratamento; grupo tratado com fluência de 10 J/cm² (G10) e grupo tratado com fluência de 50 J/cm² (G50). Cada grupo foi dividido em três subgrupos (n=7), os quais foram eutanasiados nos dias 7, 14 e 21 após lesão. Resultados histopatológicos revelaram menor processo inflamatório nos grupos tratados, depois de 7 dias. No 14^o dia, os animais irradiados, com as duas fluências, apresentaram grande quantidade de tecido de granulação, fibras musculares jovens e estrutura muscular organizada. Após 21 dias, um reparo tecidual completo foi observado em todos os grupos. Além disso, os animais de ambos os grupos irradiados, exibiram menor área de necrose no primeiro período experimental avaliado. A imunohistoquímica demonstrou expressão da Miogenina em todos os grupos experimentais depois de 7 e 14 dias, e no 21^o dia, no grupo controle e no grupo tratado com a menor fluência. Maior expressão da MyoD esteve presente nos grupos tratados em todos os períodos avaliados. A fluência maior aumentou o número de vasos sanguíneos depois de 14 e 21 dias. Estes resultados sugerem que a LLLT, com as duas fluências, estimularam resultados positivos durante a regeneração muscular. No entanto, a fluência maior demonstrou uma formação de tecido muscular mais organizado.

Palavras-chave: terapia laser de baixa intensidade; regeneração muscular; MyoD; Miogenina; tecido muscular; análise histológica.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effects of 660 nm low-level laser therapy (LLLT) on muscle regeneration after cryolesion in rat Tibiales Anterior (TA) muscle. Sixty-three *Wistar* rats were randomly divided into three groups: injured control group (CG) – injured animals without any treatment; treated group, at 10 J/cm² (G10) and treated group, at 50 J/cm² (G50). Each group was divided into 3 different subgroups (n=7) and on days 7, 14 and 21 post-injury, were sacrificed. Histopathological findings revealed a lower inflammatory process in the laser treated groups, after 7 days. On day 14th, the irradiated animals, at both fluencies, showed higher granulation tissue, newly muscle fibers and an organized muscle structure. At 21 days, a full tissue repair was observed in all groups. The immunohistochemistry analysis showed Myogenin expression in all experimental groups after 7 and 14 days, and at day 21st, the immunoexpression was detectable in the control group and in the treated group with lower fluence. Superior MyoD expression appeared in both treated groups during all evaluated periods. The higher fluence increased the number of blood vessels after 14 and 21 days. These results suggest that LLLT, with both fluences, have positive effects during skeletal muscle regeneration. However, the higher fluence demonstrated a better muscle tissue organization.

Keywords: Low-level laser therapy; muscle regeneration; MyoD; Myogenin; muscle tissue; histological analysis; gene expression

5.1. INTRODUÇÃO

Lesões do músculo esquelético são extremamente comuns nos centros de reabilitação. Essas lesões podem ocorrer através de uma variedade de mecanismos, desde traumas diretos (como laceração, estiramento e contusão), como também através de traumas indiretos relacionados a isquemia e disfunções neurológicas (HUARD *et al.*, 2002; BAOGE *et al.*, 2012). Logo após a lesão um processo de regeneração muscular é ativado (MENETREY *et al.*, 2000; HUARD *et al.*, 2002).

A regeneração muscular é um processo altamente orquestrado, onde ocorre uma resposta inflamatória, ativação de células satélites e formação de miofibras jovens (TIDBALL *et al.*, 2005). Para isso, a interação espacial e temporal de diferentes tipos celulares é regulada por uma série de sinais celulares entre moléculas e fatores de crescimento, o que induz à maturação das células musculares para criar uma estrutura muscular adequada no local da lesão (JARVINEN *et al.*, 2007).

A família dos fatores regulatórios miogênicos (MRFs), como a MyoD e a Miogenina tem um papel importante durante este processo. A MyoD é mais efetiva na ativação e diferenciação das células satélites, enquanto que a Miogenina é um fato importante durante a diferenciação e fusão dos mioblastos para formar, e assim, restaurar a arquitetura muscular (BRYAN *et al.*, 2008). Além disso, a formação de novos vasos é um ponto crucial para garantir um adequado suprimento sanguíneo durante o processo de reparo. Este evento é regulado pelo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), que exerce vários efeitos no endotélio vascular, incluindo estimulação da proliferação e adesão das células endoteliais, como também a indução rápida da permeabilidade microvascular e da conexão entre os novos vasos com a circulação já existente (PIEPADE *et al.*, 2008).

Várias técnicas terapêuticas (ultrassom, crioterapia, mobilização, laser terapêutico) vêm sendo utilizadas para estimular o processo de regeneração muscular. Entretanto, a

terapia *laser* de baixa intensidade (LLLT) parece ser um recurso promissor para a recuperação do músculo esquelético e sua efetividade tem sido demonstrada ao longo dos anos (SOUZA *et al.*, 2001; MESQUITA-FERRARI *et al.*, 2011). Vários estudos têm confirmado que a irradiação *laser* favorece a regeneração muscular pois aumenta o número de fibras musculares, estimula a angiogênese e a formação de miotubos, modulando a fase inflamatória e acelerando as fases proliferativas e de maturação do processo de regeneração muscular (AMARAL *et al.*, 2001; CRESSONI *et al.*, 2008).

Apesar dos efeitos estimulatórios do laser no reparo tecidual, o uso de uma variedade de doses entre os estudos torna difícil comparar os resultados publicados e determinar os melhores parâmetros para induzir a melhor resposta tecidual (ABE *et al.*, 1993; KHADRA *et al.*, 2005; ALBERTINI *et al.*, 2007; PRABHU *et al.*, 2012). Por essa razão, para a LLLT poder ser usado com confiança como tratamento na clínica, existe a necessidade de se investigar os efeitos de diferentes fluências, determinando os parâmetros mais eficazes e seguros.

Este estudo foi desenvolvido com o intuito de avaliar as respostas biológicas da irradiação laser durante a regeneração muscular após criolesão em ratos. A criolesão é um modelo de lesão bem reconhecido por induzir necrose seguido de regeneração em uma área delimitada do músculo esquelético (BIBIKOVA e ORON, 1993; MIYABARA *et al.*, 2006; BAPTISTA *et al.*, 2009).

Baseado no exposto acima foi hipotetizado que a LLLT pode melhorar o metabolismo tecidual no local da lesão, modulando o recrutamento celular, através da estimulação da expressão de marcadores miogênicos e aumentando a neoangiogênese durante o processo de regeneração muscular e a maturação das miofibras. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a influência temporal da terapia laser (comparando duas fluências diferentes), no processo inflamatório, tecido de granulação, estrutura tecidual,

número de vasos sanguíneos e presença de imunomarcadores durante a regeneração do músculo tibial anterior (TA).

5.2. MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1. Delineamento Experimental

Sessenta e três ratos machos *Wistar* (pesando 300 ± 20 g) foram utilizados neste estudo. Os animais foram mantidos sob temperatura controlada (22 ± 2 °C), período claro-escuro de 12 horas, e acesso livre a água e ração comercial. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) (Parecer – 068/2009).

Os animais foram randomicamente distribuídos em 3 grupos: grupo controle lesado (GC) – animais lesados sem nenhum tratamento; grupo lesado e tratado com 10 J/cm^2 (G10) e grupo lesado e tratado com 50 J/cm^2 (G50). Cada grupo foi dividido em 3 subgrupos diferentes ($n=7$) e nos dias 7, 14 e 21 após lesão os animais foram eutanasiados. Os tratamentos começaram 48 horas depois da indução da lesão e foram realizados a cada 24 horas durante 5, 10 e 15 sessões.

5.2.2. Criolesão

A criolesão foi baseada no estudo de Miyabara *et al.* (2006) e foi realizada sob anestesia com solução de Ketamina/Xilazina (80/10 mg/Kg). Depois da anestesia, a pele que

recobre o músculo TA esquerdo foi tricotomizada e limpa. Então, uma incisão transversal (aproximadamente de 1 cm) foi realizada na pele para expor o músculo. A extremidade (0.5 cm²) de uma barra de ferro retangular, pré-congelada em nitrogênio líquido, foi pressionada por 10 segundos no centro do ventre muscular. O procedimento foi repetido 2 vezes consecutivas, com um intervalo de 30 segundos. Finalmente, a pele foi suturada e assim, os animais foram dispostos em lugar aquecido (37°C) para prevenir hipotermia.

5.2.3. Protocolo de Tratamento

O laser InGaAlP com comprimento de onda contínuo de 660 nm (MM Optics, São Carlos equipamentos, SP, Brazil), área do feixe de 0.04 cm², com 10 J/cm² (potência de saída de 20 mW, densidade de potência de 50 W/cm², 20 segundos de irradiação, energia total por ponto de 0.4 J) e 50 J/cm² (potência de saída de 40 mW, densidade de potência de 100 W/cm², 50 segundos de irradiação, energia total por ponto de 2 J), foi usado neste estudo. A irradiação foi realizada em um único ponto sobre a área lesada, através da técnica pontual em contato. O tratamento começou 48 horas após a lesão e foi efetuado 5 vezes por semana (cada 24 horas), seguido de um intervalo de 48 horas. Nos dias 7, 14 e 21 pós-lesão, os animais foram sacrificados por overdose de anestésico.

5.2.4. Análise Histológica

Os músculos obtidos de todos os grupos experimentais e controles foram lavados imediatamente em salina e foram fixados em formalina tamponada 10% (Merck, Darmstadt, Germany) por 24 horas, seguido da inclusão em parafina. Secções transversais (5 µm) foram

realizadas usando um micrótomo (Leica Microsystems SP 1600, Nussloch, Germany). Cinco secções de cada amostra foram coradas com Hematoxilina e Eosina (HE stain, Merck) e examinadas através de um microscópio de luz com uma objetiva 10X (Leica Microsystems AG, Wetzlar, Germany). As análises qualitativas consideraram qualquer alteração na área lesada, como presença de processo inflamatório, degeneração das fibras musculares focal ou difusa e estrutura tecidual (RENNO *et al.*, 2011).

5.2.5. Morfometria da Área Lesada

Para realizar as avaliações morfométricas, fotomicrografias de toda região da área lesada e da área não lesada do músculo TA foram realizadas, permitindo reconstruir a área de secção transversal total do músculo, e também, permitindo a identificação e medição das áreas lesadas e não lesadas. As medidas das área de secção transversal da área lesada e da área não lesada foram efetuadas usando o software de morfometria (Axiovision 3.0.6 SP4, Carl Zeiss, Jena, Germany). Um procedimento duplo-cego foi realizado durante as medidas (ASSIS *et al.*, 2012).

5.2.6. Número de Vasos Sanguíneos

Para determinar a quantidade de vasos sanguíneos da área lesada, cinco campos de diferentes regiões acompanhando a área lesada foram adquiridos pelo microscópio de luz (Olympus, Optical Co. Ltd, Tokyo, Japan) com uma objetiva de 40X. O número de vasos sanguíneos foram contados em cada campo através do software (Axiovision 3.0.6 SP4, Carl Zeiss, Jena, Germany), e então, a média do número de vasos sanguíneos por animal e por grupo foi calculada (STRAFACE *et al.*, 2009; VATANSEVER *et al.*, 2012).

