

*Universidade Federal
de São Carlos*

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

**Efeito do Laser de Baixa Intensidade sobre a
Regeneração do Músculo Esquelético em
Camundongos através da Análise de Expressão
Gênica com Branched de DNA(bDNA)¹**

Olga Sueli Marques Moreira

São Carlos – SP
2008

**Efeito do Laser de Baixa Intensidade sobre a
Regeneração do Músculo Esquelético em
Camundongos através de Análise de Expressão Gênica
com Branched de DNA (bDNA)¹**

OLGA SUELI MARQUES MOREIRA

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

ORIENTADOR: PROF. DR. NIVALDO ANTONIO PARIZOTTO

COLABORADORES: PROF. DR. VANDERLEI SALVADOR BAGNATO

PROF. DR. FLÁVIO HENRIQUE SILVA

São Carlos – SP

Maio-2008

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

M838el

Moreira, Olga Sueli Marques.

Efeito do laser de baixa intensidade sobre a regeneração do músculo esquelético em camundongos através da análise de expressão gênica com branched de DNA (bDNA)¹ / Olga Sueli Marques Moreira. -- São Carlos : UFSCar, 2008. 104 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2008.

1. Lasers. 2. Branched DNA. 3. Expressão gênica. 4. MyoD. 5. Miogenina. 6. Camundongo. I. Título.

CDD: 615.83 (20^a)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA PARA DEFESA DE TESE DE
DOUTORADO DE OLGA SUELI MARQUES MOREIRA,
APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
FISIOTERAPIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM
07 DE MAIO DE 2008

BANCA EXAMINADORA:



Nivaldo Antonio Parizotto
(UFSCar)



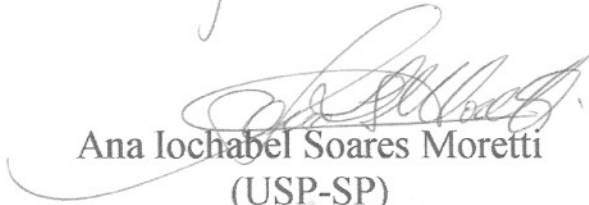
Tânia de Fátima Salvini
(UFSCar)



Rodrigo Alvaro Brandão Lopes Martins
(USP-SP)



Maria Cristina Chavantes
(INCOR/USP-SP)



Ana Iochabel Soares Moretti
(USP-SP)

Hino de Adoração

Ó profundidade das riquezas, tanto da sabedoria, como da ciência de Deus! Quão insondáveis são os seus juízos, e quão inescrutáveis os seus caminhos!

Pois,

Quem jamais conheceu a mente do Senhor? Ou quem se fez seu conselheiro?

Ou quem lhe deu primeiro a Ele, para que lhe seja recompensado?

Porque Dele, e por Ele, e para Ele, são todas as coisas; Glória, pois, a Ele eternamente, Amém.

Romanos 11: 33-36

O Poder pode fazer qualquer coisa, menos a mais importante: não consegue controlar o amor... Ninguém pode nos ensinar a odiar... Dentro de nós somos livres... É uma questão de decisão... Essa é a verdadeira essência da liberdade humana.

Olga Moreira

DEDICATÓRIA

A Deus

Razão da minha existência e autor da minha fé.

A Minha Filha Giulliani Antoniceli Moreira Brasileiro

Por ser a força que me impulsiona a lutar e pela compensação do meu trabalho

A Minha Mãe Iraci Maria Marques Moreira

Pela grandeza de sua devoção à família... pelo amor dedicado a minha vida

Ao meu Pai João Câmara Moreira

(In memorian)

AGRADECIMENTO ESPECIAL

AO MEU ORIENTADOR

Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto

Muito mais que orientador... Um Grande Amigo...

Aquele que além de ensinar, participa...

Que antes de criticar, ensina...

Que antes de ensinar, nos conduz a pensar...

Obrigada! Você, verdadeiramente, me abriu as portas ao universo da pesquisa.

Obrigada pela valiosa contribuição em minha formação acadêmica e profissional.

Obrigada por fazer parte da minha vida.

Você é, e será sempre um amigo inesquecível!

A você dedico esse ensinamento:

“A grande diferença entre um professor e um verdadeiro filósofo é que o professor pensa que sabe um monte de coisas e tenta enfiar essas coisas na cabeça de seus alunos. Um filósofo, ao contrário, tenta ir ao fundo das coisas dialogando com seus alunos” (Jostein Gaarder).

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Prof.a. Tania de Fátima Salvini

Pelos cuidados dispensados a minha vida. Por ter estado ao meu lado em um dos momentos mais difíceis. Por ter me conduzido ao lugar onde hoje, aqui estou.

Você é, e será sempre inesquecível para mim.

Muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Vanderlei Salvados Bagnato

Por toda atenção, apoio, incentivo... Pela abertura inicial às possibilidades de desenvolvimento dessa pesquisa. Por ter aceitado o desafio e acreditado... Pelo simples reconhecimento da relevância desse trabalho.

Muito Obrigada!

Ao Prof. Dr. Flávio Henrique Silva

Por simplesmente acreditar... Abrir as portas... Apontar novos caminhos... Por toda ajuda incentivo, apoio e reconhecimento... Pelas brincadeiras “estressantes”!

Muito Obrigada!

A minha amiga Livia Ribeiro de Assis

Pela caminhada juntas nessa estrada... Às vezes tão sinuosa... Às vezes tão incerta quanto à chegada... Muitas vezes tão cheia de percalços e aparentemente tão longa!!!

Obrigada por ter perseverado sempre comigo!

Essa conquista é nossa!

AGRADECIMENTOS

A Deus por tua presença, tua fidelidade, graça e amor... Toda Honra, toda Glória, toda Vitória pertencem somente a Ti, porque sem Ti eu não estaria aqui. Por ser o autor e consumidor da minha fé! A Ti todo o Louvor!

A minha família, pelo imenso amor expressos em compreensão, apoio constante, e apesar da distância, caminhar junto comigo rumo a essa conquista! Vocês são muito importantes para mim! Amo vocês!

A minha mãe pela exata expressão de verdadeiro amor.

A minha filha, por tudo que representa para mim. Agradeço a Deus porque você é a filha que sonhei ter. A tranquilidade que você me passa, muito me ajudou a chegar aqui.

Ao meu irmão Cláudio Vinícius, pela ajuda e compreensão em todos os momentos que precisei de apoio. Muito Obrigada!

Ao Pastor Jarbas Antonio Valentin e a sua esposa Lucy Mary Soares Valentin pelo amor constante, apoio e sustentação nos momentos difíceis. Vocês são muito importantes na minha vida! Muito Obrigada pelo amor e acolhimento!

Ao Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato e ao laboratório do Instituto de Física e Ótica/USP.

Ao Prof. Dr. Flavio Henrique Silva e ao laboratório de Genética/UFSCar.

A todos os meus mestres da pós-graduação, tenho muito carinho por vocês!

Ao Prof. Dr. Jovany Luis Alves de Medeiros (UEPB), por ter sido o primeiro a me fazer compreender a importância da pesquisa. Você é um Mestre Inesquecível!

Ao Prof. Dr. Alfredo Ribeiro, pelas análises estatísticas.

Aos professores, doutores Nivaldo Antonio Parizotto, Tânia de Fátima Salvini, Ana Lochabel, Maria Cristina Chavantes, Rodrigo A. B. Lopes-Martins pela leitura atenciosa e valiosas contribuições na elaboração final desta Tese.

As minhas amigas Eli, Isa, Rose, companheiras importantes nessa jornada da vida, sem vocês perto de mim, tudo seria muito difícil! Vocês foram muito importantes na minha vida. Especialmente agradeço a Isaura que nesse momento tem me acolhido sempre nessa jornada! Obrigada minhas amigas!

Aos colegas do laboratório do Grupo de Ótica e Física da USP, Dirceu, Denis pelo apoio aos experimentos, pelo carinho e amizade.

A Andréa Costa pelo apoio aos experimentos e aos demais colegas do laboratório de genética/ UFSCar pela amizade.

A André Herklotz, representante da empresa Sinapse Biotecnologia, pelo profissionalismo no atendimento às nossas solicitações e por todas as nossas necessidades terem sido atendidas.

A Jose Carlos Carle Urioste pelas orientações e contribuições durante os experimentos e pelo apoio da empresa Panomics.

Aos Amigos do laboratório, Livia, Natália, Davilene, Thiago, Charles, Wolber, Paulo Bossini, Renata, Jaqueline, Ana Claudia, Renan, Sabrina, Dório, Jamacy, Emiliano, Marco, Vivian, Poliana, Cleber Tereza pela ajuda e momentos de descontração. Sentirei saudades de vocês!

A Revair e a Roberto, profissionais do Biotério, pela importância do seu trabalho na construção do nosso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

A UFSCar por abrir as portas para a realização desse GRANDE SONHO!

LISTA DE ABREVIATURAS

AP-1: ativador de proteína

ATP: trifosfato de adenosina

ADP: difosfato de adenosina

AMP: monofosfato de adenosina

bDNA: branched de DNA

bHLH: basic helix-loop-helix

BL: label blocker

CE: capture extender

CN: calcineurina

CsA: cyclosporina A

DSCR:Down syndrom critical region gene 1

DNA: ácido desoxirribonucléico

FGF: fator de crescimento fibroblástico

Flt-1: Fms-like tyrosine kinase 1

Ga-Al-As: gálio-alumínio-arseniato

GATA: GATA binding protein 2

GLM: Generalized Linear Models

He-Ne Helio-Neônio

HGF: fator de crescimento hepatócito

IGF-I: fator de crescimento insulínico-I

IGF-II: fator de crescimento insulínico-II

In-Ga-Al-As: índico-gálio-alumínio-arseniato

LE: label extender

LILT: terapia laser de baixa intensidade

MTJs: junções miotendíneas

mRNA: ácido ribonucléico mensageiro

MTA: músculo tibial anterior

MRFs: factores regulatórios miogênicos

Myf5

MyoG: Miogenina

NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatase oxidase

NADH dhdg: nicotinamida adenina dinucleotídeo desidrogenase

Ndufa1: NADH dehydrogenase

NF- κ B: factor nuclear kappa β

NFATc1: factor nuclear de activadores de células T citoplasmática 1

μ l: microlitros

nm: nanômetro

Pax3: pair box gene 3

Pax7: pair box gene 7

PDGF: factor de crescimento derivado das plaquetas

Pdgfa: factor de crescimento derivado das plaquetas - a

Ppib: peptidylprolyl isomerase-B

RNAse: ribonuclease

ROS: espécies de oxigênio reativo

TGF- β : fator de crescimento transformante β

VEGF: factor de crescimento endothelial vascular

Vegfa: factor de crescimento endothelial vascular

SUMÁRIO

1.0 PARTE I

1.0 Resumo	ii
2.0 Abstract	iii
3.0 Introdução e Justificativa	01
4.0 Apresentação	03
5.0 Objetivo Geral	04

2. PARTE II 05

2.1 MANUSCRITO I

2.11. Laser de baixa intensidade altera a expressão gênica da MyoD e Miogenina <i>in vivo</i> em músculo	06
--	----

2.2 MANUSCRITO II

2.1.2. Low-power laser affects the expression of Vegfa, Rcan1, Pdgfc and Ndufa1 genes in mouse skeletal muscle <i>In Vivo</i>	28
---	----

3. PARTE III 58

3.1 Conclusões Gerais	59
3.2 Considerações Finais	60

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 61

5. ANEXOS 63

5.1. Manuscrito I (Versão em Inglês)	64
5.2. Manuscrito II (Versão em inglês)	79

Figuras 101

2. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A terapia laser de baixa intensidade (LBI) tem sido utilizada ao longo de várias décadas no tratamento de diversas condições clínicas que requerem necessidade de reparo tecidual, resposta antiinflamatória e alívio da dor. Diversas pesquisas foram desenvolvidas para investigar os mecanismos de ação do laser e as respostas fisiológicas dos tecidos submetidos à ação da luz (Karu, 1995; Wilden e Karthein, et al., 1998; Vladimirov, et al., 2004; Lubart et al., 2005). Nesses estudos, diversos comprimentos de onda, fluências e potências foram utilizados para investigar se os tecidos respondem de maneira diferente.

A luz laser exerce efeitos fotobiomoduladores que acarreta alteração do estado redox celular, ativando mecanismos celulares e moleculares de expressão gênica e síntese protéica relacionados com os eventos de reparo tecidual. No entanto, uma questão que permanece sem resposta é se os efeitos fotobiomoduladores do laser de baixa intensidade ocorrem também nos tecidos sem lesão. Nesse estudo, nós hipotetizamos que da mesma forma que nos indivíduos saudáveis, especificamente atletas, os mecanismos de síntese, envolvidos nas vias de hipertrofia muscular são ativados mediante estímulo do exercício físico, as células dos tecidos saudáveis também são ativadas, aumentando os mecanismos de expressão gênica e sínteses sob afeição da luz. Outra hipótese levantada nesse estudo é que provavelmente exista uma especificidade na expressão de genes diferentes em relação aos comprimentos de onda da luz laser.