5.2.7. Imunohistoquímica

Para a realização da imunohistoquímica foram confeccionadas lâminas histológicas com cortes seriados de 5 µm de espessura. As lâminas foram imersas em solução de tampão citrato a 10 mM (pH 6,0) em microondas (850W - Brastemp, SP, Brazil) por três ciclos de cinco minutos cada para recuperação antigênica. O material foi pré-incubado com peróxido de hidrogênio a 0,3% em solução de tampão fosfato (PBS) por dez minutos. As amostras foram incubadas com anti-MyoD e anti-Miogenina, anticorpos primários policlonais (Santa Cruz Biotechnology, USA), na concentração de 1:400. A incubação foi realizada em refrigerador (a 4oC), seguida de dois banhos em solução de PBS, com duração de cinco minutos cada. A seguir, os cortes foram incubados com biotina conjugada ao anticorpo secundário anti-IgG (imunoglobulina G) de coelho (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) na concentração de 1:200 em PBS por uma hora. Na sequência, os cortes foram lavados duas vezes com PBS, seguido por aplicação de complexo pré-formado de avidina-biotina-peroxidase (Vector Laboratories) por 45 minutos. Os complexos foram visualizados por meio da aplicação de solução de 3-3'-diaminobenzidina a 0,05% e contra-corados com Hematoxilina de Harris. Como controle dos anticorpos, cortes histológicos foram tratados com o anticorpo de coelho IgG (Vector Laboratories) na concentração de 1:200, omitindo-se o anticorpo primário. Além disso, foram realizados controles positivos internos em cada bateria da reação realizada.

Os dados imunohistoquímicos foram avaliados por um patologista experiente (DAR) baseada na metodologia de (RENNO *et al.*, 2011).

5.2.8. Análise Estatística

Os dados foram analisados estatisticamente por meio de técnicas descritivas, na forma de médias e desvios-padrão. Os dados da morfometria da área lesada e do número de vasos sanguíneos foram feitos utilizando testes de análise de variância (ANOVA two-way), seguidos do post-hoc de Tukey. As análises foram realizadas no software STATISTICA, versão 7.0. Para as conclusões das análises estatísticas foi utilizado o nível de significância de 5 % ($p \leq 0.05$).

5.3. RESULTADOS

5.3.1. Análises Histológicas

Sete dias após a indução da criolesão o GC apresentou intensa resposta inflamatória e degeneração miofibrilar visualizada de forma difusa, com a presença de tecido de granulação e poucas fibras musculares jovens com o núcleo centralizado (Figura 13A). No G10 também foi possível observar uma resposta inflamatória difusa, com presença de tecido de granulação, porém menos intenso quando comparado com o GC no mesmo período. Além disso, neste mesmo grupo é possível verificar uma maior presença de fibras musculares jovens em relação ao GC (Figura 13B). Respostas similares ao grupo G10, em relação a resposta inflamatória, foram encontradas no grupo G50, depois de 7 dias. Entretanto, o tecido de granulação foi menos intenso neste grupo do que no GC e no G10, e a presença de fibras musculares jovens foi maior no G50 quando comparado com o GC e G10, neste mesmo período (Figura 13C).

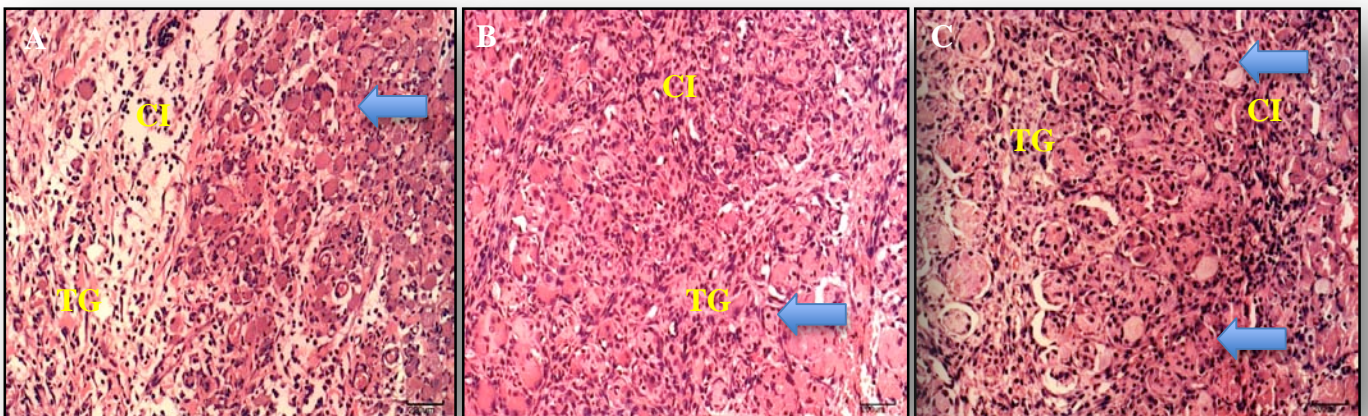


Figura 13: Fotomicrografias da secção transversa dos músculos lesados depois de 7 dias de cirurgia.

(GC) grupo controle lesado, (G10) animais irradiados com 10 J/cm^2 , (G50) animais irradiados com 50 J/cm^2 . (TG) Indicam tecido de granulação; (setas) Indicam fibras musculares jovens com núcleo centralizado; (CI) indicam células inflamatórias e degeneração miofibrilar. (Coloração: H.E., 10 X).

Após 14 dias de lesão, o GC ainda apresentou uma resposta inflamatória difusa e tecido de granulação, porém menos intenso quando comparado ao mesmo grupo depois de 7 dias de lesão; assim como, fibras musculares jovens são visualizadas entre as células inflamatórias (Figura 14A). Em relação ao G10, células inflamatórias e tecido de granulação estão presentes, porém menos intensos do que o GC. Além disso, uma grande presença de fibras musculares jovens adquirindo uma organização em feixes musculares são visualizadas (Figura 14B). No G50 é possível observar uma reduzida presença de células inflamatórias e tecido de granulação em relação ao GC e ao G10, como também existe a presença de fibras musculares jovens mais organizadas do que o GC e o G10 (figura 14C).

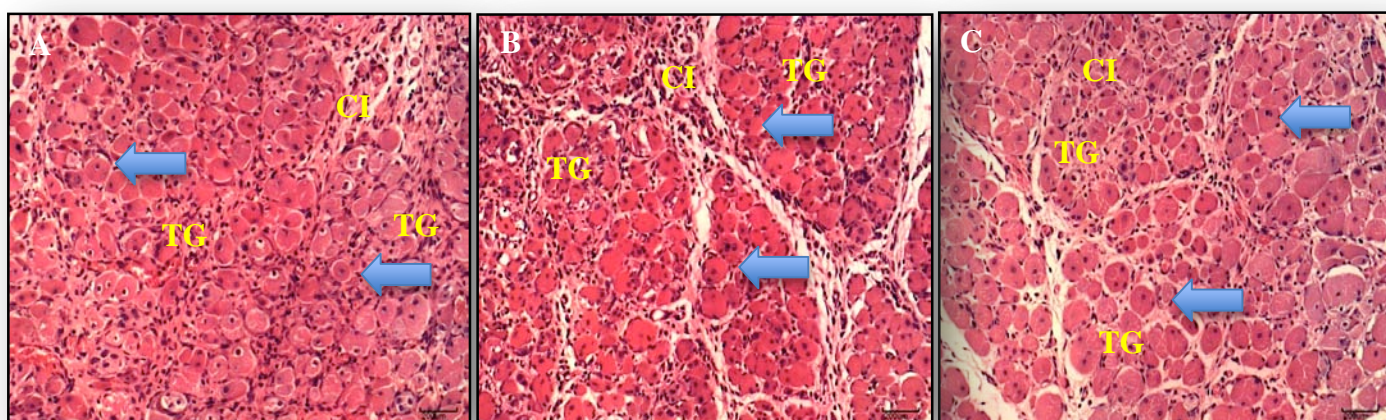


Figura 14: Fotomicrografias da secção transversa dos músculos lesados depois de 14 dias de cirurgia. (GC) grupo controle lesado, (G10) animais irradiados com 10 J/cm^2 , (G50) animais irradiados com 50 J/cm^2 . (TG) Indicam tecido de granulação; (setas) Indicam fibras musculares jovens com núcleo centralizado; (CI) indicam células inflamatórias. (Coloração: H.E., 10 X).

Vinte e um dias após a criolesão, todos os grupos não apresentaram processo inflamatório e tecido de granulação. O GC apresentou grande presença de fibras musculares jovens, onde a maioria apresentava pequeno diâmetro, demonstrando o estágio inicial da

formação das fibras musculares (Figura 15A). No G10, resultados semelhantes ao GC foram observados em relação a presença de fibras musculares jovens com diâmetros pequenos e ausência de células inflamatórias e tecido de granulação (Figura 15B). Depois de 21 dias, no G50 foi observado grande quantidade de fibras musculares jovens com diâmetros variáveis, correspondendo a fibras musculares em fase inicial de formação e outras em um estágio mais avançado com diâmetros maiores, além de estarem dispostas de forma mais organizada do que o GC e o G10 (Figura 15C).

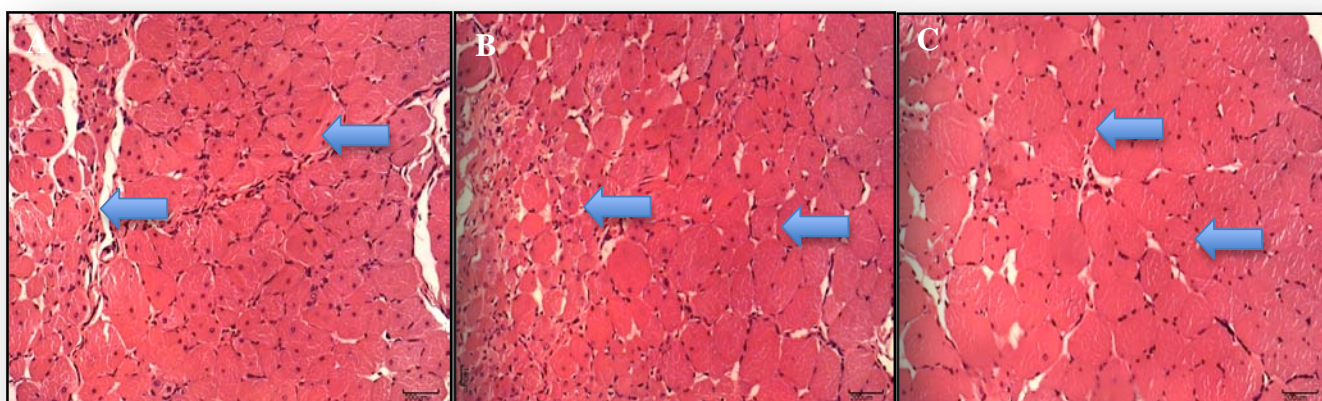


Figura 15: Fotomicrografias da secção transversa dos músculos lesados depois de 21 dias de cirurgia. (GC) grupo controle lesado, (G10) animais irradiados com 10 J/cm^2 , (G50) animais irradiados com 50 J/cm^2 . (seta) Indicam fibras musculares jovens com núcleos centralizados e diferentes diâmetros (Coloração: H.E., 10 X).

5.3.2. Imunohistoquímica

A expressão da Miogenina e da MyoD foram detectadas nos núcleos das células musculares.

Imunoexpressão da Miogenina

Após 7 dias de lesão não foi possível detectar diferença entre todos os grupos GC, G10 e G50 apresentaram uma intensa imunoexpressão da Miogenina no núcleo das fibras musculares do GC (Figura 16A, 16B e 16C).

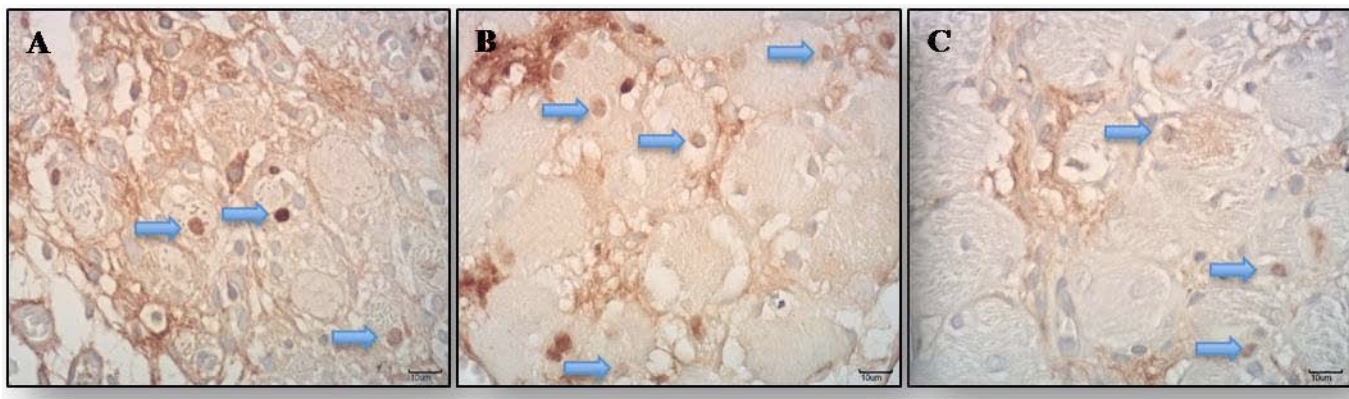


Figura 16: Fotomicrografias representativas da imunoexpressão da Miogenina após 7 dias. (A) grupo controle lesado (GC); (B) grupo lesado e irradiado com 10 J/cm^2 (G10); (C) grupo lesado e irradiado com 50 J/cm^2 (G50). Imunoexpressão da Miogenina (seta). (Imunohistoquímica, 40 X).

No décimo quarto dia após a lesão um grau moderado de fibras musculares com núcleos marcados apresentaram imunoexpressão da Miogenina no GC (Figura 17A). No G10 e no G50 foi possível evidenciar uma intensa presença de núcleos das fibras musculares imunomarcados com Miogenina em relação ao GC (Figura 17B e 17C). Não houve diferença entre o G10 e o G50.

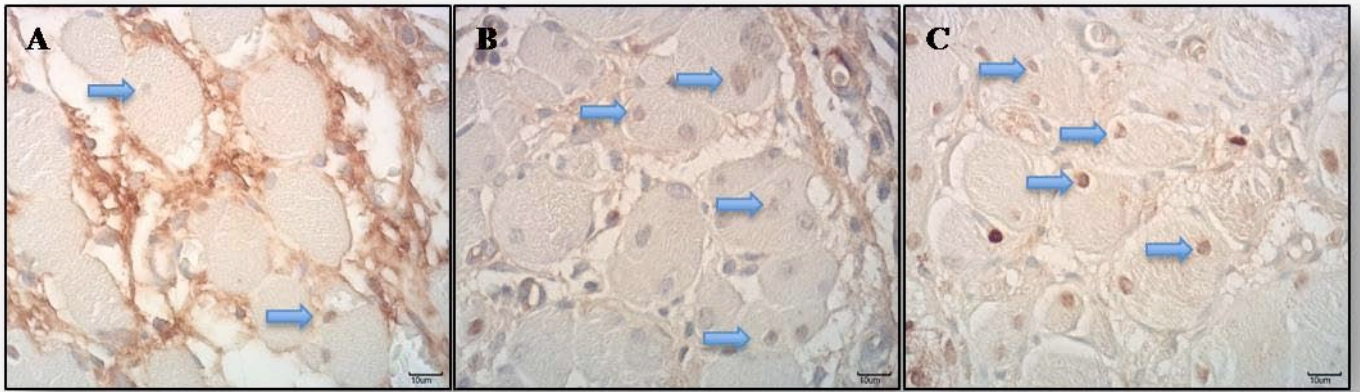


Figura 17: Fotomicrografias representativas da imunoexpressão da Miogenina após 14 dias. (A) grupo controle lesado (GC); (B) grupo lesado e irradiado com 10 J/cm^2 (G10); (C) grupo lesado e irradiado com 50 J/cm^2 (G50). Imunoexpressão da Miogenina (seta). (Imunohistoquímica, 40 X).

Vinte e um dias após a lesão, a expressão da Miogenina foi observada nos núcleos das fibras musculares de forma intensa no GC e no G10 (figura 18A e 18B). No mesmo período, o G50 apresentou leve imunoexpressão da Miogenina quando comparado ao GC e o G10 (Figura 18C).

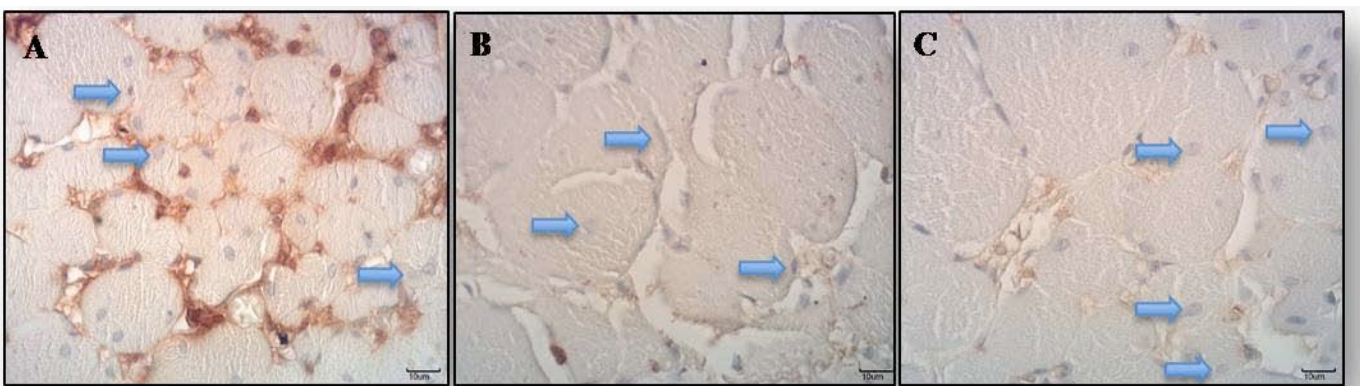


Figura 18: Fotomicrografias representativas da imunoexpressão da Miogenina após 21 dias. (A) grupo controle lesado (GC); (B) grupo lesado e irradiado com 10 J/cm^2 (G10); (C) grupo lesado e irradiado com 50 J/cm^2 (G50). Imunoexpressão da Miogenina (seta). (Coloração: Imunohistoquímica, 40 X).

Imunoexpressão da MyoD

Após sete dias o GC apresentou leve imunoexpressão da MyoD nos núcleos das fibras musculares (Figura 19A). Neste mesmo período, no G10 (Figura 19B) foi possível observar uma moderada presença dos núcleos das fibras musculares imunomarcadas em relação ao GC. Em relação ao G50 (Figura 19C), resultados similares ao GC foram encontrados, com leve imunomarcação da MyoD.

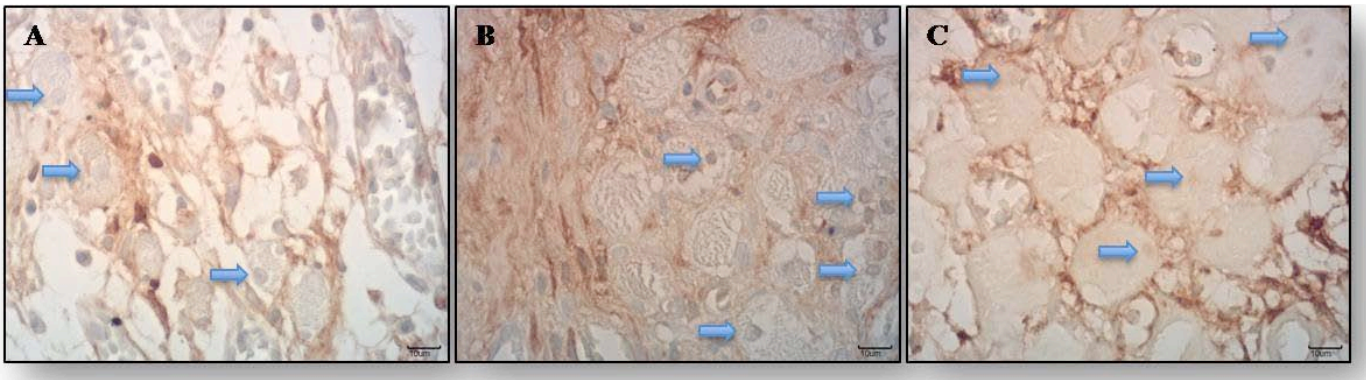


Figura 19: Fotomicrografias representativas da imunoexpressão da MyoD após 7 dias. (A) grupo controle lesado (GC); (B) grupo lesado e irradiado com 10 J/cm^2 (G10); (C) grupo lesado e irradiado com 50 J/cm^2 (G50). Imunoexpressão da MyoD (seta). (Imunohistoquímica, 40 X).

No décimo quarto dia após lesão, o GC apresentou moderado grau de imunoexpressão da MyoD (Figura 20A). Na análise do G10 e do G50, foi possível verificar uma intensa presença de núcleos das fibras musculares imunomarcadas com MyoD (Figura 20B e 20C) quando comparado ao GC. Não houve diferença entre o G10 e G50.

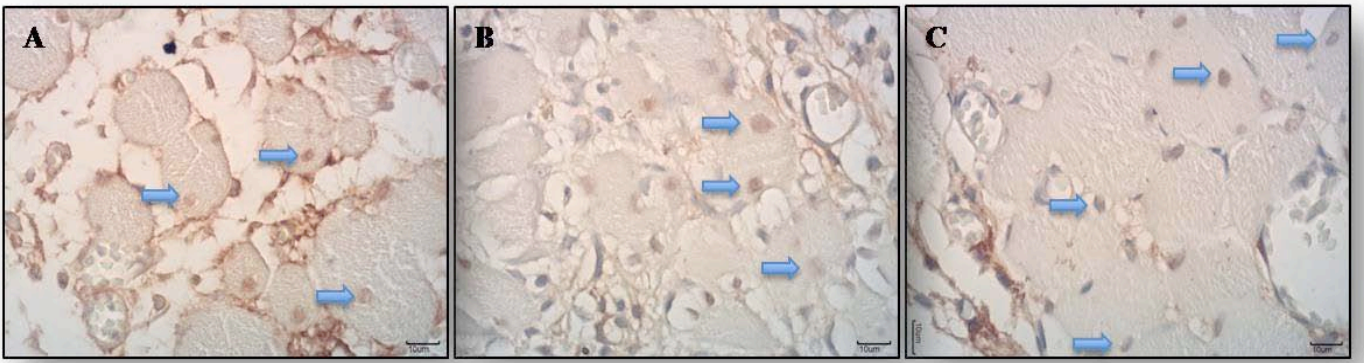


Figura 20: Fotomicrografias representativas da imunoexpressão da MyoD após 14 dias. (A) grupo controle lesado (GC); (B) grupo lesado e irradiado com 10 J/cm^2 (G10); (C) grupo lesado e irradiado com 50 J/cm^2 (G50). Imunoexpressão da MyoD (seta). (Imunohistoquímica, 40 X).

Vinte e um dias após a indução da criolesão, o GC apresentou leve grau de imunoexpressão da MyoD nos núcleos das fibras musculares (Figura 21A). No entanto, no G10 e no G50 foi possível verificar um moderado grau de imunoexpressão da MyoD (Figura 21B e 21C) comparado ao GC.