O músculo esquelético é um tecido dinâmico, que exhibe notável capacidade adaptativa às demandas fisiológicas (crescimento, treinamento com exercícios intensos) ou a danos severos por meio de um processo regenerativo que restaura a citoarquitetura muscular em um período aproximado de duas semanas (Dhawan and Rando, 2005; Cossu and Biressi, 2005; Shi and Garry, 2006).

Os processos pelo quais essas respostas adaptativas ocorrem são amplamente atribuídos à atividade de uma pequena população de células localizadas no músculo esquelético adulto, denominada - célula satélite (Hawke et al., 2001). As células satélites foram descobertas por Mauro em 1961 e

consiste de um pool de células tronco localizadas sob a lâmina basal que envolve cada fibra (Zammit e Beauchamp, 2001; Zammit et al., 2006). No caso de lesões específicas dos músculos, o processo de regeneração muscular, além de envolver a ativação das células satélites, recruta outros mecanismos como aumento da angiogênese (Maegawa et al., 2000), gasto energético mediante a ativação dos processos metabólicos envolvidos nos mecanismos de reparo (Dunguez et al., 2002), e a ativação de diversas respostas moleculares, entre elas *upregulation* de fatores de transcrição, síntese de proteínas específicas dos músculos (*myosin heavy chain* e *muscle creatine kinase*) (Zammit, et al., 2006; Chargé et al., 2004) e a ação de fatores de crescimento, tais como VEGF e PDGF (van Weel et al., 2007; Reuveni et al 1990).

Apesar das respostas adaptativas dos músculos esqueléticos em decorrência de trauma (Oliveira et al., 1999) e outros mecanismos de lesão (Amaral et al., 2001; Bibikova et al., 1994), serem bem investigadas, poucos estudos foram desenvolvidos para investigar as respostas moleculares e celulares dos tecidos biológicos “*in vivo*” sob ação do laser de baixa intensidade.

Portanto, a meta deste estudo foi investigar as bases moleculares da via de regeneração do músculo esquelético, por meio da análise de expressão gênica, sob influência da ação do laser de baixa intensidade com a finalidade de proporcionar parâmetros de dosagem apropriados para aplicação na terapêutica clínica.

3. APRESENTAÇÃO

Esta pesquisa é o resultado de quatro anos dedicados ao doutorado. Apresenta caráter pioneiro em vários aspectos.

Primeiro, este trabalho utilizou a metodologia de Branched de DNA (bDNA) para análise de expressão gênica em tecidos biológicos. Inicialmente, a técnica que era destinada para cultura de células, foi adaptada para homogenatos de tecido. Primeiramente, validamos a metodologia mediante o uso do protocolo *QuantiGene[®] Reagent Systems Evaluation Program* (Genospetra). Mediante este protocolo, vários ensaios experimentais foram realizados, e resultou na adequação metodológica que a empresa utilizou para padronizar os procedimentos para análise com homogenatos de tecidos animais. Atualmente, nosso protocolo faz parte do manual do Sistema de Reagentes QuantiGene Panomics[®] que está sendo utilizado pela própria empresa para análise da expressão gênica com homogenatos de tecido muscular.

Segundo, tendo em vista a existência de poucos trabalhos na literatura que investiga o efeito do laser $\lambda=514$ nm durante a regeneração do músculo esquelético, decidimos realizar esta investigação para fins de desenvolvimento do laser de argônio de baixa intensidade para fins terapêuticos.

Terceiro, consiste no primeiro trabalho que investiga três comprimentos de onda de laser de baixa intensidade sobre a expressão de genes durante o processo de regeneração muscular *in vivo*.

Ao final desse estudo obtivemos resultados relevantes que deram origem a dois manuscritos submetidos em revistas internacionais, em anexo. Para apresentação desta tese, os resultados obtidos foram organizados em capítulos que correspondem aos dois artigos apresentados a seguir.

4. OBJETIVO GERAL

O objetivo desse estudo foi investigar, por meio de análise de expressão gênica, usando branched de DNA, os efeitos biomoduladores da LBI sobre o processo de regeneração muscular *in vivo*, com a finalidade de estabelecer parâmetros de dosagem apropriados para aplicação na terapêutica clínica.

Parte II

Manuscrito I

Laser de Baixa Intensidade Altera a Expressão Gênica da Myo-D e Miogenina *in vivo* em Músculos Esqueléticos de Camundongos

Manuscrito II

Efeito do laser de baixa intensidade sobre a regeneração do músculo esquelético *in vivo* através de análise do perfil de expressão gênica de Vegfa, Rcan1, Pdgfc e Ndufa1

Laser de Baixa Intensidade Altera a Expressão Gênica da Myo-D e Miogenina *in vivo* em Músculos Esqueléticos de Camundongos

Olga S. M. Moreira, MSc¹, Livia R. de Assis, MSc¹, Henrique-Silva, F. PhD²,
Vanderlei S. Bagnato, PhD³, Nivaldo A. Parizotto, PhD⁴

¹Mestres-Programa de fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos, 13565-905 São Carlos, SP, Brasil

²Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, 13565-905 São Carlos, SP, Brasil

³Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, Cx. Postal 369, 13560-970, São Carlos, SP, Brasil

⁴Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos, 13565-905 São Carlos, SP, Brasil

Introdução e objetivos: Branched DNA foi usado para investigar o perfil de expressão gênica de MyoD e miogenina *in vivo* em músculos esqueléticos de camundongos irradiados com laser de baixa intensidade. O perfil de expressão gênica revelou que MyoD e miogenina foram regulados pelos lasers vermelho, infravermelho e verde. Estes genes desempenham um papel no aumento dos fatores de transcrição *basic helix-loop-helix* (bHLH) durante a fase de proliferação da regeneração muscular. O objetivo do presente estudo foi investigar a ação de diferentes comprimentos de onda sobre o perfil de expressão gênica de MyoD e miogenina na regeneração do músculo esquelético.

Materiais e Métodos: Quarenta camundongos machos (*Mus musculus*) foram usados no estudo. O experimento foi realizado em sete dias. No 1º dia foram realizadas as cirurgias dos animais. Nos 2º, 3º e 4º dias, os animais foram submetidos ao protocolo de irradiação. No 5º dia, os animais foram eutanasiados e os músculos foram congelados. Nos 6º e 7º dias, os músculos foram descongelados e submetidos ao protocolo do Sistema QuantiGene (Panomics^(R)). Os dados de oito tratamentos foram transformados por meio de

\log_{10} e submetidos ao ANOVA usando o procedimento *Generalized Linear Models* (GLM) do pacote estatístico do SAS.

Resultados: A análise de expressão gênica mostrou que MyoD e miogenina foram expressas na fase proliferativa durante a regeneração do músculo esquelético, usando irradiações de diferentes comprimentos de onda.

Conclusões: O presente estudo sugere que a irradiação laser foi efetiva sobre a miogênese *in vivo*. Isto pode ser devido ao efeito do laser sobre a ativação da célula satélite pelo aumento da expressão gênica de MyoD e miogenina na fase proliferativa da regeneração do músculo esquelético. Os transcritos investigados foram expressos em tecidos saudáveis e lesados. A Ciclofilina-B não foi um *housekeeping* apropriado para músculo esquelético.

Palavras Chaves: laser, Branched DNA, expressão gênica, MyoD, miogenina, camundongo.

Introdução

A regeneração do músculo esquelético é um processo altamente orquestrado que envolve a ativação de células satélites de músculos adultos nas fases de proliferação e diferenciação. A ativação das células satélites requer um controlado aumento na expressão de fatores de transcrição e de genes específicos dos músculos.

As lesões musculares provocam a ativação de vias da regeneração muscular, incluindo, fatores de transcrição miogênicos básicos *helix-loop-helix* (bHLH) durante a miogênese esquelética. A família dos bHLH incluem MyoD, myf5, miogenina (MyoG) e Myf6 (MRF4) [1,2,3,4]. Estas proteínas formam complexos heterodímeros ligantes de DNA que incluem outras proteínas bHLH da família gênica E2 (E12 e E47) e ligantes canônicos na seqüência de DNA, CANNTG (E-box), com elementos *enhancer* de genes que codificam a diferenciação terminal da linhagem dos músculos esqueléticos [1,5,6].

Estudos *in vitro* mostram grande número de fatores tróficos e de transcrição na manutenção do equilíbrio entre o crescimento e a diferenciação das células satélites na restauração da arquitetura normal do músculo [1,7]. Alguns estudos mostram que MyoD e miogenina são fortemente induzidas e coordenadas durante os três dias após a lesão e ambas são rapidamente, transcricionalmente reprimidas após 48 h [8]. Por outro lado, estudos têm mostrado que MyoD é marcadamente mais efetiva na ativação e diferenciação [9], enquanto outros estudos sugerem que a miogenina é um importante fator para diferenciação terminal e fusão de mioblastos em fibras musculares maduras [10].

Embora o processo de regeneração muscular tenha sido bem estudado [3,11], existem inúmeras questões referentes aos efeitos de diferentes comprimentos de onda do laser de baixa intensidade sobre a regeneração muscular que permanecem sem resposta. O aumento na regeneração através da terapia laser de baixa intensidade (LBI) tem sido estudado em vários tecidos tais como fígado [12,13], pele [14] osso [15], nervo [16] e músculo esquelético [17,18]. Em músculos esqueléticos de ratos e sapos, a irradiação laser He-Ne nas áreas danificadas aumentou a regeneração em duas a oito vezes

respectivamente, quando comparados com os controles não irradiados [17,18,19].

As interações entre a irradiação laser de baixa intensidade e os sistemas biológicos para a promoção da fotobiomodulação e bioestimulação são bem estabelecidas [20,21,22]. Embora alguns estudos mostrem que laser de baixa intensidade acelera mitoses [23,24] e afeta a diferenciação da célula satélite [25], Poucos estudos têm investigado as ações do laser de baixa intensidade sobre os mecanismos celulares durante a regeneração muscular usando métodos quantitativos de biologia molecular. Assim, o objetivo do presente estudo foi investigar *in vivo* o efeito dos lasers com comprimentos de onda $\lambda=660\text{nm}$, $\lambda=780\text{nm}$ e $\lambda=514\text{nm}$ sobre a expressão gênica de MyoD e miogenina durante os primeiros cinco dias do processo de reparo muscular usando branched DNA (bDNA).

Materiais e Métodos

Animais

40 camundongos machos da espécie *Mus músculos*, com peso corporal de $40\text{g}\pm 1\text{g}$, adquiridos pelo Biotério da Universidade Federal de São Carlos/SP Brasil, foram usados para os experimentos. Antes e após o procedimento cirúrgico, os animais foram mantidos sob ciclo natural de luz para adaptação ambiental, aquisição de água e alimento e controle de doenças (cinco por caixa), a uma temperatura ambiental de $\pm 37^\circ\text{C}$. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos (Protocol Number 007/2005).

Técnica Cirúrgica e Protocolo de Irradiação

O experimento foi realizado em sete dias:

1º dia – Primeiramente, o peso corporal dos animais foi mensurado. Os animais foram anestesiados com Cloridrato de Ketamina 0,02 – 0,05mg/kg e Cloridrato de Xilazina 2% - 0,01 – 0,03mg/kg de acordo com o peso corporal, e em seguida, o músculo tibial anterior direito (MTA) foi exposto por meio de procedimento cirúrgico. A lesão tecidual foi feita por congelamento usando

nitrogênio líquido (criolesão). A criolesão consistiu de dois ciclos de congelamento no músculo MTA. O congelamento foi realizado pela aplicação de uma pequena barra de ferro pré-congelada em nitrogênio líquido e mantida num sentido transversal em relação ao ventre do músculo durante 10s (duas vezes). Após pequeno descongelamento, a pele que recobre a lesão foi suturada com fio de Nylon poliamida (3-0). Em seguida, os animais foram mantidos no biotério durante 24h em gaiolas (37°C) para prevenir hipotermia.

2º, 3º e 4º dias – Os animais foram submetidos ao protocolo de irradiação de acordo com a dose e respectivos comprimentos de onda estabelecidos para cada grupo, durante três dias consecutivos.

5º dia – Os animais de todos os grupos foram previamente anestesiados e em seguida foram submetidos a um procedimento cirúrgico para remover o músculo MTA. O músculo de cada animal foi seccionado em cinco amostras (10mg cada) e em seguida, cada amostra foi colocada em um eppendorf com 300 µl de solução de homogeneização RNAase free. Em seguida, as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e mantidas em freezer -80°C. Após estes procedimentos, os animais foram submetidos à eutanásia mediante overdose de anestésico. Todas as incisões cirúrgicas e todas as lesões musculares foram feitas pelo mesmo pesquisador.

6º e 7º dias – As amostras de músculos que foram removidas e previamente congeladas, foram submetidas ao protocolo QuantiGene System (Panomics).

Fonte de Luz

Três fontes de luz foram usadas neste experimento:

- *Indium-gallium-aluminum arsenide (In-Ga-Al-As)* $\lambda=660\text{nm}$ diodo laser (MM Optics); A média de *output* foi 40mW, fluência de 10 J/cm², área de secção transversa do feixe de laser de 0.04cm² e tempo de exposição de 10 segundos.
- *Gallium-aluminum-arsenide (Ga-Al-As)* $\lambda=780\text{nm}$ diodo laser (MM Optics) - A média de *output* foi 40mW, fluência de 10 J/cm², área

de secção transversa do feixe de laser de 0.04cm^2 e tempo de exposição de 10 segundos.

- *Argon laser* λ 514nm (Nereid Light Phototherapy System, Healthtech, Shanghai, China) – Média de output foi 40mW, fluência de $10\text{J}/\text{cm}^2$, área de secção transversa do feixe de laser de $0,07\text{cm}^2$ e tempo de exposição de 5 segundos.

Grupos Experimentais

Os animais foram divididos em oito grupos (n=5).

Group 1	G1	Animais sem lesão muscular e tratados	$\lambda=514\text{mWI}$
Group 2	G2	Animais com músculos criolesionados e tratados com laser	$\lambda=514\text{nm}+I$
Group 3	G3	Animais sem lesão muscular e tratados	$\lambda=660\text{nmWI}$
Group 4	G4	Animais com músculos criolesionados e tratados com laser	$\lambda=660\text{nm}+I$
Group 5	G5	Animais sem lesão muscular e tratados	$\lambda=780\text{nmWI}$
Group 6	G6	Animais com músculos criolesionados e tratados com laser	$\lambda=780\text{nm}+I$
Group 7	G7	Animais com músculos criolesionados	sem tratamento
Group 8	G8	Controle	-

Protocolo de Irradiação

Durante o procedimento de irradiação, os animais foram previamente imobilizados pela mão do pesquisador e em seguida foi colocado em uma posição apropriada para expor a área da lesão sobre o feixe de laser. Este procedimento evitou a necessidade de anestésiar os animais durante o procedimento de irradiação.

Em seguida, a irradiação laser foi realizada diretamente sobre a pele que recobre o músculo MTA. Os animais dos grupos G2, G4, e G6 foram irradiados

diretamente sobre a incisão cirúrgica enquanto os animais dos grupos G1, G3 e G5 foram irradiados diretamente sobre a área que corresponde ao local da lesão dos grupos que foram lesionados. A aplicação do laser foi realizada com a técnica pontual, diariamente, durante três dias consecutivos, a cada 24 horas, começando a partir do segundo dia.

Procedimento QuantiGene.

Os ensaios QuantiGene foram realizados de acordo com os procedimentos do Quantigene Reagent System (Panomics®). Para quantificação da expressão gênica foi utilizado o Step-by-Step User's Guide for Animal Tissue Homogenates of the QuantiGene Reagent Systems Evaluation Program. As probes foram sintetizadas pela Panomics, baseadas em seqüências depositadas GenBank para MyoD1 accession number NM_010866, myogenin accession number NM_031189 and peptidylprolyl isomerase-B ([Ppib] – cyclophilin-B) accession number NM_011149.

10mg de tecido de cada amostra foi misturada com 300 ul de solução de homogeneização e 1µl de proteinase K e em seguida cada amostra de tecido foi mascerada junto com esses reagentes. Em seguida, foi dispensado dentro de cada poço da placa de captura, 20µl dos homogenatos, 70µl de *Diluted Lysis Mixture*, e 10µl de *Working Probe Set* (pool) preparado com 3µl de cada Probe Set (CE, LE, BL) (Fig. 1-A) e 291µl de *Lysis Mixture*. Em seguida, a placa de captura foi vedada e incubada a 53°C, por 16-20h, *overnight*. Os poços da placa foram então lavados 1X com 200 µl/well e 3X com 300 ul/well de *wash buffer* (Panomics). Em seguida, os resíduos de wash buffer foram removidos da placa de captura por meio de uma centrifuga de placa com *spinning* invertido de 240 x g durante 1 min. Os sinais para os alvos mRNA foram desenvolvidos por meio de hibridização seqüencial com branched DNA (bDNA) amplificador (Fig.1-B) e fosfatase alcalina-conjugada ao *label probe*, a 46° C por 1 h cada. Quatro lavagens com wash buffer foram realizadas para remover os resíduos de material após cada etapa de hibridização. *Substrate Working Reagent (Substrate plus Lithium Lauryl Sulfate)* (Fig.1-C) foi adicionado aos poços e incubados a 46 °C durante 30 min. O sinal de Luminescência de

cada poço foi mensurado usando um *fluorimeter* Victor 3 (Perkim Elmer). Em todo experimento, as amostras de RNA foram feitas em duplicada (n=2). As medidas foram padronizadas por meio da concentração de proteína de cada amostra, usando o método *Bradford*. Os sinais do *background* foram determinados na ausência de RNA. Os sinais obtidos na presença de RNA foram subtraídos do background e divididos pela concentração de proteínas.

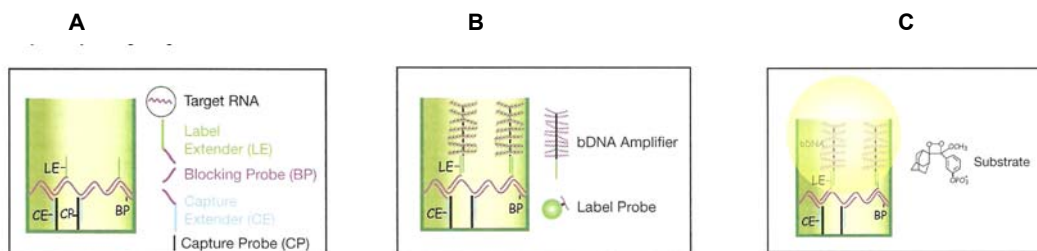


Fig. 1- A) Molécula de RNA liberadas das células na presença de Lysis mixture e hibridizadas aos Probe Sets (CE, LE, BL). B) Sinal de Amplificação: O amplificador bDNA hibridiza ao LE para o complexo RNA-Probe Set na placa de captura. C) Detecção da Análise: O substrato quimio-luminescente é adicionado à placa de captura e incubado durante 30 minutos à 43°. O sinal de luminescência gerado é proporcional a quantidade de RNA presente na amostra.

Análise estatística

As médias das duplicatas do experimento foram usadas para análise estatística. Os dados foram transformados pelo log₁₀ (au) e submetidas ao ANOVA usando o procedimento GLM do pacote estatístico SAS (SAS Institute, 2002/2003). ANOVA consistiu da comparação da expressão inter-genes (expressão gênica versus grupos lesão e controle) e intra-genes (oito tratamentos e a expressão gênica), empregando o teste Tukey.

Resultados

1. Expressão gênica de mRNA miogenina através de bDNA

A ANOVA entre os tratamentos e a expressão gênica de miogenina mRNA revelou diferença ($p < 0,05$) entre os grupos G1, G2, G3, G4 quando comparados com o G7 e G8. Contudo, não houve diferença no grupo G5

quando comparado com os grupos G7 e G8. Quando comparamos todos os grupos com o G7, houve diferença ($p < 0,05$) apenas nos grupos G1, G2, G3 e G4. Em relação à comparação intergrupos, não houve diferença entre G1 e G2; G3 e G4; G5 e G6 na expressão gênica de mRNA miogenina. Não houve diferença também entre os grupos G7 e G8 (Fig. 2).

2. Expressão gênica de mRNA MyoD através de bDNA

A análise de variância entre os tratamentos e a expressão gênica de mRNA MyoD revelou diferença ($p < 0,05$) nos grupos G1, G2, G3, G4 e G6 quando comparados com o G8. Contudo, não houve diferença entre G5 e o G8. Quando comparamos todos os grupos com o G7, houve diferença ($p < 0,05$) apenas nos grupos G1, G2, G3 e G4. A comparação intergrupos e dos tratamentos e a expressão gênica de MyoD, mostra diferença ($p < 0,05$) apenas entre os grupos G5 e G6. Houve também diferença ($p < 0,05$) entre G7 e G8 (Fig. 3).

3. Expressão gênica de mRNA Ppib como *housekeeping* para miogenina mRNA

Em relação à expressão gênica de Ppib mRNA como *housekeeping* de mRNA miogenina houve diferença ($P < 0,05$) nos grupos G1, G2, G3 e G4 quando comparados com o G7 e o G8 (Fig 1). Não houve diferença nos grupos G5 e G6 quando comparados com o G7 e G8. A comparação intergrupos em relação à expressão gênica de mRNA Ppip mostra que não houve diferença entre os grupos G1 e G2; G3 e G4; G5 e G6; e G7 e G8. Nenhuma diferença foi encontrada quando comparamos a expressão de mRNA miogenina com a expressão dos respectivos mRNA Ppib nos grupos G1, G2, G3, G4, G5, G6 e G7. Diferença ($p < 0,05$) foi observada entre a expressão do G8 de mRNA miogenina e G8 mRNA Ppib (Fig. 2).

4. Expressão gênica de mRNA Ppib como *housekeeping* para MyoD mRNA

Em relação à expressão de mRNA Ppib como *housekeeping* de mRNA MyoD houve diferença ($p < 0,05$) nos grupos G1, G3, G4 e G6 quando comparados ao grupo G8. Nenhuma diferença foi observada nos grupos G2 e

G5 quando comparada com o grupo G8. No entanto, houve diferença ($p < 0,05$) nos grupos G1, G3, G4 e G6 quando comparado com o grupo G7.

Nenhuma diferença foi observada em relação à expressão gênica de Ppib mRNA intergrupos G3 e G4 bem como entre os grupos G7 e G8. Contudo, houve diferença ($p < 0,05$) entre os grupos G1 e G2; G5 e G6. Não houve diferença em relação à expressão gênica de mRNA MyoD com seus respectivos mRNA Ppib nos grupos G1, G2, G3 e G4. Contudo, houve diferença ($p < 0,05$) em relação à expressão de mRNA Ppib entre os grupos G5, G6, G7 e G8 (Fig. 3).

A transformação de \log_{10} (au) providenciou efetivo melhoramento na qualidade dos dados. Os valores de Skewness, Kurtosis e coeficiente de variância para os (au) observados foram 1.7496, 3.1269 e 112.4302, respectivamente. Após a transformação \log_{10} (au) os valores foram reduzidos para -0.5353, -0.3765 e 11.5878, respectivamente. A figura 1 exibe os resultados da análise da expressão da miogenina e a figura 2 exibe os resultados de MyoD.

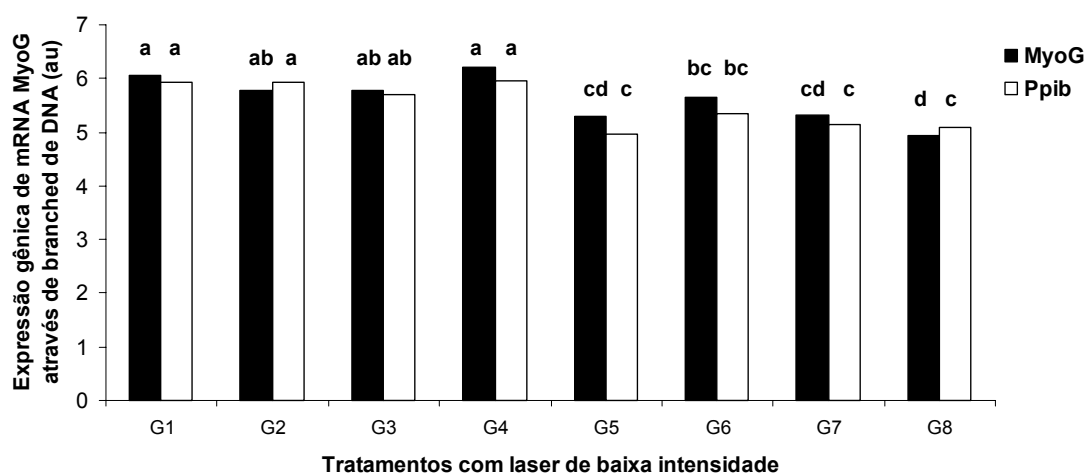


Fig. 2- Expressão gênica de mRNA miogenina (MyoG) e mRNA ciclofilina (Ppib) analisadas através de branched DNA em músculos tratados com laser de baixa intensidade. Os dados de oito tratamentos foram transformados por \log_{10} em unidades arbitrárias (au) e submetidos ao ANOVA usando o procedimento GLM do SAS pacote estatístico. O nível de significância foi $p < 0.05$. a,b,c,d diferentes quando comparados os tratamentos e a expressão gênica. Letras diferentes no mesmo espaço indicam significância ($P < .05$) por teste Tukey. G1= $\lambda 514\text{nmWI}$; G2= $\lambda 514\text{nm+I}$; G3= $\lambda 660\text{nmWI}$; G4= $\lambda 660\text{nm+I}$; G5= $\lambda 780\text{nmWI}$; G6= $\lambda 780\text{nm+I}$; G7= Lesão; G8=Controle.