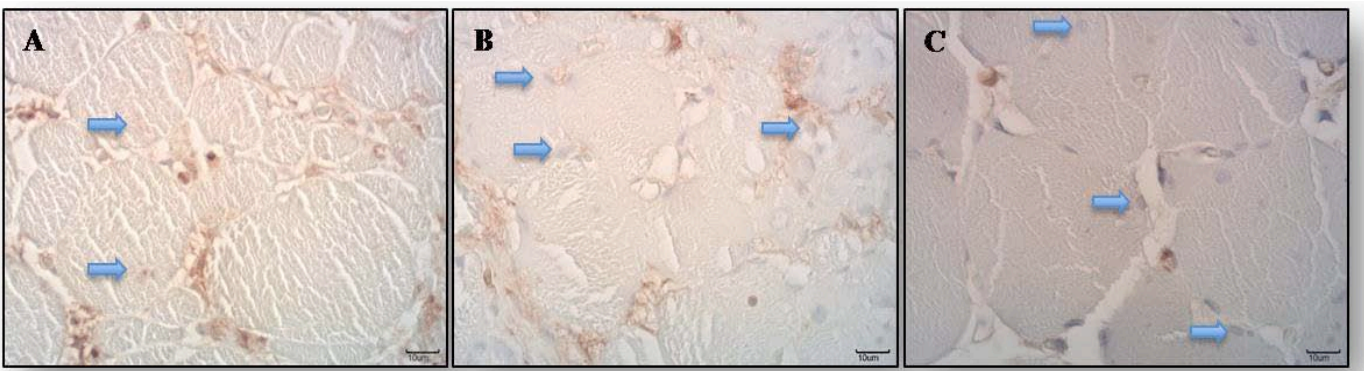


Figura 21: Fotomicrografias representativas da imunoexpressão da MyoD após 21 dias. (A) grupo controle lesado (GC); (B) grupo lesado e irradiado com 10 J/cm^2 (G10); (C) grupo lesado e irradiado com 50 J/cm^2 (G50). Imunoexpressão da MyoD (seta). (Imunohistoquímica, 40 X).

5.3.3. Morfometria da Área Lesada

A figura 22 mostra a morfometria das áreas lesadas em 3 diferentes períodos experimentais. No primeiro período experimental, o laser com as duas fluências (GC vs. G10 $p < 0,000249$; GC vs. G50 $p < 0,000145$) diminuiu significativamente a área lesada quando comparada ao GC. Após 14 dias e 21 dias de lesão, todos os grupos avaliados não apresentaram diferença significativa em relação as medidas das áreas lesadas.

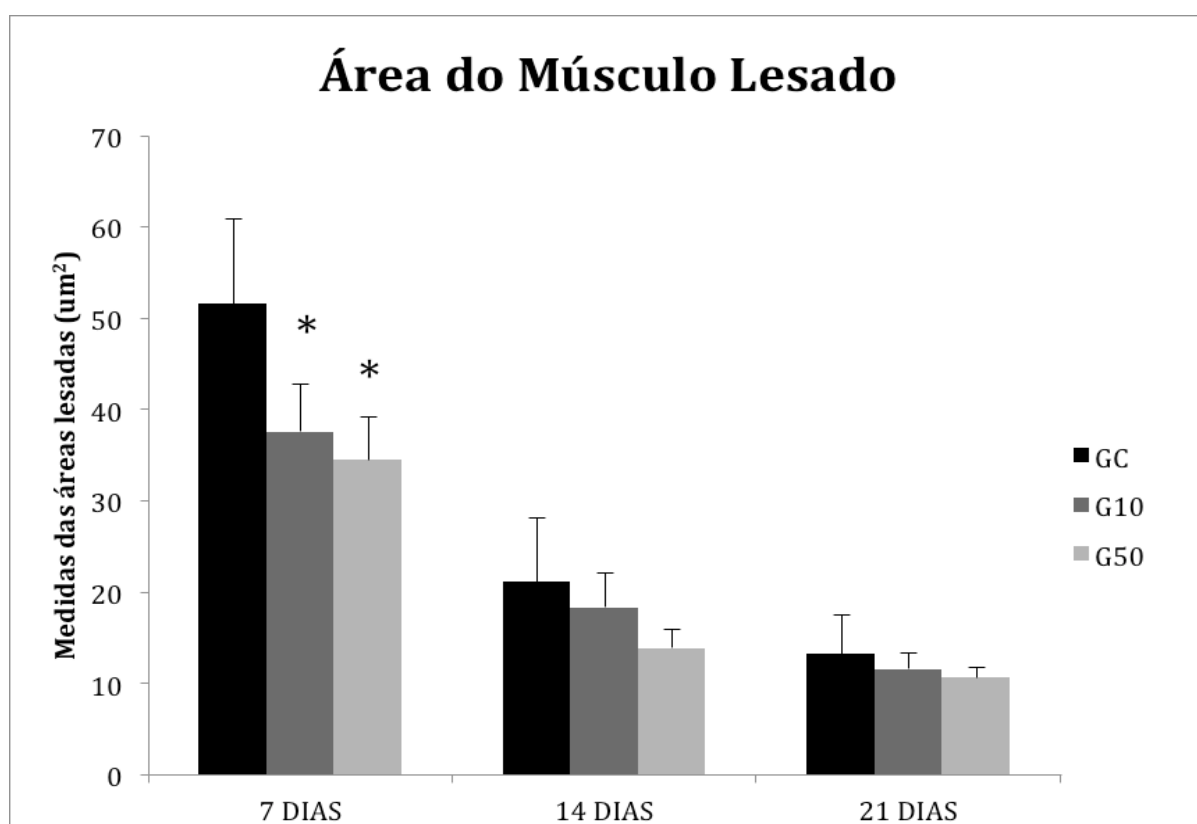


Figure 22: Média e desvio padrão das áreas lesadas. GC: grupo controle lesado; G10: grupo lesado e tratado com 10J/cm²; G50: grupo lesado e tratado com 50J/cm². * $p \leq 0.05$ versus CG.

5.3.4. Número de Vasos Sanguíneos

Sete dias após a lesão nenhuma diferença estatística foi evidenciada entre os grupos GC, G10 e G50. No segundo período experimental avaliado, o número de vasos sanguíneos foi estatisticamente maior no grupo lesado e tratado com 50 J/cm² (p<0,0183) comparado com o grupo G10, porém não apresentou diferença significativa em relação ao GC. Similarmente, 21 dias após a cirurgia, o número de vasos sanguíneos também foi estatisticamente maior no grupo G50 (p<0,005) quando comparado com o grupo GC, e também, a quantidade de vasos sanguíneos do G50 foi significativamente maior do que o G10 (p<0,02) (Figura 23).

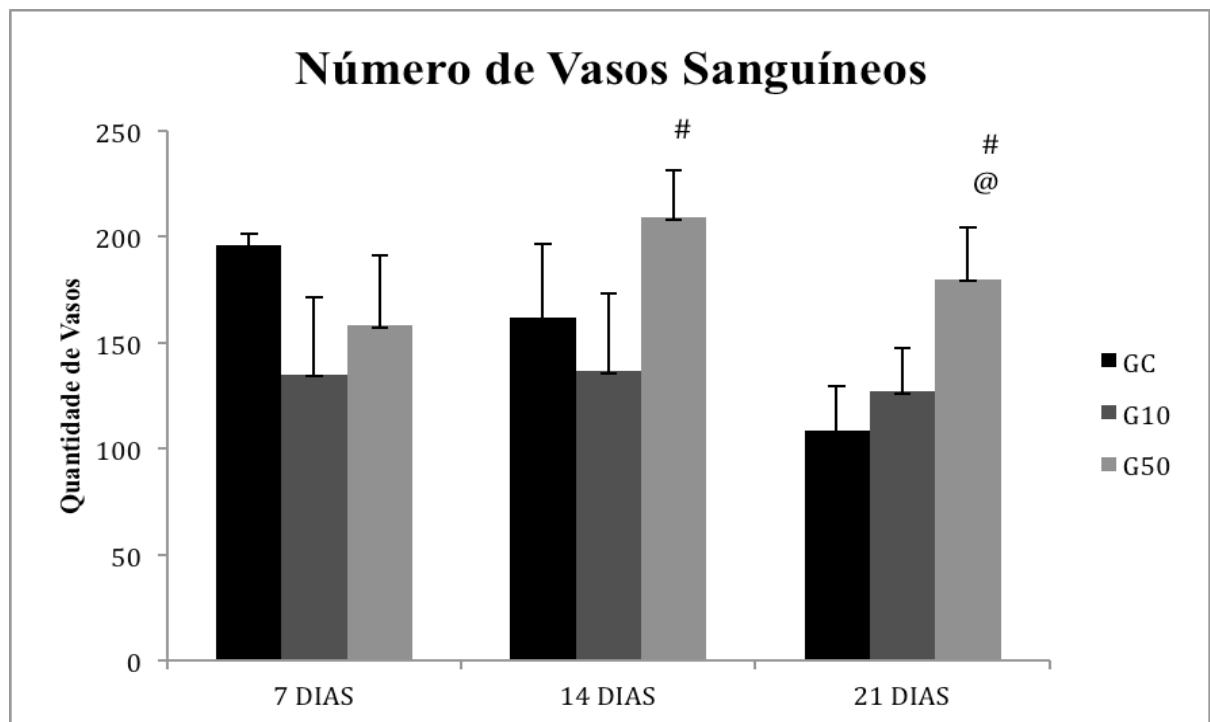


Figure 23: Média e desvio padrão do número de vasos sanguíneos. GC: grupo controle lesado; G10: grupo lesado e tratado com 10J/cm²; G50: grupo lesado e tratado com 50J/cm². # p≤0.05 versus G10, @ p≤0.05 versus GC.

5.4. DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou a resposta decorrente da aplicação da LLLT em um modelo de criolesão do músculo TA de ratos. Foi hipotetizado que a terapia laser aumenta o metabolismo muscular, acelerando o processo de reparo. Os principais achados demonstraram que os grupos irradiados, com as duas fluências avaliadas, apresentaram um melhor padrão histológico, com menor área de necrose nos grupos irradiados depois de 7 dias de lesão. Entretanto, o grupo irradiado com a fluência mais alta apresentou um recrutamento precoce de infiltrado celular, grande quantidade de fibras musculares jovens, maior quantidade de vasos sanguíneos e uma estrutura tecidual mais organizada no local da lesão. As análises de imunohistoquímica revelaram expressão da Miogenina em todos os grupos avaliados depois de 7, 14 e 21 dias, como também, houve um aumento da expressão da MyoD nos grupos irradiados depois de 14 e 21 dias de tratamento.

A fototerapia é baseada na fotobioestimulação de células e tecidos (MESQUITA-FERRARI *et al.*, 2011), e por isso, vários estudos tem investigado os efeitos da LLLT em diferentes condições patológicas durante o reparo tecidual (DEMIDOVA-RICE *et al.*, 2007; PALLOTTA *et al.*, 2010; PIRES *et al.*, 2011). Dourado *et al.* (2003) mostraram que a terapia laser (904 nm; 4 J/cm²; 62 segundos) reduziu a mionecrose. Lakyova *et al.* (2010) demonstraram que a LLLT (670 nm) estimula a neovascularização muscular em ratos. Também, Silveira *et al.*, 2009, tem demonstrado que a LLLT (904 nm) aumenta a síntese de ATP e acelera a processo de regeneração muscular.

As análises histológicas e morfométricas mostraram que a terapia laser modulou o processo inflamatório induzido pela criolesão. Esta resposta pode ser um reflexo dos efeitos positivos da LLLT na regeneração muscular, evidenciando seu potencial através de sua

capacidade de ativar células satélites e miogênicas, culminando na formação de fibras musculares e na melhor organização tecidual no local da lesão. Tais dados corroboram com Melo *et al.* (2011), que afirmaram que a terapia laser diminui o número de células inflamatórias e aumenta a quantidade de fibras elásticas, o que poderia explicar o efeito da LLLT em acelerar o processo de reparo tecidual. Renno *et al.* (2011) comparando os efeitos da terapia laser 830 nm e o ultrassom pulsado de baixa intensidade (US) na regeneração muscular, observaram que os animais tratados com laser apresentaram menor degeneração tecidual quando comparado com o grupo controle e o grupo tratado com o US. O mesmo resultado foi encontrado por Demir *et al.* (2004), que observaram que a irradiação laser (904 nm; 1 J/cm²; 6 mW) foi mais efetiva em acelerar o reparo de feridas do que o US.