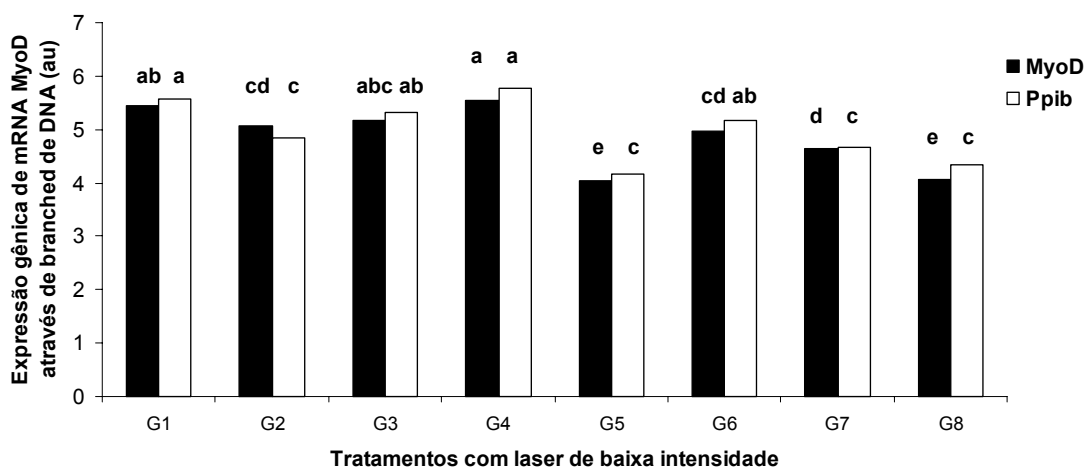


Fig. 3- Expressão gênica de mRNA MyoD e mRNA ciclofilina (Ppib) analisadas através de branched DNA em músculos tratados com laser de baixa intensidade. Os dados de oito tratamentos foram transformados por \log_{10} em unidades arbitrárias (au) e submetidos ao ANOVA usando o procedimento GLM do SAS pacote estatístico. O nível de significância foi $p < 0.05$.

a,b,c,d diferentes quando comparados os tratamentos e a expressão gênica.

Letras diferentes no mesmo espaço indicam significância ($P < .05$) por teste Tukey.

G1= λ 514nmWI; G2= λ 514nm+I; G3= λ 660nmWI; G4= λ 660nm+I; G5= λ 780nmWI; G6= λ 780nm+I; G7= Lesão; G8=Controle.

Discussão

O presente estudo empregou bDNA para aumentar nossa compreensão sobre as interações entre o laser de baixa intensidade e alguns mecanismos moleculares e celulares envolvidos na regeneração do músculo esquelético. Este é o primeiro estudo que investigou *in vivo* três comprimentos de onda do laser de baixa intensidade sobre a expressão gênica de miogenina e MyoD durante a regeneração muscular através de bDNA. Para isso, nós decidimos analisar os efeitos da irradiação laser sobre a expressão gênica de MyoD e miogenina reconhecidos por mediar a proliferação e diferenciação da célula satélite durante a regeneração muscular [1,2,8,9,26]. Nossos resultados mostram que o tratamento com os lasers λ =514nm e λ =660nm exerceram maior influência sobre a expressão gênica de mRNA miogenina e mRNA MyoD nos grupos G1, G2, G3, G4 e G6 quando comparados com o grupo controle. O laser 780 nm não exerceu influência sobre a expressão gênica de miogenina nos grupos tratados. No entanto, influenciou a expressão gênica de myoD nos grupos sem lesão, tratados com laser 780nm. Estudos mostram que a

irradiação laser ativa as células satélites quiescentes e as dirige para a fase recente do ciclo celular, mediando seus efeitos sobre a proliferação da célula satélite [21,25].

Estudos mostram que o laser de baixa intensidade promove a regeneração do músculo esquelético *in vivo* [17,25,27]. A radiação laser estimulou a proliferação da célula satélite, evidenciada pelo aumento da expressão da proteína *cyclin A* e pela maior incorporação de timidina, seguida por maior média de crescimento em células irradiadas quando comparada com os grupos controles não irradiados [25]. Nossos resultados mostram que o tratamento com laser nos grupos G1, G2, G3, G4 e G6 (Fig. 2 e 3) exerceu influência sobre a fase proliferativa da regeneração muscular. Assim sendo, esses lasers influenciaram a expressão gênica de miogenina e MyoD até o quinto dia da regeneração (Fig.4). Nossos resultados estão de acordo com os dados encontrados por Zhao and Hoffman [8] que demonstraram que MyoD e miogenina são fortemente coordenadas e induzidas no terceiro dia da regeneração e a transcrição de ambas são rapidamente reprimidas em 48 h.

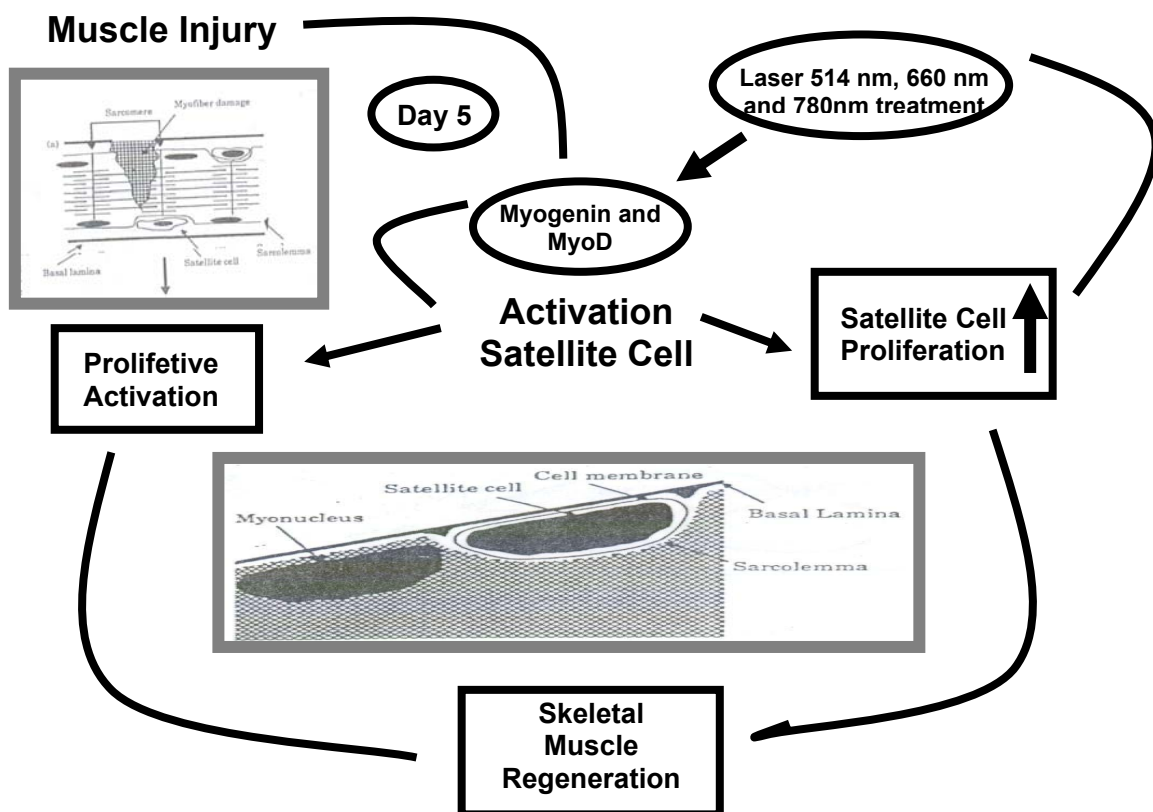


Figure 4. Satellite cell activation via *upregulation* of miogenina and MyoD transcription factor activation during skeletal muscle regeneration.

Existem várias discordâncias na literatura em relação ao aumento na expressão de MyoD e miogenina na regulação miogênica durante a regeneração muscular. Os produtos gênicos MyoD e miogenina são considerados críticos na determinação da célula muscular, diferenciação e ativação da expressão de genes específicos dos músculos [1,9,10,28]. Um estudo [29] mostrou que a miogenina é expressa no reparo e regeneração, seguidos de dano local das fibras musculares. Outro estudo mostrou que miogenina é também importante na diferenciação terminal e fusão de mioblastos em fibras musculares maduras [10]. Estudos mostram que MyoD e miogenina são fortemente induzidas no terceiro dia da regeneração [8]. Na verdade, a regeneração muscular parece recapturar, em alguma extensão, o processo de desenvolvimento embriônico [3], no qual a miogenina e MyoD são expressas nos miótomos iniciais E 8.5 a 10.0 somitos [30]. De acordo com nossos resultados podemos afirmar que os lasers $\lambda=514\text{nm}$, $\lambda=660\text{nm}$ e $\lambda=780\text{nm}$ exerceram influência sobre a expressão gênica de mRNA miogenina e mRNA MyoD na fase proliferativa da regeneração muscular. Em relação à expressão gênica de mRNA miogenina e mRNA MyoD nos grupos G1 e G3, a irradiação laser provavelmente exerceu influência sobre o estado redox intracelular nas células do grupo sem lesão. Não existe consenso na literatura em relação às ações do laser sobre tecidos danificados ou saudáveis.

Estudos mostram três vias de regulação na sinalização celular através do laser. Primeira, é o controle dos fotoceptores sobre o nível de ATP intracelular. Pequenas alterações no nível de ATP podem alterar o metabolismo celular e influenciar a regulação da homeostasia redox. A segunda e terceira vias de regulação são mediadas através do estado redox celular. Estas vias envolvem fatores de transcrição redox-sensitivos *nuclear factor kappa β* e *activator protein* (NF-kB e AP-1) ou cascatas de sinalizações celulares homeostáticas do citoplasma via membrana celular para o núcleo. Acredita-se que o estímulo extra celular elicit respostas celulares tais como, proliferação e diferenciação através destas vias de sinalização. A modulação do estado redox celular afeta a expressão gênica via mecanismos de sinalização celular (efetores moleculares tais como fatores de transcrição e fosfolipase A_2). Existem pelo menos dois fatores de transcrição bem definidos NF-k β e AP-1 – que foram identificados

como reguladores do estado redox celular. A ativação do metabolismo pela luz visível monocromática é um fenômeno redox-regulado: a radiação é absorvida pelos componentes da cadeia respiratória que constitui o início da regulação redox [31,32]. De acordo com nossos resultados, estes mecanismos provavelmente ocorrem em tecidos saudáveis também.

Para interagir com as células, a luz é absorvida por cromóforos intracelulares. A interação depende do espectro de absorção dos cromóforos, do comprimento de onda da luz bem como da intensidade e da dose de energia. Porfirinas, flavinas, citocromos mitocondriais e a membrana plasmática com o sistema oxidase NADPH, o qual contém flavoproteínas e citocromo-b, são os principais candidatos para cromóforos endógenos. Pelo fato dos cromóforos serem fotosensíveis, eles absorvem luz e a transferem para espécies de oxigênio molecular, produzindo espécies de oxigênio reativo (ROS). Os ROS presentes em baixas concentrações, abaixo do limite requerido para citotoxicidade, apresentam amplo efeito estimulatório positivo na célula [33].

Estudos mostram que espécies de oxigênios reativos (ROS) estimulam o processo de transdução do sinal, ativando assim, fatores de transcrição, expressão gênica, proteínas da contração muscular e crescimento celular [22,34,35]. Estudos utilizando microarray para avaliar o perfil de expressão gênica de fibroblastos humanos irradiados com laser vermelho mostraram que entre 111 genes expressos pelo efeito da luz, as enzimas Nicotinamida adenina dinucleotídeo desidrogenase (NADH desidrogenase) e ATP sintase apresentaram expressões aumentadas [36]. De acordo com nossos resultados, é provável que os lasers $\lambda=514$ nm, $\lambda=660$ nm nm foram capazes de interagir eletivamente com os cromóforos intracelulares, agindo no DNA e conseqüentemente, aumentando a transcrição do mRNA miogenina e do mRNA MyoD.