As análises de imunohistoquímica mostraram que a terapia *laser*, com as duas fluências analisadas, estimularam a expressão da Miogenina e da MyoD durante o processo de regeneração muscular. Sabe-se que a Miogenina e a MyoD tem uma função regulatória durante o processo de plasticidade, adaptação e regeneração do músculo adulto (DEDKOV *et al.*, 2003; WARREN *et al.*, 2007; FRIEDRICHS *et al.*, 2011), por estimular a diferenciação das células satélites (MARSH *et al.*, 1997). Estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram um aumento de células precursoras musculares e fibras musculares imunomarcadas com Miogenina e MyoD depois de 3 e 5 dias (COOPER *et al.*, 1999; GREFTE *et al.*, 2012). Além disso, Zador *et al.* (2002) demonstraram que os níveis da proteína da MyoD aumentaram no primeiro dia após lesão muscular, mantendo esses níveis até o terceiro dia, quando começou a diminuir gradualmente até o vigésimo oitavo dia após lesão. Apesar da escassez de estudos avaliando a imunexpressão das MRFs durante a regeneração muscular, com ou sem tratamento, e apesar da análise de imunohistoquímica desenvolvida neste estudo ter sido qualitativa, podemos sugerir que a LLLT estimulou a imunexpressão da MyoD e da Miogenina em todos os períodos (7, 14 e 21 dias). Quando a

LLLT é aplicada no tecido, a luz é absorvida e pode modular as reações bioquímicas celulares, aumentando a síntese de DNA, RNA e das proteínas regulatórias do ciclo celular (KARU e LUBART, 2000; STEIN *et al.*, 2005). Por esse motivo, os efeitos citados da LLLT podem ter induzido a expressão da Miogenina e da MyoD, estimulando a formação e melhor organização das fibras musculares nos períodos avaliados.

Ainda, o presente estudo demonstrou um efeito da LLLT, principalmente com a fluência de 50 J/cm^2 , estimulando o crescimento de vasos sanguíneos. Uma adequada perfusão sanguínea é essencial para garantir a regeneração do tecido muscular e consequentemente o sucesso do reparo (GONÇALVES *et al.*, 2012). A fotomodulação vascular pode estar associada à redução das células inflamatórias e com a estimulação da migração de macrófagos, linfócitos-T, células endoteliais e fibroblastos para o local da lesão, resultando em um reparo tecidual acelerado (GONÇALVES *et al.*, 2010). Gonçalves *et al.* (2012) mostraram que o laser GaAsAl aplicado com 60 J/cm^2 foi mais eficiente em estimular a neoangiogênese do que 30 J/cm^2 . Do mesmo modo, Iyomasa *et al.* (2009) relataram que a dose de 10 J/cm^2 aumentou a proliferação de fibroblastos e a neoangiogênese durante a regeneração muscular.

Diante do exposto, pode-se sugerir que os efeitos da LLLT seguiram um padrão dose-dependente, onde os grupos tratados com a maior dose apresentaram a melhor resposta tecidual. Estes resultados corroboram com outros estudos, como Liu *et al.* (2009), os quais verificaram que a maior dose entre 12, 28 e 43 J/cm^2 da irradiação laser (632.8 nm) foi mais eficiente na redução à resposta inflamatória; Chen *et al.* (2010) também observaram que a LLLT (660 nm) utilizada com 27 e 72 J/cm^2 , apresentou melhores resultados com a maior dose, diminuindo a dor em *trigger points* miofaciais. Entretanto, Frigo *et al.* (2010) demonstraram que a energia de 3 J foi mais eficaz em reduzir a morte celular *in vitro* do que a energia de 21 J. Em relação a fotobiomodulação, Liu *et al.* (2009) descreveram que para a

irradiação laser penetrar na pele seria necessário aumentar a dose, mas Karu (1998) relatou que mais importante do que a dose é a quantidade de energia fornecida ao tecido, a qual irá determinar a qualidade e a quantidade de resposta biológica. Essa descrição poderia explicar o porque da resposta negativa sob a energia de 21 J, encontrada por Frigo *et al.* (2010). Porém, outros estudos são necessários para explicar melhor o efeito dose-dependente da irradiação laser.

Apesar de existir vários estudos evidenciando os efeitos positivos da LLLT durante a regeneração muscular (BIBIKOVA *et al.*, 1993; AMARAL *et al.*, 2001; ALBERTINI *et al.*, 2007; CRESSONI *et al.*, 2008; MESQUITA-FERRARI *et al.*, 2011; VATANSEVER *et al.*, 2012), os parâmetros para uma estimulação ótima ainda necessitam ser determinado e os mecanismos moleculares envolvidos no reparo tecidual precisam ser investigados, explicando também a resposta dose-dependente relacionada ao laser visível.

5.5. CONCLUSÃO

Este estudo revelou que a LLLT teve efeitos positivos no músculo esquelético lesado, principalmente com a maior dose avaliada, acelerando o processo de regeneração muscular pelo aumento de vasos sanguíneos e estimulando a imunoexpressão da Miogenina e da MyoD, o que pode ter resultado em uma melhor organização tecidual no local da lesão. Embora sejam necessários mais estudos clínicos com testes funcionais, os resultados apresentados mostram uma utilização promissora desta modalidade terapêutica no reparo tecidual.

PARTE III

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9. ANEXOS

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base no modelo experimental utilizado neste estudo e nos resultados encontrados, podem-se evidenciar as seguintes conclusões:

- As duas fluências demonstraram recrutar células inflamatórias na fase inicial da lesão, possivelmente acelerando o processo de reparo e induzindo a formação de novas fibras musculares, principalmente nos grupos irradiados com a maior fluência.
- A terapia laser de baixa intensidade (660 nm), na fase inicial e nas duas fluências utilizadas, reduziram a área de lesão muscular induzida pelo modelo de criolesão.
- O processo inflamatório foi modulado pela irradiação laser com as duas fluências utilizadas, porém melhores resultados foram encontrados nos grupos tratados com a maior fluência, pois este recurso estimulou a formação de novos vasos sanguíneos e reduziu a expressão do RNAm do COX-2.
- A irradiação laser utilizada estimulou a regeneração muscular com 10 J/cm² e 50 J/cm², através do aumento da expressão do RNAm do VEGF, MyoD e Miogenina. Entretanto, a maior dose otimizou a resolução da lesão muscular e a formação de novas fibras musculares no local da lesão.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Em relação as perspectivas futuras, estudos realizando análises moleculares precisam ser desenvolvidos, com o intuito de melhor elucidar os mecanismos moleculares ativados pela irradiação laser durante o processo de regeneração muscular. Assim como, estudos envolvendo modelos experimentais em humanos são necessários para confirmar se os efeitos positivos da LLLT na regeneração muscular encontrados em animais e cultura de células ocorrem em humanos, ajudando na seleção de protocolos de tratamento para a reabilitação muscular.

8. REFERÊNCIAS

ABE, M.; FUJISAWA, K.; SUZUKI, H.; SUGIMOTO, T.; KANNO, T. Role of 830nm Low Reactive Level Laser on the Growth of an Implanted Glioma in Mice. **J Med**, v. 4, p. 177-179, 1993.

ALBERTINI, R.; AIMBIRE, F.; VILLAVERDE, A.B.; SILVA, J.A.; COSTA, M.S. COX-2 mRNA expression decreases in the subplantar muscle of rat paw subjected to carrageenan-induced inflammation after low level laser therapy. **Inflamm Res**, v. 56, p. 228-229, 2007.

ALMEIDA, P.; LOPES-MARTINS, R.A.B.; TOMAZONI, S.S.; JR, J.A.S.; CARVALHO, P.T.C.; BJORDAL, J.M.; JUNIOR, E.C.P.L. Low-level Laser Therapy Improves Skeletal Muscle Performance, Decreases Skeletal Muscle Damage and Modulates mRNA Expression of COX-1 and COX-2 in a Dose-dependent Manner. **Photochemistry and Photobiology**, v. 87, p. 1159–1163, 2011.

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

ARONEN, J.G.; GARRICK, J.G.; CHRONISTER, R.D.; MCDEVITT, E.R. Quadriceps contusions: clinical results of immediate immobilization in 120 degrees of knee flexion. **Clin J Sport Med**, v. 16, p. 383-387, 2006.

ARSIC, N.; ZACCHIGNA, S.; ZENTILIN, L.; RAMIREZ-CORREA, G.; PATTARINI, L.; SALVI, A.; SINAGRA, G.; GIACCA, M. Vascular endothelial growth factor stimulates skeletal muscle regeneration *in vivo*. **Mol Ther**, v. 10, p. 844-854, 2004.

ASSIS, L.; MORETTI, A.I.S.; ABRAHÃO, T.B.; DE SOUZA, H.P.; HAMBLIN, M.R.; PARIZOTTO, N.A. Low-level *laser* therapy (808 nm) contributes to muscle regeneration and prevents fibrosis in rat tibialis anterior muscle after cryolesion. **Lasers Med Sci**, v. 44, p. 726-735, 2012.

BAOGE, L.; VAN DEN STEEN, E.; RIMBAUT, S.; PHILIPS, N.; WITVROUW, E.;

ALMQVIST, K.F.; VANDERSTRAETEN, G.; VANDEN BOSSCHE, L. C. Treatment of Skeletal Muscle Injury: A Review. **ISRN Orthop**, p. 1-7, 2012.

BAPTISTA, R.R.; SCHEEREN, E.M.; MACINTOSH, B.R.; VAZ, M.A. Low-frequency fatigue at maximal and submaximal muscle contractions. **Braz J Med Biol Res**, v. 42, p. 380-385, 2009.

BARBOSA, A.M.; VILLAVERDE, A.B.; GUIMARÃES-SOUSA, L.; MUNIN, E.; FERNANDEZ, C.M.; COGO, J.C.; ZAMUNER, S.R. Effect of Low-Level Laser Therapy in the Myonecrosis Induced by *Bothrops jararacussu* Snake Venom. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 27, p. 591–597, 2009.

BARBOSA, A.M.; VILLAVERDE, A.B.; GUIMARÃES-SOUSA, L.; SOARES, A.M.; ZAMUNER, S.F.; COGO, J.C.; ZAMUNER, S.R. Low-level laser therapy decreases local effects induced by myotoxins isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 16, p. 470-479, 2010.

BAXTER, G.D. Therapeutic Lasers: theory and practice. **United States of America: Ed. Churchill Livingstone**, 1997.

BEDAIR, H.S.; HO, A.M.; FU, F.H.; HUARD, J. Skeletal muscle regeneration: an update on recent findings. **Curr Opin Orthop**, v. 15, p. 360–363, 2004.

BEDAIR, V.S.; HO, A.M.; FU, F.; HUARD, J. Skeletal muscle regeneration: an update on recent findings. **Current Opinion in Orthopaedics**, v. 15, p. 360-363, 2004.

BEN-DOV, N.; SHEFER, G.; IRINITCHEV, A.; WERNIG, A.; ORON, U.; HALEVY, O. Low-energy laser irradiation affects satellite cell proliferation and differentiation in vitro. **Biochimica et Biophysica**, v. 1448, p. 372-380, 1999.

BEST, T.M. Reducing risk of injury due to exercise. **BMJ**, v. 325, p. 451–452, 2002.

BIBIKOVA, A.; ORON, U. Attenuation of the process of muscle regeneration in the toad gastrocnemius muscle by low energy laser irradiation. **Lasers Surg Med**, v. 14, p. 355-361, 1994.

BIBIKOVA, A.; ORON, U. Promotion of muscle regeneration in the toad (*Bufo viridis*) gastrocnemius muscle by low-energy laser irradiation. **Anat Rec**, v. 235, p. 374-380, 1993.

BIBIKOVA, A.; ORON, U. Regeneration in denervated toad (*Bufo viridis*) gastrocnemius muscle and the promotion of the process by low energy laser irradiation. **Anat Rec**, v. 241, p. 123-128, 1995.

BLEAKLEY, C.; MCDONOUGH, S.; MACAULEY, D. The use of ice in the treatment of acute soft tissue injury: a systematic review of randomized controlled trials. **Am J Sports Med**, v. 34, p. 251-261, 2004.

BONDESEN, B.A.; MILLS, S.T.; KEGLEY, K.M.; PAVLATH, G.K. The COX-2 pathway is essential during early stages of skeletal muscle regeneration. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 287, p. 475-483, 2004.

BORSELLI, C.; STORRIE, H.; BENESCH-LEE, F.; SHVARTSMAN, D.; CEZAR, C.; LICHTMAN, J.W.; VANDENBURGH, H.H.; MOONEY, D.J. Functional muscle regeneration with combined delivery of angiogenesis and myogenesis factors. **PNAS**, v. 107, p. 3287-3292, 2010.

BOSSINI, P.S. *Laser de baixa intensidade (670nm) na viabilidade do retalho cutâneo randômico em ratos. Dissertação de Mestrado*, 2007.

BOSSINI, P.S.; FANGEL, R.; HABENSCHUS, R.M.; RENNO, A.C.; BENZE, B.; ZUANON, J.A.; NETO, C.B.; PARIZOTTO, N.A. Low-level laser therapy (670 nm) on viability of random skin flap in rats. **Lasers Med Sci**, v. 24, p. 209-213, 2009.

BRYAN, B.A.; WALSH, T.E.; DIANNE C. MITCHELL, D.C.; HAVUMAKI, J.S.; SAINT-GENIEZ, M.; MAHARAJ, A.S.; MALDONADO, A.E.; D'AMORE, P.A. Coordinated Vascular Endothelial Growth Factor Expression and Signaling During Skeletal

Myogenic Differentiation. **Molecular Biology of the Cell**, v. 19, p. 994-1006, 2008.

CHARGE, S.B.P.; RUDNICKI, M.A. Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration. **Physiol Rev**, v. 84, p. 209–238, 2004.

CHEN, K.; HONG, C.; HSU, H.; WU, S.; KUO, F.; HSIEH, Y. Dose-dependent and Ceiling Effects of Therapeutic Laser on Myofascial Trigger Spots in Rabbit Skeletal Muscles. **Journal of Musculoskeletal Pain**, v. 18, p. 235-245, 2010.

COOPER, R.N.; TAJBAKSH, S.; MOULY, V.; COSSU, G.; BUCKINGHAM, M.; BUTLER-BROWNE, G.S. *In vivo* satellite cell activation via Myf5 and MyoD in regenerating mouse skeletal muscle. **Journal of Cell Science**, v. 112, p. 2895-2901, 1999.

CRESSONI, M.D.; GIUSTI, H.H.D.; CASAROTTO, R.A.; ANARUMA, C.A. The Effects of a 785-nm AlGaInP Laser on the Regeneration of Rat Anterior Tibialis Muscle After Surgically-Induced Injury. **Photomed Laser Surg**, v. 26, p. 461-466, 2008.

DE DEYNE, P.G.; KINSEY, S.; YOSHINO, S.; JENSEN-VICK, K. The adaptation of soleus and edl in a rat model of distraction osteogenesis: IGF-1 and fibrosis. **J Orthop Res**, v. 20, p. 1225-1231, 2002.

DE MARCHI, T.; LEAL JUNIOR, E.C.; BORTOLI, C.; TOMAZONI, S.S.; LOPES-MARTINS, R.A.; SALVADOR, M. Low-level laser therapy (LLLT) in human progressive-intensity running: effects on exercise performance, skeletal muscle status, and oxidative stress. **Lasers Med Sci**, v. 27, p. 231-236, 2012.

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

DEGENS, H.; SWISHER, A.K.; HEIJDR, Y.F.; SIU, P.M.; DEKHUIJZEN, P.N.; ALWAY, S.E. Apoptosis and Id2 expression in diaphragm and soleus muscle from the emphysematous hamster. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 293, p. 135-144, 2007.

DEMIDOVA-RICE, T.N.; SALOMATINA, E.V.; YAROSLAVSKY; A.N.; HERMAN, I.M.; HAMBLIN, M.R. Low-Level Light Stimulates Excisional Wound Healing in Mice. **Lasers Surg Med**, v. 39, p. 706-715, 2007.

DEMIR, H.; MENKU, P.; KIRNAP, M.; CALIS, M.; IKIZCELI, I. Comparison of the effects of laser, ultrasound, and combined laser + ultrasound treatments in experimental tendon healing. **Lasers Surg Med**, v. 35, p. 84-89, 2004.

DIAS, F.J.; ISSA, J.P.; BARBOSA, A.P.; DE VASCONCELOS, P.B.; WATANABE, I.S.; MIZUSAKIYOMASA, M. Effects of low-level laser irradiation in ultrastructural morphology and immunoexpression of VEGF and VEGFR-2 of rat masseter muscle. **Micron**, v. 43, p. 237-244, 2012.

DOURADO, D.M.; FAVERO, S.; BARANAUSKAS, V.; FLING, M.A.C. Effects of the Ga-As Laser Irradiation on Myonecrosis Caused by Bothrops Moojeni Snake Venom. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 33, p. 352–357, 2003.

DOURADO, D.M.; FÁVERO, S.; MATIAS, R.; CARVALHO, P.D.E.T.; DA CRUZ-HÖFLING, M.A. Low-level laser therapy promotes vascular endothelial growth factor receptor-1 expression in endothelial and nonendothelial cells of mice gastrocnemius exposed to snake venom. **Photochem Photobiol**, v. 87, p. 418-426, 2011.

DURIGAN, J.L.Q.; PEVIANI, S.M.; RUSSO, T.L.; DELFINO, G.B.; RIBEIRO, J.U.; COMINETTI, M.R.; ARAUJO, H.S.S.; SALVINIA, T.F. Effects of alternagin-C from *Bothrops alternatus* on gene expression and activity of metalloproteinases in regenerating skeletal muscle. **Toxicon**, v. 52, p. 687-694, 2008.

FARIA, F.E.T.; FERRARI, R.J.; DISTEFANO, G.; DUCATTI, A.C.; SOARES, K.F.; MONTEBELO, M.I.L.; MINAMOTO, V.B. The onset and duration of mobilization affect the regeneration in the rat muscle. **Histol Histopathol**, v. 23, p. 565-571, 2008.

FÁVARO-PIPI, E.; RIBEIRO, D.A.; RIBEIRO, J.U.; BOSSINI, P.; OLIVEIRA, P.; PARIZOTTO, N.A.; TIM, C.; ARAUJO, H.S.S.; RENNO, A.C.M. Low-Level Laser Therapy Induces Differential Expression of Osteogenic Genes During Bone Repair in Rats. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 29, p. 311–317, 2011.

FERNANDES, K.P.; ALVES, A.N.; NUNES, F.D.; SOUZA, N.H.; SILVA, J.A.; BUSSADORI, S.K.; FERRARI, R.A. Effect of photobiomodulation on expression of IL-1 β in skeletal muscle following acute injury. **Lasers Med Sci**, 2012.

FERRARA, N.; GERBER, H.P.; LECOUTER, J. The biology of VEGF and its receptors. **Nat Med**, v. 9, p. 669-676, 2003.

FIASCHI, T.; TEDESCO, F.S.; GIANNONI, E.; DIAZ-MANERA, J.; PARRI, M.; COSSU, G.; CHIARUGI, P. Globular adiponectin as a complete mesoangioblast regulator: role in proliferation, survival, motility, and skeletal muscle differentiation. **Mol Biol Cell**, v. 21, p. 848-859, 2010.

FRIEDRICHS, M.; WIRSDOERFER, F.; FLOHE, S.B.; SCHNEIDER, S.; WUELLING, M.; VORTKAMP, A. BMP signaling balances proliferation and differentiation of muscle satellite cell descendants. **BMC Cell Biol**, v. 12, p. 1-17, 2011.

FRIGO, L.; FÁVERO, G.M.; LIMA, H.J.; MARIA, D.A.; BJORDAL, J.M.; JOENSEN, J.; IVERSEN, V.V.; MARCOS, R.L.; PARIZZOTO, N.A.; *et al.* Low-level laser irradiation (InGaAlP-660 nm) increases fibroblast cell proliferation and reduces cell death in a dose-dependent manner. **Photomed Laser Surg**, v. 28, p. 151-156, 2010.

GAVISH, L.; PEREZ, L.; GERTZ, S.D. Low-Level Laser Irradiation Modulates Matrix Metalloproteinase Activity and Gene Expression in Porcine Aortic Smooth Muscle Cells. **Lasers Surg Med**, v. 38, p. 779-786, 2006.

GHARAIBEH, B.; CHUN-LANSINGER, Y.; HAGEN, T.; INGHAM, S.J.; WRIGHT, V.; FU, F.; HUARD, J. Biological approaches to improve skeletal muscle healing after injury and disease. **Birth Defects Res C Embryo**, v. 96, p. 82-94, 2012.

GHARAIBEH, B.; CHUN-LANSINGER, Y.; HAGEN, T.; INGHAM, S.J.M.; WRIGHT, V.; FU, F.; HUARD, J. Biological Approaches to Improve Skeletal Muscle Healing after Injury and Disease. **Birth Defects Research (Part C)**, v. 96, p. 82-94, 2012.

GONÇALVES, R.V.; NOVAES, R.D.; CUPERTINO, M.C.; MORAES, B.; LEITE, J.P.; PELUZIO, M.C.G.; PINTO, M.V.M.; DA MATTA, S.L. Time-dependent effects of low-level laser therapy on the morphology and oxidative response in the skin wound healing in rats. **Lasers Med Sci**, v. 22, 2012.

GONÇALVES, R.V.; NOVAES, R.D.; MATTA, S.L.; BENEVIDES, G.P.; FARIA, F.R.; PINTO, M.V. Comparative study of the effects of gallium-aluminum-arsenide laser photobiomodulation and healing oil on skin wounds in wistar rats: a histomorphometric study. **Photomed Laser Surg**, v. 28, p. 597-602, 2010.

GREFTE, S.; KUIJPERS, M.A.R.; KUIJPERS-JAGTMAN, A.M.; TORENSMA, R.; VON DEN HOFF, J.W. Myogenic capacity of muscle progenitor cells from head and limb muscles. **Eur J Oral Sci**, v. 120, p. 38-45, 2012.

HAYWORTH, C.R.; ROJAS, J.C.; PADILLA, E.; HOLMES, G.M.; SHERIDAN, E.C.; GONZALEZ-LIMA, F. In Vivo Low-level Light Therapy Increases Cytochrome Oxidase in Skeletal Muscle. **Photochemistry and Photobiology**, v. 86, p. 673-680, 2010.

HERMAN, J.H.; KHOSLA, R.C. Nd:YAG *laser* modulation of synovial tissue metabolism. **Clin Exp Rheumatol**, v. 7, p. 505-512, 1989.

HUARD, J.; LI, Y.; FU, F.H. Muscle Injuries and Repair: Current Trends in Research. **J Bone Joint Surg Am**, v. 84, p. 822-832, 2002.

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

JARVINEN, T.A.H.; JARVINEN, T.L.N.; KAARIAINEN, M.; AARIMAA, V.; VAITTINEN, S.; KALIMO, M.; JARVINEN, H. Muscle injuries: optimizing recovery. **Best Pract Res Clin Rheumatol**, v. 21, p. 317-331, 2007.

JARVINEN, T.A.H.; JARVINEN, T.L.N.; KAARIAINEN, M.; AARIMAA, V.; KALIMO, M.; JARVINEN, M. Muscle Injuries Biology and Treatment. **The American Journal of**

Sports Medicine, v. 33, p. 745-764, 2005.

JUNIOR, E.C.P.L.; LOPES-MARTINS, R.A.B.; DALAN, F.; FERRARI, M.; SBABO, F.M.; GENEROSI, R.A.; BARONI, B.M.; PENNA, S.C.; IVERSEN, V.V.; BJORDAL, J.M. Effect of 655-nm Low-Level Laser Therapy on Exercise-Induced Skeletal Muscle Fatigue in Humans. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 26, p. 419-424, 2008.