No presente estudo, o laser $\lambda=780$ nm não exerceu influência sobre a expressão gênica de mRNA MyoD e mRNA miogenina em tecidos musculares não danificados. A partir desse resultado, podemos inferir que o laser $\lambda=780$ nm laser não ativou os mecanismos de fotobiomodulação nas células musculares não danificadas. Vários estudos mostram que a luz visível pode alterar o estado redox da célula, aumentando a capacidade de redução celular, aumentando a

síntese de ATP e DNA [20,31,33,37,38]. Esta mudança no estado redox da célula ocorre devido interações do efeito estimulatório da luz com fotoceptores localizados na mitocôndria. Essas interações dependem do comprimento de onda da luz, bem como da intensidade e dose de energia [33]. Este fenômeno provavelmente ocorre independente de lesão tecidual. De acordo com nossos resultados, é provável que este mecanismo não tenha sido ativado pelo laser $\lambda=780\text{nm}$ nos tecidos não danificados.

Estudos prévios sobre o efeito estimulatório da LILT na proliferação celular, realizados em culturas primárias de células [24], indicam que doses de baixa energia do laser diodo $\lambda=780\text{nm}$ acelera as mitoses celulares. Ben-Dov et al. [25] mostrou que a LILT afeta a proliferação e a diferenciação da célula satélite *in vitro*. Este nível de energia é capaz de ativar as células satélites quiescentes e possivelmente mediar seus efeitos sobre a proliferação da célula satélite. De acordo com os nossos resultados é provável que os lasers $\lambda=514\text{nm}$, $\lambda=660\text{nm}$ e $\lambda=780\text{nm}$ ativaram as células satélites na fase proliferativa da regeneração muscular como evidenciado pelo aumento de expressão gênica de mRNA miogenina e mRNA MyoD nos grupos lesionados e tratados cinco dias após a lesão.

Um estudo mostrou que a irradiação laser $\lambda=514\text{nm}$ pode promover a síntese de ATP [40]. Estudos clínicos relatam que a luz verde coerente (argônio laser) promove cicatrização de feridas [41,42]. A irradiação laser $\lambda=514\text{nm}$ age sobre a cadeia de transporte de elétrons; aumenta o fluxo de elétrons, promovendo influxo de próton através da síntese de ATP [40]. É possível que pequenas alterações na concentração de nucleotídeos adenina (ATP, ADP, e AMP) induzam alterações consideráveis no metabolismo celular, tais como nucleotídeos que agem como efetores alostéricos (ativadores e inibidores) de várias enzimas chaves do metabolismo energético [37,43].

Um estudo mostrou que o laser visível é mais efetivo em promover a regeneração de diversos tecidos enquanto o laser infravermelho apresenta melhor efeito no tratamento da dor e da inflamação [44]. De acordo com os nossos resultados, podemos concluir que apenas o laser $\lambda=660\text{nm}$ exerceu influência sobre a regeneração do músculo esquelético, baseado no aumento da expressão da mRNA miogenina e mRNA MyoD na fase proliferativa da regeneração muscular.

Ao comparar os tratamentos e a expressão gênica de mRNA miogenina, nossos resultados revelaram que não houve diferença entre os grupos. Contudo, comparando os tratamentos em relação à expressão gênica de mRNA MyoD, houve diferença apenas entre os grupos G1 e G2; G5 e G6. Estes grupos expressaram mRNA MyoD, mas o grupo G6 exibiu maior expressão. Estudos mostram que o laser $\lambda=780\text{nm}$ estimulou as mitocôndrias, gerando ROS e provocou o aumento da proliferação de culturas de queratinócitos [24,39]. Nossos resultados mostraram que o laser diodo $\lambda=780\text{ nm}$ apresenta efeito bioestimulatório das atividades celulares, aumentando a proliferação celular durante a regeneração muscular conforme determinado pelo aumento da expressão gênica de mRNA MyoD.

Baseados em dados da literatura, nós não podemos explicar a diferença entre a expressão gênica do *housekeeping* Ppib como controle de miogenina e MyoD. Nós sugerimos que esta diferença na expressão foi devido à diferença na variabilidade da expressão gênica entre os músculos dos animais. Nós concluímos que *cyclophilin-B* (Ppib) não é um gene *housekeeping* apropriado para músculo esquelético, por ser um gene constitutivo que expressa proteínas da matriz celular e por fazer parte das vias da homeostasia celular. Estudos com microarray mostram que *cyclophilin-B* é uma proteína da matriz celular do músculo esquelético em Duroc and Taoyuan pigs [45]. Mitchell et al. [46] mostraram que *cyclophilin* está envolvida em ambos, manutenção e crescimento do músculo normal via *calcineurin* (CN) and *cyclosporin A* (CsA). CN e CsA estão também envolvidas na manutenção da homeostasia muscular. CN é um potente regulador da regeneração muscular via NFATc1 e GATA-2 [47]. A expressão de proteínas regulatórias das vias de sinalização CN envolve a regulação da expressão de várias isoformas de *cyclophilin* (A, B e C), que são receptores intracelulares para CsA que liga e inibe CN em diferentes extensões. Contudo, é provável que Ppib seja provavelmente mais sensível à irradiação laser durante a regeneração muscular.

Conclusões

O presente estudo sugere que a irradiação laser promove efeitos miogênicos *in vivo*, que podem ser devidos a seus efeitos sobre a ativação da

célula satélite pela expressão gênica de MyoD e miogenina na fase proliferativa recente da regeneração do músculo esquelético. A expressão gênica foi evidenciada em ambos os fatores de transcrição MyoD e miogenina em músculos com lesão tecidual induzida e em tecido muscular normal em camundongos. *Cyclophilin-B* não constitui um gene *housekeeping* apropriado para análise de expressão gênica em músculos esqueléticos.

Agradecimentos

Este trabalho foi suportado pelo CNPq e Fapesp.

Referências

1. Hauke, T.J.; Garry, D.J. Myogenic satellite cells: Physiology to molecular biology. *Journal of Applied Physiology*. 91:534-551, 2001.
2. Moran, J. L.; Li, Y.; Hill, A. A.; Mounts, W. M.; Miller, C. P. Gene Expression changes during mouse skeletal myoblast differentiation revealed by transcriptional profiling. *Physiological Genomics*. 10:103-111, 2002.
3. Chargé, S. B. P.; Rudnicki, M. A. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *American Physiological Society*. 84:209-238, 2004.
4. Shi, X.; Garry, D. J. Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. *Genes & Development*. 20:1692-1708, 2006.
5. Cserjesi, P.; Olson, E. N. Myogenin induces the myocyte-specific enhancer binding factor MEF-2 independently of other muscle-specific gene products. *Molecular and Cellular Biology*. 11:4854-4862, 1991.
6. Lassar, A. B.; Davis, R. L.; Wright, W. E. Kadesch, T.; Murre, C.; Voronova, A. Baltimore, D.; Weintraub, H. Functional activity of Myogenin HLH proteins requires hetero-oligomerization with E12/E47-like proteins in vivo. *Cell*. 66:305-315, 1991.
7. Stamler, J.S.; Meissner, G. Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. *Physiological Reviews*. 81:209-237, 2001.

8. Zhao, P.; Hoffman, E. P. Myosin isoforms and repression of MyoD in muscle regeneration. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 342:835-842, 2006.
9. Ishibashi, J.; Perry, R. L.; Asakura, A.; Rudnicki, M. A. MyoD induces differentiation through cooperation of its NH²- and COO-terminal regions. *The Journal of Cell Biology*. 171:(3), 471-482, 2005.
10. Rawls, A.; Wilson-Rawls, J.; Olson, E. N. Genetic regulation of somite formation. *Developmental Biology*. 47:131-154, 2000.
11. Järvinen, T. A. H.; Järvinen, T. L. N.; Kääriäinen, M.; Kalimo, H.; Järvinen, M. Muscle injuries – Biology and Treatment. *The American Journal of Sports Medicine*. 33(5):745-764, 2005.
12. Castro-e-Silva, O.J.; Zucoloto, S.; Menegazzo, L.A.G.; Granato, R.G.; Marcassa, L.G.; Bagnato, V.S. Laser enhancement in hepatic regeneration for partially hepatectomized rats. *Lasers in Surgery and Medicine*. 29:73-77, 2001.
13. Castro-e-Silva, O. J.; Zucoloto, S.; Marcassa, L. G.; Marcassa, J.; Kurachi, C.; Melo, C.A. S.; Ramalho, F. S.; Ramalho, L. N. Z.; Bagnato, V.S. Spectral response for laser enhancement in hepatic regeneration for hepatectomized rats. *Lasers in Surgery and Medicine*. 32:50-53, 2003.
14. Colan, M. J.; Rapley, J. W.; Cobb, C. M. Biostimulation of wound healing by low-energy laser irradiation. A review. *Journal of Clinical Periodontology*. 23:492-496, 1996.
15. Yaakobi, T.; Maltz, L.; Oron, U. Promotion of bone repair in the cortical bone of the tibia in rats by low-energy laser (He-Ne) irradiation. *Calcified Tissue International*. 59:297-300, 1996.
16. Gigo-Benato, D.; Geuna, S.; Rochkind, S. Phototherapy for enhancing peripheral nerve repair: a review of the literature. *Muscle & Nerve*. 31:694-701, 2005.

17. Weiss, N.; Oron, U. Enhancement of muscle regeneration in the rat gastrocnemius muscle by low energy laser irradiation. *Anatomy and Embriology*. 186:497-503, 1992.
18. Bibikova, A. Oron, U. Promotion of muscle regeneration in the toad (*Bufo viridis*) gastrocnemius muscle by low-energy laser irradiation. *The Anatomical Record*. 235:374-380, 1993.
19. Amaral, A. C.; Parizotto, N. A.; Salvini, T. F. Dose-dependency of low-energy He-Ne laser effect in regeneration of skeletal muscle in mice. *Lasers in Medical Science*. 16:44-51, 2001.
20. Karu, T.; Pyatibrat, L.; Kalendo, G. Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated in vitro. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 27:219-223, 1995.
21. Shefer, G.; Partridge, T. A.; Heslop, L.; Gross, J. G.; Oron, U.; Halevy, O. Low-energy laser irradiation promotes the survival and cell cycle entry of skeletal muscle satellite cells. *Journal of Cell Science*. 115:1461-1469, 2002.
22. Vladimirov, Y. A.; Osipov, A. N.; Klebanov, G. I. Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation. *Biochemistry*. 69 (1):81-90, 2004.
23. Yu, W.; Nain, J. Q.; Lanzafame, R. J. The effect of laser irradiation on the release of bFGF from 3t3 fibroblasts. *Photochemistry and Photobiology*. 59:167-170, 1994.
24. Grossman, N.; Schneid, N.; Reuveni, H. Enhanced proliferation of keratinocyte cultures following 780nm low-power diode laser irradiation. Involvement of reactive oxygen species. *Lasers in Surgery and Medicine*. 22:212-218, 1998.
25. Ben-Dov, N.; Shefer, G.; Irintchev, A.; Wernig, A.; Oron, U.; Halevy, O. Low-energy laser irradiation affects satellite cell proliferation and differentiation in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1448:372-380, 1999.

26. Hill, M.; Werning, A.; Goldspink, G. Muscle satellite (stem) cell activation during local tissue injury and repair. *Journal of Anatomy*. 203:89-99, 2003.
27. Bibikova, A. Oron, U. Regeneration in denervated toad (*Bufo viridis*) gastrocnemius muscle and the promotion of the process by low energy laser irradiation. *The Anatomical Record*. 241:123-128, 1995.
28. Vivian, J. L.; Olson, E. N.; Klein, W. H. Thoracic skeletal defects in Myogenin- and MRF4-deficient mice correlate with early defects in myotome in intercostal musculature. *Developmental Biology*. 224:29-41, 2000.
29. Cornelison, D. D. Wold, B. J. Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells. *Developmental Biology*. 191: 270-283, 1997.
30. Sassoon, D.; Lyons, G. E.; Wright, W. E.; Lin, V. K.; Lassar, A. B.; Weintraub, H.; Buckingham, M. Expression of two Myogenin-related regulatory factors Myogenin and MyoD1 during mouse embryogenesis. *Nature*. 341:303-307, 1989.
31. Karu, T. Low-power laser therapy. *Biomedical Photonics Handbook*. 48:1-25, 2003.
32. Karu, T.; Mechanism of interaction of monochromatic visible light with cells. *SPIE*. 2630:1-9, 1995.
33. Lubart, R.; Eichler, M.; Lavi, R.; Friedman, H.; Shainberg, A. Low-energy laser irradiation promotes cellular redox activity. *Photomedicine and Laser Surgery*. 23:3-9, 2005.
34. Suzuki, Y. J.; Ford, G. D. Redox regulation of signal transduction in cardiac and smooth muscle. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 31:345-353, 1999.
35. Rhee, S. G. Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger. *Experimental and Molecular Medicine*. 31:53-59, 1999.