KARU, T. The Science of Low-Power Laser Therapy. **Amsterdam: Gordon and Breach Science Publishers**, p. 53-200, 1998.

KARU, T.I.; LUBART, R. Effects of low-power light on biological systems. **V Amsterdam, Netherlands: Proceedings of SPIE**, v. 4159, p. 01-17, 2000.

KHADRA, M.; LYGSTADAAS, S.P.; HAANÆS, H.R.; MUSTAFA, K. Determining optimal dose of laser therapy for attachment and proliferation of human oral fibroblasts cultured on titanium implant material. **J Biomed Mater Res A**, v. 1, p. 55-62, 2005.

KRAUS, B.; PETTE, D. Quantification of MyoD, myogenin, MRF4 and Id-1 by reverse-transcriptase polymerase chain reaction in rat muscles Effects of hypothyroidism and chronic low-frequency stimulation. **Eur J Biochem**, v. 247, p. 98-106, 1997.

KUANG, S.; KURODA, K.; LE GRAND, F.; RUDNICKI, M.A. Asymmetric self-renewal and commitment of satellite stem cells in muscle. **Cell**, v. 129, p. 999-1010, 2007.

LAGROTA-CANDIDO, J.; CANELLA, I.; PINHEIRO, D.F.; SANTOS-SILVA, L.P.; FERREIRA, R.S.; GUIMARÃES-JOCA, F.J.; LANNES-VIEIRA, J.; QUIRICO-SANTOS, T. Characteristic pattern of skeletal muscle remodeling in different mouse strains. **Int J Exp Path**, v. 91, p. 522-529, 2010.

LAKYOVA, L.; TOPORCER, T.; TOMECKOVA, V.; SABO, J.; RADONAK, J. Low-Level Laser Therapy for Protection Against Skeletal Muscle Damage After Ischemia-Reperfusion Injury in Rat Hindlimbs. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 42, p. 665-672, 2010.

LE GRAND, F.; RUDNICKI, M.A. Skeletal muscle satellite cells and adult myogenesis. **Curr Opin Cell Biol**, v. 19, p. 628-633, 2007.

LEAL JUNIOR, E.C.P.; LOPES-MARTINS, R.A.B.; DE ALMEIDA, P.; RAMOS, L.; IVERSEN, V.V.; BJORDAL, J.M. Effect of low-level laser therapy (GaAs 904 nm) in skeletal muscle fatigue and biochemical markers of muscle damage in rats. **Eur J Appl Physiol**, v. 108, p. 1083-1088, 2010.

LIU, X.G.; ZHOU, Y.J.; LIU, T.C.; YUAN, J.Q. Effects of low-level laser irradiation on rat skeletal muscle injury after eccentric exercise. **Photomed Laser Surg**, v. 27, p. 863-869, 2009.

LOPES-MARTINS, R.A.B.; MARCOS, R.L.; LEONARDO, P.S.; PRIANTI, A.C.; MUSCARA, M.N.; AIMBIRE, F.; FRIGO, L.; IVERSEN, V.V.; BJORDAL, J.M. Effect of low-level laser (Ga-Al-As 655 nm) on skeletal muscle fatigue induced by electrical stimulation in rats. **J Appl Physiol**, v. 101, p. 283-288, 2006.

LUO, L.; SUN, Z.; ZHANG, L.; LI, X.; DONG, Y.; LIU, T.C. Effects of low-level laser therapy on ROS homeostasis and expression of IGF-1 and TGF- β 1 in skeletal muscle during the repair process. **Lasers Med Sci**, 2012.

LUZ, M.M.M.; LUZ, F.G.R.; SILVA, M.F.R.; OLIVEIRA, C.S.; MATA, F.R.; MATA, J.R. Low-power As-Ga-Al laser effect on the gastrocnemius muscle of rats submitted to mechanic lesioning. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 2, p. 159-168, 2007.

MACKEY, A.L.; MIKKELSEN, U.R.; MAGNUSSON, S.P.; KJAER, M. Rehabilitation of muscle after injury – the role of anti-inflammatory drugs. **Scand J Med Sci Sports**, v. 22, p. 8-14, 2012.

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

MELO, V.A.; ANJOS, D.C.; ALBUQUERQUE, R.; MELO, D.B.; CARVALHO, F.U. Effect of low level laser on sutured wound healing in rats. **Acta Cir Bras**, v. 26, p. 129-34, 2011.

MENETREY, J.; KASEMKIJWATTANA, C.; DAY, C.S.; BOSCH, P.; VOGT, M.; FU, F.H.; MORELAND, M.S.; HUARD, J. Growth factors improve muscle healing *in vivo*. **J Bone Joint Surg B**, v. 82, p. 131-137, 2000.

MESQUITA-FERRARI, R.A.; MARTINS, M.D.; SILVA, J.A.JR.; DA SILVA, T.D.; PIOVESAN, R.F.; PAVESI, V.C.; BUSSADORI, S.K.; FERNANDES, K.P. Effects of low-level laser therapy on expression of TNF- α and TGF- β in skeletal muscle during the repair process. **Lasers Med Sci**, v. 26, p. 335-340, 2011.

MINAMOTO, V.B.; BUNHO, S.R.; SALVINI, T.F. Regenerated rat skeletal muscle after periodic contusions. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, p. 1447-1452, 2001.

MIYABARA, E.H.; MARTIN, J.L.; GRIFFIN, T.M.; MORISCOT, A.S.; MESTRIL, R. Overexpression of inducible 70-kDa heat shock protein in mouse attenuates skeletal muscle damage induced by cryolesioning. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 290, p. 1128-1138, 2006.

MORRONE, G.; GUZZARDELLA, G.A.; ORIENTI, L.; GIAVARESI, G.; FINI, M.; ROCCA, M.; TORRICELLI, P.; MARTINI, L.; GIARDINO, R. Muscular Trauma Treated with a Ga-Al-As Diode Laser: In Vivo Experimental Study. **Lasers Med Sci**, v. 13, p. 293-298, 1998.

MOYER, A.L.; WAGNER, K.R. Regeneration versus fibrosis in skeletal muscle. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 23, p. 568-573, 2011.

MUSARO, A.; GIACINTI, C.; BORSILLINO, G.; DOHROWOLNY, G.; PELOSI, L.; CAIMS, L.; *et al.* Stem cell-mediated muscle regeneration is enhanced by local isoform of insulin-like growth factor 1. **PNAS**, v. 101, p. 1206-1210, 2004.

NAKANO, J.; KATAOKA, H.; SAKAMOTO, J.; ORIGUCHI, T.; OKITA, M.;

YOSHIMURA, T. Low-level laser irradiation promotes the recovery of atrophied gastrocnemius skeletal muscle in rats. **Exp Physiol**, v. 94, p. 1005-1015, 2010.

O'GRADY, M.; HACKNEY, A.C.; SCHNEIDER, K.; BOSSEN, E.; STEINBERG, K.; DOUGLAS, J.M.; MURRAY, W.J.; WATKINS, W.D. Diclofenac sodium (Voltaren) reduced exercise-induced injury in human skeletal muscle. **Med Sci Sports Exerc**, v. 32, p. 1191-1196, 2000.

PALLOTTA, R.C.; BJORDAL, J.M.; FRIGO, L.; LEAL JUNIOR, E.C.P.; TEIXEIRA, S.; MARCOS, R.L.; RAMOS, L.; MESSIAS, F.M.; LOPES-MARTINS, R.A.B. Infrared (810-nm) low-level laser therapy on rat experimental knee inflammation. **Lasers Med Sci**. v. 27, p. 71-78, 2010.

PEPLOW, P.V.; CHUNG, T.; BAXTER, G.D. Laser Photobiomodulation of Proliferation of Cells in Culture: A Review of Human and Animal Studies. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 28, p. 3-40, 2010.

PEREIRA LOPES, F.R.; LISBOA, B.C.; FRATTINI, F.; ALMEIDA, F.M.; TOMAZ, M.A.; MATSUMOTO, P.K.; LANGONE, F.; LORA, S.; MELO, P.A.; BOROJEVIC, R.; HAN, S.W.; MARTINEZ, A.M. Enhancement of sciatic nerve regeneration after vascular endothelial growth factor (VEGF) gene therapy. **Neuropathol Appl Neurobiol**, v. 37, p. 600-612, 2011.

PIEIDADE, M.C.; GALHARDO, M.S.; BATTLEHNER, C.N.; FERREIRA, M.A.; CALDINI, E.G.; DE TOLEDO, O.M.S. Effect of ultrasound therapy on the repair of gastrocnemius muscle injury in rats. **Ultrasonics**, v. 48, p. 403-411, 2008.

PIRES, D.; XAVIER, M.; ARAÚJO, T.; SILVA JR. J.A.; AIMBIRE, F.; ALBERTINI, R. Low-level laser therapy (LLLT; 780 nm) acts differently on mRNA expression of anti- and pro-inflammatory mediators in an experimental model of collagenase-induced tendinitis in rat. **Lasers Med Sci**, v. 26, p. 85-94, 2011.

PRABHU, V.; RAO, S.B.; CHANDRA, S.; KUMAR, P.; RAO, L.; GUDDATTU, V.; SATYAMOORTHY, K.; MAHATO, K.K. Spectroscopic and histological evaluation of wound healing progression following Low Level Laser Therapy (LLLT). **J Biophotonics**, v. 2, p. 168-184, 2012.

PRISK, V.; HUARD, J. Muscle injuries and repair: The role of prostaglandins and inflammation. **Histol Histopathol**, v. 18, p. 1243-1256, 2003.

RAMOS, L.; LEAL JUNIOR, E.C.; PALLOTTA, R.C.; FRIGO, L.; MARCOS, R.L.; DE CARVALHO, M.H.; BJORDAL, J.M.; LOPES-MARTINS, R.Á. Infrared (810 nm) low-level laser therapy in experimental model of strain-induced skeletal muscle injury in rats: effects on functional outcomes. **Photochem Photobiol**, v. 88, p. 154-60, 2012.

RENNO, A.C.; TOMA, R.L.; FEITOSA, S.M.; FERNANDES, K.; BOSSINI, P.S.; DE OLIVEIRA, P.; PARIZOTTO, N.A.; RIBEIRO, D.A. Comparative effects of low-intensity pulsed ultrasound and low-level laser therapy on injured skeletal muscle. **Photomed Laser Surg**, v. 29, p. 5-10, 2011.

RENNO, A.C.M.; MCDONNELL, P.A.; PARIZOTTO, N.A.; LAAKSO, E.L. The Effects of Laser Irradiation on Osteoblast and Osteosarcoma Cell Proliferation and Differentiation *in Vitro*. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 25, p. 275-280, 2007.

RIBEIRO, D.A.; BUTTROS, J.B.; OSHIMA, C.T.; BERGAMASCHI, C.T.; CAMPOS, R.R. Ascorbic acid prevents acute myocardial infarction induced by isoproterenol in rats: role of inducible nitric oxide synthase production. **J Mol Histol**, v. 40, p. 99-105, 2009.

RIZZI, C.F.; MAURIZ, J.L.; CORREA, D.S.F.; MOREIRA, A.J.; ZETTLER, C.G.; FILIPPIN, L.I.; MARRONI, N.P.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J. Effects of Low-Level Laser Therapy (LLLT) on the Nuclear Factor (NF)-κB Signaling Pathway in Traumatized Muscle. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 38, p. 704-713, 2006.

RODRIGO, S.M.; CUNHA, A.; POZZA, D.H.; BLAYA, D.S.; MORAES, J.F.; WEBER, J.B.; DE OLIVEIRA, M.G. Analysis of the systemic effect of red and infrared laser therapy on wound repair. **Photomed Laser Surg**, v. 27, p. 929-935, 2009.