36. Zhang, Y.; Song, S.; Fong, C-C.; Tsang, C-H.; Yang, Z.; Yang, M. cDNA microarrays analysis of gene expression profiles in human fibroblast cells irradiated with red light. *Journal of Investigative Dermatology*. 120:849-857, 2003.
37. Vacca, R. A.; Marra, E.; Quagliariello, E.; Grego, M. Activation of mitochondrial DNA replication by He-Ne laser Irradiation. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 195 (2):704-109, 1993.
38. Karu, T. I. Photobiological fundamentals of low-power laser therapy. *Journal of Quantum Electronics*. 23:1703-1717, 1987.
39. Grossman, N.; Schneid, N.; Reuveni, H.; Halevy, S.; Lubart, R. 780nm low power diode laser irradiation stimulates proliferation of keratinocyte culture: involment of reactive oxygen species. *Lasers in Surgery and Medicine*. 22: 212-218, 1998.
40. Morimoto, Y.; Arai, T.; Klkuchi, M.; Nakajlma, S.; Nakamura, H. Effect of low-intensity Argon laser irradiation on mitochondrial respiration. *Lasers in Surgery and Medicine*. 15:191-199, 1994.
41. Kana, J. S.; Hutschenreiter, G.;Haina, D.;Waidelich, W. Efect of low-power density laser irradiation on healing of open skin wounds in rats. *Archives of Surgery*. 116:293-296, 1981.
42. Mester, E.; Mester, A. F.; Mester, A. The biomedical effects of laser application. *Lasers in Surgery and Medicine*. 5:31-39, 1985.
43. Maddaiah, V. T. Exercise and energy metabolism. *Pediatric Annals*. 13:565-572, 1984.
44. Carrinho, P.M. Rennó, A.C.M. Koeke, P.U.; Salate, A.C.B.; Parizotto, N.A. ; Vidal, B. C. Comparative Study Using 685-nm and 830-nm lasers in tissue repair of tenotomized tendons in the mouse. *Photomedicine & Laser Surgery*. 24:754-758, 2006.

45. Lin, C. S.; Hsu, C. W. Differentially transcribed genes in skeletal muscle of Duroc and Taoyuan pigs. *Journal of Animal Science*. 83:2075-2086, 2005.
46. Mitchell, P. O.; Mills, S. T.; Pavlath, G. K. Calcineurin differentially regulates maintenance and growth of phenotypically distinct muscle. *AJP–Cell Physiology*. 282:984-992, 2002.
47. Sakuma, K.; Nishikawa, J.; Nakao, R.; Watanabe, K.; Totsuka, T.; Nakano, H.; Sano, M.; Yasuhara, M. Calcineurin is a potent regulator for skeletal muscle regeneration by association with NFATc1 and GATA-2. *Acta Neuropathologica*. 105:271-280, 2003.

Efeito do Laser de Baixa Intensidade sobre a Regeneração do Músculo Esquelético *in vivo* através de análise do Perfil de Expressão Gênica de Vegfa, Rcan1, Ndufa1 e Pdgfc

**Olga S. M. Moreira, MSc¹, Livia R. de Assis, MSc¹, Henrique-Silva, F. PhD²,
Vanderlei S. Bagnato, PhD³, Nivaldo A. Parizotto, PhD⁴**

¹Mestre programa de fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos, 13565-905 São Carlos, SP, Brasil

²Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos /SP, 13565-905 São Carlos, SP, Brasil

³Instituto de Física e Ótica São Carlos, Universidade de São Paulo, , Cx. Postal 369, 13560-970, São Carlos, SP, Brasil

⁴Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos, 13565-905 São Carlos, SP, Brszil

Resumo e Objetivo: A técnica de branched DNA foi usada para investigar o perfil de expressão gênica de fator de crescimento endotelial vascular (Vegfa), Regulador de Calcineurina (Rcan1) ([Human] DSCR1 ou Adapt78), NADH dehydrogenase [NADH dhdg] (Ndufa1) e fator de crescimento derivado das plaquetas-c (Pdgfc) *in vivo* em músculos esqueléticos de camundongos irradiados com laser de baixa intensidade. O perfil de expressão gênica revelou que Vegfa, Rcan1, foi aumentado pelos lasers vermelho, infravermelho e verde. A expressão de Ndufa1 foi aumentada pelos lasers vermelho e verde. A expressão de Pdgfc não foi aumentada sob efeito da irradiação laser durante a regeneração do músculo esquelético. Os genes VEGF-A, RCAN1, NADH dhdg, PDGF-C desempenham papel nas seguintes funções: aumento da angiogênese inibição da angiogênese, suprimento de energia para os processos metabólicos, mitoses e angiogênese. O objetivo do presente estudo foi investigar *in vivo* o efeito de diferentes comprimentos de onda do laser sobre o perfil de expressão gênica de mRNA Vegfa, Rcan1, Ndufa1 e pdgfc na regeneração do músculo esquelético.

Materiais e Métodos: Quarenta camundongos machos (*Mus musculus*) foram usados no estudo. O experimento foi realizado em sete dias. No 1º dia foram realizadas as cirurgias dos animais. Nos 2º, 3º e 4º dias, os animais foram

submetidos ao protocolo de irradiação. No 5º dia, os animais foram eutanasiados e os músculos foram congelados. Nos 6º e 7º dias, os músculos foram descongelados e submetidos ao protocolo do Sistema QuantiGene (Panomics^(R)). Os dados de oito tratamentos foram transformados por meio de \log_{10} e submetidos ao ANOVA usando o procedimento *Generalized Linear Models* (GLM) do pacote estatístico do SAS.

Resultados: A análise de expressão gênica mostrou que Vegfa, Rcan1, Ndufa1 foram expressas na fase proliferativa durante a regeneração do músculo esquelético, sob efeito de irradiações de diferentes comprimentos de onda. Pdgfc não foi expresso sob influência do tratamento durante a regeneração do músculo esquelético.

Conclusões: O presente estudo sugere que a irradiação laser foi efetiva sobre a miogênese *in vivo*. Isto pode ser devido ao efeito do laser sobre a ativação da expressão gênica de Vegfa, Rcan1 e Ndufa1 na fase proliferativa da regeneração do músculo esquelético. Pdgfc não foi expresso na fase proliferativa da regeneração muscular. Os transcritos investigados foram expressos em tecidos saudáveis e lesados. A Ciclofilina-B e b-actina não foram *housekeeping* apropriados para músculo esquelético.

Palavras Chaves: laser, branched DNA, expressão gênica, VEGF, RCAN1, PDGF-C, NADH desidrogenase, camundongo.

INTRODUÇÃO

Os músculos esqueléticos exibem alta capacidade regenerativa/reparo seguido de danos tecidual. Após sofrer danos, as células miogênicas são ativadas para proliferar e em seguida diferenciar os mioblastos em miotubos (Shi and Garry, 2006; Germani et al., 2003).

A regeneração muscular depende de vários eventos de sinalização molecular que podem ser influenciados pela terapia laser de baixa intensidade (Beckerman et al., 1992; Oliveira et al., 1999; Shefer et al., 2002). Os efeitos da irradiação laser de baixa intensidade (LILI) sobre a regeneração dos tecidos biológicos depende do tempo, dose, comprimento de onda, frequência da irradiação e absorção espectral nos cromóforos moleculares (Amaral et al., 2001).

Existe íntima relação entre a manutenção do suprimento sangüíneo e a regeneração muscular (Carlson, 1973; Wagatsuma, 2007), indicando que a revascularização desempenha importante papel na regeneração muscular (Carlson, 1983; Wagatsuma, 2007; Shi e Garry, 2006). Estudos sugerem que os eventos moleculares implicados na angiogênese ocorrem no estágio recente da regeneração muscular (Wagatsuma et al., 2006; Wagatsuma, 2007).

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é um fator angiogênico que desempenha um importante papel no desenvolvimento vascular bem como na angiogênese fisiológica e patológica (Germani et al., 2003). Contudo, evidências sugerem que VEGF e seus receptores participam na regeneração muscular (Wagatsuma et al., 2006). VEGF se liga a dois receptores tipo *tyrosine kinase*, Flt-1 and Flk-1/KDR (Minami et al., 2004; Wagatsuma, 2006; Wagatsuma, 2007).

VEGF pode regular a formação das fibras musculares através de um efeito direto sobre as células satélites porque a administração exógena de VEGF estimula a migração de mioblastos (Germani et al., 2003).

A expressão de VEGFA é aumentada em músculos esqueléticos isquêmicos e desempenha papel importante na angiogênese em resposta à isquemia (Rissanen et al., 2002; Germani et al., 2003; Milkiewicz et al., 2004). VEGF e seus receptores estão alterados em resposta a dano muscular,

sugerindo que seu aumento pode desempenhar um importante papel na angiogênese durante a regeneração muscular (Wagatsuma, 2007).

O gene RCAN1, localizado no cromossomo 21, na região 21q22.12 (Hattori et al., 2000; Harris et al., 2005) é altamente expresso em músculos esqueléticos (Harris et al., 2005).

Existem várias discordâncias na literatura sobre as funções do RCAN1. Alguns estudos sugerem que RCAN1 estimula a angiogênese (Lizuka et al., 2004); outros estudos mostram que RCAN1 age inibindo a angiogênese (Minami et al., 2004). Existem alguns estudos que estabelecem relação entre o aumento na expressão de RCAN1 e a hipertrofia muscular esquelética (Musaro et al., 1999; Harris et al., 2005).

As células precursoras miogênicas em adultos, as quais são freqüentemente referidas como células satélites, podem reiniciar atividade proliferativa após dano muscular, e sua progenia se funde em fibras multinucleadas (Mauro, 1979; Reuveni et al., 1990). Estudos com mioblastos derivados de adultos identificaram vários fatores de crescimento fisiológicos que podem regular os estados quiescente e proliferativo das células satélites, incluindo *platelet-derived growth factor* (PDGF) (Reuveni et al., 1990; Tidball and Spencer, 1993; Järvinen et al., 2005).

PDGF tem sido identificado como um importante mediador de cicatrização de feridas e reparo tecidual (Ross et al., 1986; Reuveni et al., 1990), mas seu papel durante a regeneração muscular não foi completamente investigado. É um potente fator mitogênico para várias células mesenquimais, incluindo fibroblastos e células musculares lisas (Heldin and Westermark, 1989; Reuveni et al., 1990). PDGF pode também elicitar processos biológicos, incluindo aumento da media metabólica e quimiotaxia (Heldin and Westernack, 1989; Reuveni et al., 1990) bem como ser expresso após estímulos fisiológicos resultantes de danos musculares (micro traumas) tais como alongamento externo ou carga mecânica (Burkin and Kaufman, 1999; Järvinen et al., 2005).

NADH dhdg é um dos mais importantes doadores de elétrons do sistema de transferência de energia mitocondrial que produzem ATP mediante fosforilação oxidativa (Wilden and Karthein, 1998). A recapitulação do programa miogênico requer produção de energia para execução de vários eventos

regulatórios e biossintéticos. A diferenciação da célula muscular parece depender da função mitocondrial (Duguez et al., 2002).

O objetivo desse estudo foi investigar *in vivo* a influência da terapia laser de baixa intensidade sobre a expressão gênica de Vegfa, Rcan1, pdgfc e Ndufa1 durante a regeneração do músculo esquelético para investigar parâmetros seguros de dosagem que possam ser utilizados em condições clínicas em humanos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

40 camundongos machos da espécie *Mus músculos*, com peso corporal de $40g \pm 1g$, adquiridos pelo Biotério da Universidade Federal de São Carlos/SP Brasil, foram usados para os experimentos. Antes e após o procedimento cirúrgico, os animais foram mantidos sob ciclo natural de luz para adaptação ambiental, aquisição de água e alimento e controle de doenças (cinco por caixa), a uma temperatura ambiental de $\pm 37^{\circ}C$. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos (Protocol Number 007/2005).

Técnica Cirúrgica e Protocolo de Irradiação

O experimento foi realizado em sete dias:

1º dia – Primeiramente, o peso corporal dos animais foi mensurado. Os animais foram anestesiados com Cloridrato de Ketamina 0,02 – 0,05mg/kg e Cloridrato de Xilazina 2% - 0,01 – 0,03mg/kg de acordo com o peso corporal, e em seguida, o músculo tibial anterior direito (MTA) foi exposto por meio de procedimento cirúrgico. A lesão tecidual foi feita por congelamento usando nitrogênio líquido (criolesão). A criolesão consistiu de dois ciclos de congelamento no músculo MTA. O congelamento foi realizado pela aplicação de uma pequena barra de ferro pré-congelada em nitrogênio líquido e mantida num sentido transversal em relação ao ventre do músculo durante 10s (duas vezes). Após pequeno descongelamento, a pele que recobre a lesão foi

suturada com fio de Nylon poliamida (3-0). Em seguida, os animais foram mantidos no biotério durante 24h em gaiolas (37°C) para prevenir hipotermia.

2º, 3º e 4º dias – Os animais foram submetidos ao protocolo de irradiação de acordo com a dose e respectivos comprimentos de onda estabelecidos para cada grupo, durante três dias consecutivos.

5º dia – Os animais de todos os grupos foram previamente anestesiados e em seguida foram submetidos a um procedimento cirúrgico para remover o músculo MTA. O músculo de cada animal foi seccionado em cinco amostras (10mg cada) e em seguida, cada amostra foi colocada em um eppendorf com 300ul de solução de homogeneização RNAase free. Em seguida, as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e mantidas em freezer -80°C. Após estes procedimentos, os animais foram submetidos à eutanásia mediante overdose de anestésico. Todas as incisões cirúrgicas e todas as lesões musculares foram feitas pelo mesmo pesquisador.

6º e 7º dias – As amostras de músculos que foram removidas e previamente congeladas, foram submetidas ao protocolo QuantiGene System (Panomics).

Fonte de Luz

Três fontes de luz foram usadas neste experimento:

- *Indium-gallium-aluminum arsenide (In-Ga-Al-As)* $\lambda=660\text{nm}$ diodo laser (MM Optics); A média de *output* foi 40mW, fluência de 10 J/cm^2 , área de secção transversa do feixe de laser de 0.04cm^2 e tempo de exposição de 10 segundos.
- *Gallium-aluminum-arsenide (Ga-Al-As)* $\lambda=780\text{nm}$ diodo laser (MM Optics) - A média de *output* foi 40mW, fluência de 10 J/cm^2 , área de secção transversa do feixe de laser de 0.04cm^2 e tempo de exposição de 10 segundos.
- *Argon laser* $\lambda=514\text{nm}$ (Nereid Light Phototherapy System, Healthtech, Shanghai, China) – Média de *output* foi 40mW, fluência de 10 J/cm^2 , área de secção transversa do feixe de laser de $0,07\text{cm}^2$ e tempo de exposição de 5 segundos.

Grupos Experimentais

Os animais foram divididos em oito grupos (n=5).

Group 1	G1	Animais sem lesão muscular e tratados	$\lambda=514\text{mWI}$
Group 2	G2	Animais com músculos criolesionados e tratados com laser	$\lambda=514\text{nm}+I$
Group 3	G3	Animais sem lesão muscular e tratados	$\lambda=660\text{nmWI}$
Group 4	G4	Animais com músculos criolesionados e tratados com laser	$\lambda=660\text{nm}+I$
Group 5	G5	Animais sem lesão muscular e tratados	$\lambda=780\text{nmWI}$
Group 6	G6	Animais com músculos criolesionados e tratados com laser	$\lambda=780\text{nm}+I$
Group 7	G7	Animais com músculos criolesionados	sem tratamento
Group 8	G8	Controle	-

Protocolo de Irradiação

Durante o procedimento de irradiação, os animais foram previamente imobilizados pela mão do pesquisador e em seguida foi colocado em uma posição apropriada para expor a área da lesão sobre o feixe de laser. Este procedimento evitou a necessidade de anestésiar os animais durante o procedimento de irradiação.

Em seguida, a irradiação laser foi realizada diretamente sobre a pele que recobre o músculo MTA. Os animais dos grupos G2, G4, e G6 foram irradiados diretamente sobre a incisão cirúrgica enquanto os animais dos grupos G1, G3 e G5 foram irradiados diretamente sobre a área que corresponde ao local da lesão dos grupos que foram lesionados. A aplicação do laser foi realizada com a técnica pontual, diariamente, durante três dias consecutivos, a cada 24 horas, começando a partir do segundo dia.

Procedimento QuantiGene.

Os ensaios QuantiGene foram realizados de acordo com os procedimentos do Quantigene Reagent System (Panomics®). Para quantificação da expressão gênica foi utilizado o Step-by-Step User's Guide for Animal Tissue Homogenates of the QuantiGene Reagent Systems Evaluation Program. As probes foram sintetizadas pela Panomics, baseadas em seqüências depositadas no *GenBank* para Vegfa (VEGF) número de acesso NM_009505, Rcan1 número de acesso NM_162305, Ndufb2 (NADH dhg) número de acesso NM_026612, Pdgfc (PDGF) número de acesso NM_019971, peptidylprolyl isomerase-B ([Ppib] – cyclophilin-B) número de acesso NM_011149 e Actb (actin beta) número de acesso NM_007393.

10mg de tecido de cada amostra foi misturada com 300 µl de solução de homogeneização e 1µl de proteinase K e em seguida cada amostra de tecido foi mascerada junto com esses reagentes. Em seguida, foi dispensado dentro de cada poço da placa de captura, 20µl dos homogenatos, 70µl de *Diluted Lysis Mixture*, e 10µl de *Working Probe Set* (pool) preparado com 3µl de cada Probe Set (CE, LE, BL) (Fig.1-A) e 291µl de *Lysis Mixture*. Em seguida, a placa de captura foi vedada e incubada a 53°C, por 16-20h, *overnight*. Os poços da placa foram então lavados 1X com 200 µl/well e 3X com 300 ul/well de *wash buffer*. Em seguida, os resíduos de *wash buffer* foram removidos da placa de captura por meio de uma centrifuga de placa com *spinning* invertido de 240 x g durante 1 min. Os sinais para os alvos mRNA foram desenvolvidos por meio de hibridização seqüencial com branched DNA (bDNA) amplificador (Fig. 1-B) e fosfatase alcalina-conjugada ao *label probe*, a 46° C por 1 h cada. Quatro lavagens com *wash buffer* foram realizadas para remover os resíduos de material após cada etapa de hibridização. *Substrate Working Reagent* (*Substrate plus Lithium Lauryl Sulfate* (Fig.1-C)) foi adicionado aos poços e incubados a 46 °C durante 30 min. O sinal de Luminescência de cada poço foi mensurado usando um *fluorimeter* Victor 3 (Perkim Elmer). Em todo experimento, as amostras de RNA foram feitas em duplicada (n=2). As medidas foram padronizadas por meio da concentração de proteína de cada amostra, usando o método Bradford. Os sinais do *background* foram determinados na

ausência de RNA. Os sinais obtidos na presença de RNA foram subtraídos do background e divididos pela concentração de proteínas.

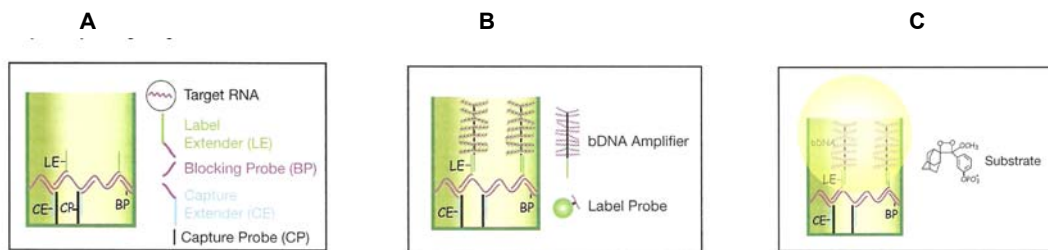


Fig. 1- A) Molécula de RNA liberadas das células na presença de Lysis mixture e hibridizadas aos Probe Sets (CE, LE, BL). B) Sinal de Amplificação: O amplificador bDNA hibridiza ao LE para o complexo RNA-Probe Set na placa de captura. C) Detecção da Análise: O substrato quimio-luminescente é adicionado à placa de captura e incubado durante 30 minutos à 43°. O sinal de luminescência gerado é proporcional a quantidade de RNA presente na amostra.

Análise estatística

As médias das duplicatas do experimento foram usadas para análise estatística. Os dados foram transformados pelo \log_{10} (au) e submetidas ao ANOVA usando o procedimento GLM do pacote estatístico SAS (SAS Institute, 2002/2003). ANOVA consistiu da comparação da expressão inter-genes (expressão gênica versus grupos lesão e controle) e intra-genes (oito tratamentos e a expressão gênica), empregando o teste Tukey.

RESULTADOS

1. Expressão gênica de mRNA Vegfa através de bDNA

O ANOVA entre os tratamentos e a expressão gênica de mRNA Vegfa mostrou diferença ($p < 0.05$) entre os respectivos grupos tratados: G1; G2; G3; G4; G5; G6 e G7 quando comparados ao G8. Quando comparamos todos os grupos com G7 não houve diferença.

Comparando os tratamentos entre os grupos G1 e G2; G3 e G4; G5 e G6 para mRNA Vegfa nossos resultados mostraram que não houve diferença entre

eles em relação a expressão de mRNA Vegfa. Por outro lado, houve diferença entre G7 e G8 (Fig. 2).

2. Expressão gênica de mRNA Rcan1 através de bDNA

A análise de variância entre os tratamentos e a expressão gênica de mRNA Rcan1 mostrou diferença ($p < 0.05$) entre os respectivos grupos tratados: G1, G2, G3 e G4 quando comparados com G8. Contudo, não houve diferença entre G5 e G6 e o G8. No entanto, os valores de expressão do G8 foram maiores do que os grupos G1, G2, G3 e G4 (tabela 1). Em relação ao G7 e G8 não houve diferença.

Quando comparamos todos os grupos com o G7 houve diferença ($p < 0.05$) entre G1, G2, G3; G5 e G6.

Comparando os tratamentos intergrupos, para a expressão gênica de Rcan1, houve diferença ($p < 0.05$) apenas entre os grupos G3 e G4. Não houve diferença entre G7 e G8 (Fig.3).

3. Expressão gênica de mRNA Ndufa1 através de bDNA

A ANOVA entre os tratamentos e a expressão gênica de mRNA Ndufa1 mostrou diferença ($p < 0.05$) apenas entre G1 e G4 quando comparados com o G8. Portanto, não houve diferença para os grupos G2, G3; G5; G6 e G7 comparados ao G8. Quando comparamos todos os grupos com o G7 houve diferença ($p < 0.05$) entre G1, G2, G3; G4.

Comparando os tratamentos intergrupos para a expressão de Ndufa1, houve diferença ($p < 0.05$) apenas entre os grupos G3 e G4. Não houve diferença entre G7 e G8 (Fig.4).

4. Expressão gênica de mRNA Pdgfc através de bDNA

A análise de variância entre os tratamentos e a expressão gênica de mRNA Pdgfc mostrou que não houve diferença entre todos os grupos tratados.

Comparando os tratamentos intergrupos para a expressão de Pdgfc, houve diferença ($p < 0.05$) apenas entre os grupos G7 e G8 (Fig. 5).

5. Expressão gênica de mRNA Ppib como *housekeeping* para Vegfa mRNA

Em relação à expressão gênica de mRNA Ppib como *housekeeping* de mRNA Vegfa houve diferença ($p < 0.05$) entre G1 e G5 comparados ao G8. Houve diferença ($p < 0.05$) entre G7 e G8 também, mas de acordo com a tabela 1, o grupo controle expressou mais do que todos os grupos tratados. Assim sendo, esta diferença não é significativa.

Comparando os tratamentos entre os grupos houve diferença ($p < 0.05$) entre G1 e G2; e entre G7 e G8 para a expressão gênica de mRNA Ppib.

Comparando os grupos G1, G2, G3, G4, G5, G6 e G7 para mRNA Vegfa com a expressão de seus respectivos mRNA Ppib houve diferença ($p < 0.05$) entre G1 mRNA Vegfa e G1 mRNA Ppib; G2 mRNA Vegfa e G2 mRNA Ppib; G3 mRNA Vegfa e G3 mRNA Ppib; G8 mRNA Vegfa e G8 mRNA Ppib (Fig. 2).

6. Expressão gênica de mRNA Ppib como *housekeeping* para Rcan1 mRNA

Em relação à expressão gênica de mRNA Ppib como *housekeeping* para mRNA Rcan1 houve diferença ($p < 0.05$) entre G1, G2, G3 e G4 comparados com o G8. Mas, de acordo com a tabela 1 apenas os grupos G5, G6 tiveram maior expressão que o grupo G8.

Comparando os tratamentos entre os grupos, houve diferença ($p < 0.05$) entre G3 e G4; G7 e G8 para a expressão de mRNA Ppib.

Comparando a expressão de mRNA Rcan1 nos grupos G1, G2, G3, G4, G5, G6 e G7 com a expressão dos seus respectivos mRNA Ppib, houve diferença ($p < 0.05$) entre G2 mRNA Rcan1 e G2 mRNA Ppib; G3 mRNA Rcan1 e G3 mRNA Ppib; G4 mRNA Rcan1 e G4 mRNA Ppib (Fig.3).

7. Expressão gênica de mRNA Ppib como *housekeeping* para Ndufa1 mRNA

Em relação à expressão de mRNA Ppib como *housekeeping* para mRNA Ndufa1 houve diferença ($p < 0.05$) entre G2; G3; G6 e G7 comparados ao G8. Contudo, a expressão do G8 foi maior do que a expressão dos G2 e G3 (tabela 1).

Comparando os tratamentos entre os grupos houve diferença ($p < 0.05$) na expressão entre os grupos G1 e G2; G3 e G4; G5 e G6 e entre G7 e G8 para a expressão gênica de mRNA Ppib.