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

SANTOS, N.R.; SOBRINHO, J.B.; ALMEIDA, P.F.; RIBEIRO, A.A.; CANGUSSÚ, M.C.; DOS SANTOS, J.N.; PINHEIRO, A.L. Influence of the combination of infrared and red laser light on the healing of cutaneous wounds infected by *Staphylococcus aureus*. **Photomed Laser Surg**, v. 29, p. 177-182, 2011.

SERVETTO, N.; CREMONEZZI, D.; SIMES, J.C.; MOYA, M.; SORIANO, F.; PALMA, J.A.; CAMPANA, V.R. Evaluation of inflammatory biomarkers associated with oxidative stress and histological assessment of low-level laser therapy in experimental myopathy. **Lasers Surg Med**, v. 42, p. 577-583, 2010.

SHEFER, G.; PHD, BEN-DOV, N.; HALEVY, O.; ORON, U. Primary Myogenic Cells See the Light: Improved Survival of Transplanted Myogenic Cells Following Low Energy Laser Irradiation. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 40, p. 38-45, 2008.

SILVA, L.H.; SILVA, M.T.; GUTIERREZ, R.M.; CONTE, T.C.; TOLEDO, C.A.; AOKI, M.S.; LIEBANO, R.E.; MIYABARA, E.H. GaAs 904-nm laser irradiation improves myofiber mass recovery during regeneration of skeletal muscle previously damaged by crotoxin. **Lasers Med Sci**, v. 27, p. 993-1000, 2012.

SILVEIRA, P.C.; DA SILVA, L.A.; PINHO, C.A.; DE SOUZA, P.S.; RONSANI, M.M.; DA LUZ SCHEFFER, D.; PINHO, R.A. Effects of low-level laser therapy (GaAs) in an animal model of muscular damage induced by trauma. **Lasers Med Sci**, 2012.

SILVEIRA, P.C.L.; SILVA, L.A.; FRAGA, D.B.; FREITAS, T.P.; STRECK, E.L.; PINHO, R. Evaluation of mitochondrial respiratory chain activity in muscle healing by low-level laser therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 95, p. 89-92, 2009.

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

STEIN, A.; BENAYAHU, D.; MALTZ, L.; ORON, U. Low-level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts *in vitro*. **Photomed Laser Surg**, v. 23, p. 161-166, 2005.

STRAFACCE, G.; APRAHAMIAN, T.; FLEX, A.; GAETANI, E.; BISCETTI, F.; SMITH, R.C.; PECORINI, G.; POLA, E; *et al.* Sonic Hedgehog Regulates Angiogenesis and Myogenesis During Post-Natal Skeletal Muscle Regeneration. **J Cell Mol Med**, v. 13, p. 2424-2435, 2009.

TANAKA, Y.; YAMAGUCHI, A.; FUJIKAWA, T.; SAKUMA, K.; MORITA, I.; ISHII, K. Expression of mRNA for specific fibroblast growth factors associates with that of the myogenic markers MyoD and proliferating cell nuclear antigen in regenerating and overloaded rat plantaris muscle. **Acta Physiol**, v. 194, p. 149-159, 2008.

TESTA, M.; ROCCA, B.; SPATH, L.; RANELLETTI, F.O.; PETRUCCI, G.; CIABATTONI, G.; NARO, F.; SCHIAFFINO, S.; VOLPE, M.; REGGIANI, C. Expression and activity of cyclooxygenase isoforms in skeletal muscles and myocardium of humans and rodents. **J Appl Physiol**, v. 103, p. 1412-1418, 2007.

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

TOUMI, H.T.; BEST, T.T. The inflammatory response: friend or enemy for muscle injury? **Br J Sports Med**, v. 37, p. 284-286, 2003.

TUBY, H.; MALTZ, L.; ORON, U. Modulations of VEGF and iNOS in the rat heart by low level laser therapy are associated with cardioprotection and enhanced angiogenesis. **Lasers Surg Med**, v. 38, p. 682-688, 2006.

TURNER, N.J.; BADYLAK, S.F. Regeneration of skeletal muscle. **Cell Tissue Res**, v. 347, p. 759-774, 2012.

VAN DER POEL, C.; GOSSELIN, L.E.; SCHERTZER, J.D.; RYALL, J.G.; SWIDERSKI, K.; WONDEMAGHEN, M.; LYNCH, G.S. Ageing prolongs inflammatory marker expression in regenerating rat skeletal muscles after injury. **Journal of Inflammation**, v. 8, p. 1-9, 2011.

VATANSEVER, F.; RODRIGUES, N.C.; ASSIS, L.L.; PEVIANI, S.S.; DURIGAN, J.L.; MOREIRA, F.M.A.; *et al.* Low Intensity Laser Therapy Accelerates Muscle Regeneration In Aged Rats. **Photonics & Lasers in Medicine**, v. 1, p. 287-297, 2012.

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

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

WARREN, G.L.; SUMMAN, M.; GAO, X.; CHAPMAN, R.; HULDERMAN, T.; SIMEONOVA, P.P. Mechanisms of skeletal muscle injury and repair revealed by gene expression studies in mouse models. **J Physiol**, v. 582, p. 825-841, 2007.

WEISS, N.; ORON, U. Enhancement of muscle regeneration in the rat gastrocnemius muscle by low energy laser irradiation. **Anat Embryol (Berl)**, v. 186, p. 497-503, 1992.

WIETESKA-SKRZECZYNSKA, W.; GRZELKOWSKA-KOWALCZYK, K.; TOKARSKA, J.; GRABIEC, K. Growth factor and cytokine interactions in myogenesis. Part I. The effect of TNF-alpha and IFN-gamma on IGF-I-dependent differentiation in mouse C2C12 myogenic cells. **Pol J Vet Sci**, v. 14, p. 417-424, 2011.

WILKIN, L.D.; MERRICK, M.A.; KIRBY, T.E.; DEVOR, S.T. Influence of therapeutic ultrasound on skeletal muscle regeneration following blunt contusion. **Int J Sports Med**, v. 25, p. 73-77, 2004.

YAHIAOUI, L.; GVOZDIC, D.; DANIALOU, G.; MACK, M.; PETROF, B.J. CC family chemokines directly regulate myoblast responses to skeletal muscle injury. **J Physiol**, v. 586, p. 3991-4004, 2008.

YAN, Z.; CHOI, S.; LIU, X.; ZHANG, M.; SCHAGEMAN, J.J.; LEE, S.Y.; HART, R.; LIN, L.; THURMOND, F.A.; *et al.* Highly Coordinated Gene Regulation in Mouse Skeletal

Muscle Regeneration. **The journal of biological chemistry**, v. 278, p. 8826-8836, 2003.

YUSUF, F.; BRAND-SABERI, B. Myogenesis and muscle regeneration. **Histochem Cell Biol**, v. 138, p. 187-199, 2012.

ZADOR, E.; BOTTKA, S.; WUYTACK, F. Antisense inhibition of myoD expression in regenerating rat soleus muscle is followed by an increase in the mRNA levels of myoD, myf-5 and myogenin and by a retarded regeneration. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1590, p. 52-63, 2002.

ZWETSLOOT, K.A.; WESTERKAMP, L.M.; HOLMES, B.F.; GAVIN, T.P. AMPK regulates basal skeletal muscle capillarization and VEGF expression, but is not necessary for the angiogenic response to exercise. **J Physiol**, v. 15, p. 6021-6035, 2008.

9. ANEXOS

ANEXO A



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
Comissão de Ética em Experimentação Animal
Via Washington Luís, km. 235 - Caixa Postal 676
Fones: (016) 3351.8109 / 3351.8110
Fax: (016) 3361.3176
CEP 13560-970 - São Carlos - SP - Brasil
propg@power.ufscar.br - www.propg.ufscar.br

Parecer da Comissão de Ética em Experimentação Animal n°. 003/2010

Protocolo n°. 068/2009

A Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos – CEEA/UFSCar – na sua 39ª. Reunião, ocorrida em 23/02/2010, **APROVOU** o trabalho intitulado “**AÇÃO DA LASERTERAPIA DE BAIXA INTENSIDADE NA REGENERAÇÃO MUSCULAR DE RATOS**”, elaborado por Natalia Camargo Rodrigues, Ana Claudia Muniz Renno e Nivaldo Antonio Parizotto.

São Carlos, 25 de fevereiro de 2010.


Profª. Dra. Keico Okino Nonaka
Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal

ANEXO B

Robert Carpentier <Robert.Carpentier@uqtr.ca>

7 de janeiro de 2013 20:18

Para: Natalia Iosimuta

Your Submission

Ms. Ref. No.: JPHOTOBIOLOG-D-12-00188R2

Title: Low-level laser therapy (LLLT) (660nm) alters gene expression during muscle healing in rats

Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology

Dear Natalia,

I am pleased to confirm that your paper "Low-level laser therapy (LLLT) (660nm) alters gene expression during muscle healing in rats" has been accepted for publication in Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.

Thank you for submitting your work to this journal.

With kind regards,

Robert Carpentier, PhD

Editor

Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

ANEXO C

Natalia Iosimuta <nataliacrod@yahoo.com.br>

12 de fevereiro de 2013 23:56

Fwd: Enc: JRRD Manuscript JRRD-12-08-0147.R2

----- Mensagem encaminhada -----

De: "stacie.yuhasz@jhu.edu" <stacie.yuhasz@jhu.edu>

Para: acmr_ft@yahoo.com.br

Cc: natalia@yahoo.com.br; livinha_fisio@yahoo.com.br; kellyrf@yahoo.com.br; angelamaqri@hotmail.com; daribeiro@hotmail.com; dclcarvalho@yahoo.com.br; roberta@gmail.com; acmr_ft@yahoo.com.br

Enviadas: Terça-feira, 8 de Janeiro de 2013 15:09

Assunto: JRRD Manuscript JRRD-12-08-0147.R2

Journal of Rehabilitation Research and Development
08-Jan-2013

Dear Dr. ANa RENno:

I am pleased to inform you that your revised manuscript has been conditionally accepted for publication in the next available issue of JRRD. Please note that starting mid-2010, all JRRD conditionally accepted papers will be checked via CrossCheck (iThenticate) for plagiarism. IF a problem arises during this procedure, we will notify you immediately for clarification.

Please forward the following items to the Editorial Office:

By e-mail: The final WORD version (including JRRD at a Glance) of your revised manuscript (WITHOUT REDLINING), equations and figures (saved as individual image files), as well as any accompanying supplementary material, audio, or video files. Consult the "JRRD Editorial Policies" and "Submission Policies" (<http://www.rehab.research.va.gov/jour/jrrdedpolicy2010.pdf> and <http://www.rehab.research.va.gov/jour/jrrdsubguide2010.pdf> respectively) for complete instructions for returning the final version. Please note that files that are incomplete or improperly prepared will result in publication delay until the next available issue.

; AND

- By regular mail: A CD/DVD with your revised manuscript, figures (saved as individual image files), equations, supplementary material, audio, or video files, and JRRD at a Glance. Consult the "JRRD Editorial Policies" and "Submission Policies" (<http://www.rehab.research.va.gov/jour/jrrdedpolicy2010.pdf> and <http://www.rehab.research.va.gov/jour/jrrdsubguide2010.pdf> respectively) for complete instructions for figures, audio, and video.

The files sent by email and by regular mail must be identical and must be returned promptly according the guidelines.

DELAYS IN THE RETURN OF YOUR MANUSCRIPT AND DISK ACCORDING TO POLICY GUIDELINES WILL RESULT IN AN INDEFINITE DELAY IN PUBLICATION, SO PLEASE RETURN THE REQUESTED ITEMS PROMPTLY.

Congratulations on submitting such an excellent study.

Sincerely,

Stacieann C. Yuhasz, PhD
Editor

JRRD Editorial Office
Department of Veterans Affairs
Rehabilitation Research and Development Service
103 South Gay Street
5th Floor