Comparando a expressão gênica nos grupos G1, G2, G3, G4, G5, G6 e G7 de mRNA Ndufa1 com a respectiva expressão de mRNA Ppib houve diferença ($p < 0.05$) entre a expressão de G1 mRNA Ndufa1 e G1 mRNA Ppib; G2 mRNA Ndufa1 e G2 mRNA Ppib; G4 mRNA Ndufa1 e G4 mRNA Ppib (Fig.4).

8. Expressão gênica de mRNA b-actina como *housekeeping* para Pdgfc mRNA

Em relação à expressão gênica de mRNA b-actina como *housekeeping* para mRNA Pdgfc não houve diferença significativa entre os grupos tratados comparados com o G8.

Comparando todos os grupos com o G7, o único grupo diferente foi o G5.

Comparando os grupos G1, G2, G3, G4, G5, G6 e G7 mRNA Pdgfc com as respectivas expressões gênicas de mRNA b-actina houve diferença ($p < 0.05$) entre G1 mRNA Pdgfc e G1 mRNA b-actina (Fig. 5).

A transformação \log_{10} (au) mostrou um efetivo melhoramento na qualidade dos dados; os valores de skewness, kurtosis e coeficiente de variação para os (au) observados foram, respectivamente, 1.7496, 3.1269 e 112.4302, e após a transformação \log_{10} (au), foram reduzidos, respectivamente, para -0.5353, -0.3765 e 11.5878. Os resultados das análises são apresentados na figura 1 para Vegfa, na figura 2 para Rcan1, na figura 3 para Ndufa1 e na figura 4 para Pdgfc.

Tabela 1. Análise da expressão gênica de *Vascular endothelial growth factor-a* (*Vegfa*), *Regulator of calcineurin 1* (*Rcan1*), [*Human*] *DSCR1 or Adapt78*, *NADH dehydrogenase [NADH dhdg]* (*Ndufa1*) and *Platelet derived growth factor-c* (*Pdgfc*) com luminescência. Dados foram transformados por \log_{10} (au) e submetidos à fototerapia com diferentes comprimentos de onda de laser.

	Treatments							
	G514WI	G514+ I	G660WI,	G660+I	G780WI	G780+I	Injury	Control
Vegda	5.25 ab	4.96 b	5.05 b	5.26 ab	5.31 ab	5.42 a	5.11 ab	4.51 c
Ppib	3.99 c	4.75 a	4.73 a	4.74 a	4.18 bc	4.50 ab	4.19 bc	4.77 a
RCAN1	4.88 de	4.75 e	4.61 e	5.14 cd	5.77 a	5.74 a	5.69 ab	5.40 bc
Ppib	4.53 d	4.51 d	4.46 d	4.96 c	6.03 a	5.88 a	5.96 a	5.50 b
Pdgfc	4.42 ab	4.57 ab	4.50 ab	4.47 ab	4.70 a	4.66 a	4.18 b	4.87 a
Actb	4.30 c	4.73 abc	4.73 abc	4.64 abc	4.93 a	4.92 ab	4.40 bc	4.76 abc
Ndufa1	5.22 cd	5.49 bc	5.44 bc	4.97 d	5.67 ab	5.69 ab	5.91 a	5.70 ab
Ppib	5.03 b	4.29 d	4.63 c	4.95 b	4.96 b	5.68 a	5.51 a	5.12 b

Letters different in the same row indicates significance ($P < .05$) by Tukey test

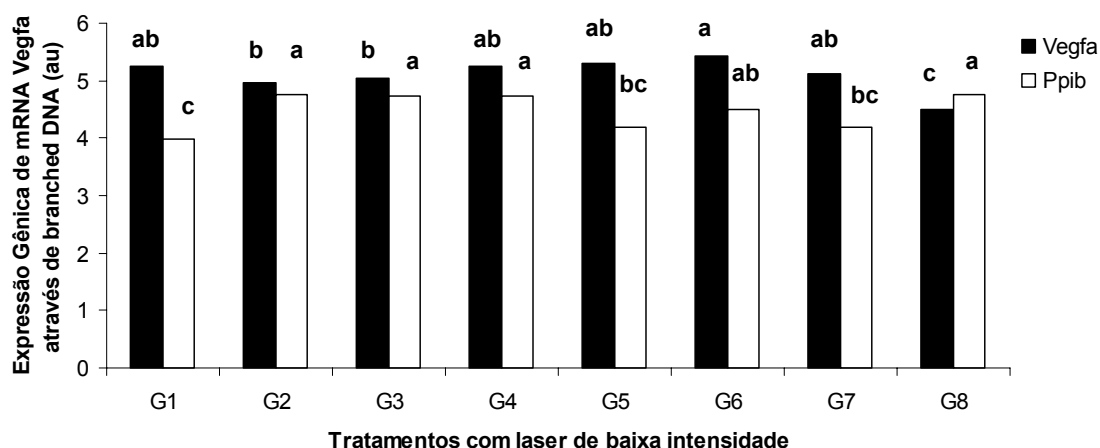


Fig. 2. Expressão gênica de mRNA Vegfa e mRNA ciclofilina (Ppib) analisados por branched DNA em músculos tratados com laser de baixa intensidade. Os dados de oito grupos tratados foram transformados por \log_{10} em unidades arbitrárias (au) e submetidos ao ANOVA por procedimento GLM do SAS. O nível de significância foi ($p < 0.05$).

a,b,c diferentes quando comparados os tratamentos e a expressão gênica.

Letras diferentes no mesmo espaço indica significância ($P < .05$) por teste Tukey.

G1= λ 514nmWI; G2= λ 514nm+I; G3= λ 660nmWI; G4= λ 660nm+I; G5= λ 780nmWI; G6= λ 780nm+I; G7= Lesão; G8=Controle.

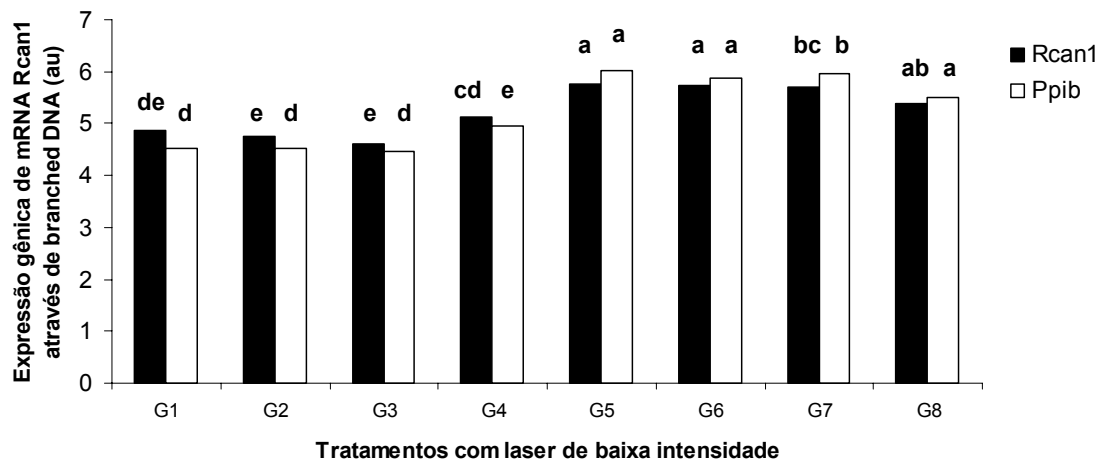


Fig. 3. Expressão gênica de mRNA Rcan1 e mRNA ciclofilina (Ppib) analisados por branched DNA em músculos tratados com laser de baixa intensidade. Os dados de oito grupos tratados foram transformados por \log_{10} em unidades arbitrárias (au) e submetidos ao ANOVA por procedimento GLM do SAS. O nível de significância foi ($p < 0.05$).

a,b,c diferentes quando comparados os tratamentos e a expressão gênica.

Letras diferentes no mesmo espaço indica significância ($P < .05$) por teste Tukey.

G1= $\lambda 514\text{nmWI}$; G2= $\lambda 514\text{nm+I}$; G3= $\lambda 660\text{nmWI}$; G4= $\lambda 660\text{nm+I}$; G5= $\lambda 780\text{nmWI}$; G6= $\lambda 780\text{nm+I}$; G7= Lesão; G8=Controle.

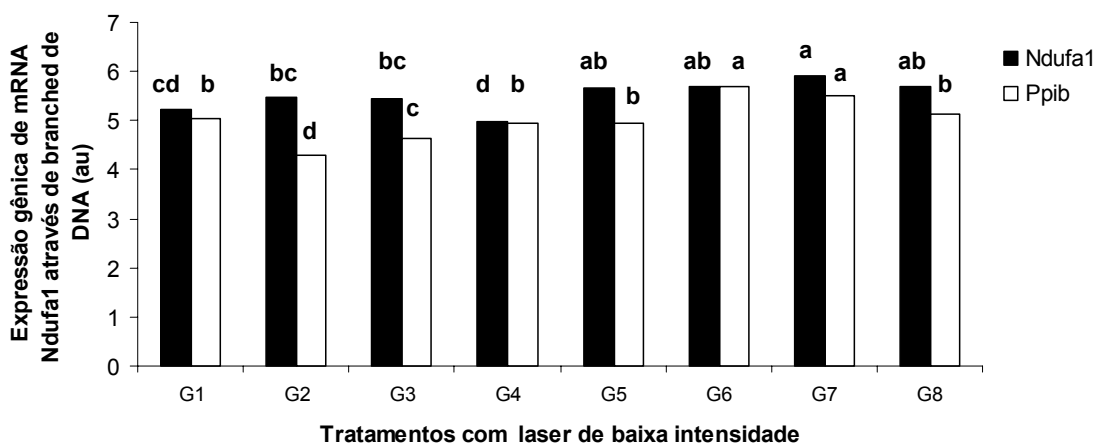


Fig. 4. Expressão gênica de mRNA Ndufa1 e mRNA ciclofilina (Ppib) analisados por branched DNA em músculos tratados com laser de baixa intensidade. Os dados de oito grupos tratados foram transformados por \log_{10} em unidades arbitrárias (au) e submetidos ao ANOVA por procedimento GLM do SAS. O nível de significância foi ($p < 0.05$).

a,b,c diferentes quando comparados os tratamentos e a expressão gênica.

Letras diferentes no mesmo espaço indica significância ($P < .05$) por teste Tukey.

G1= $\lambda 514\text{nmWI}$; G2= $\lambda 514\text{nm+I}$; G3= $\lambda 660\text{nmWI}$; G4= $\lambda 660\text{nm+I}$; G5= $\lambda 780\text{nmWI}$; G6= $\lambda 780\text{nm+I}$; G7= Lesão; G8=Controle.

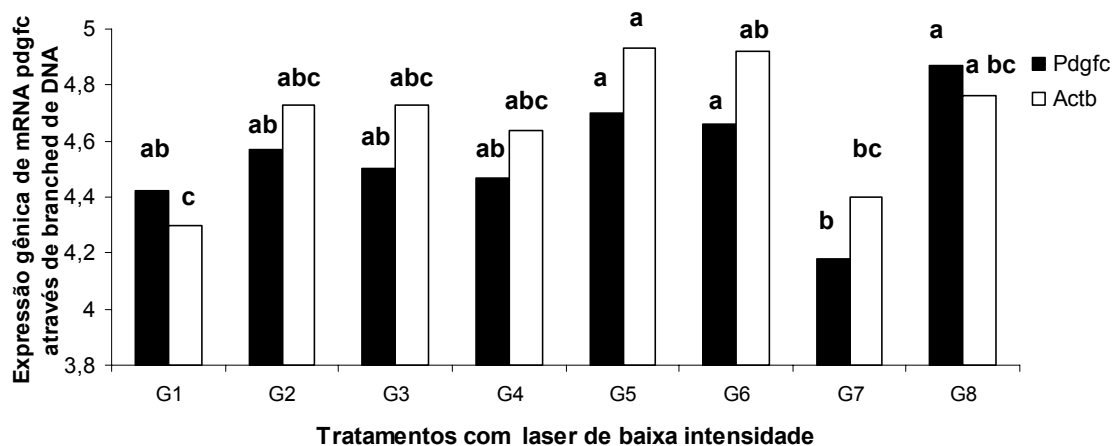


Fig. 5. Expressão gênica de mRNA Pdgfc e mRNA b-actina analisados por branched DNA em músculos tratados com laser de baixa intensidade. Os dados de oito grupos tratados foram transformados por \log_{10} em unidades arbitrárias (au) e submetidos ao ANOVA por procedimento GLM do SAS. O nível de significância foi ($p < 0.05$).

a,b,c diferentes quando comparados os tratamentos e a expressão gênica.

Letras diferentes no mesmo espaço indica significância ($P < .05$) por teste Tukey.

G1= $\lambda 514\text{nmWI}$; G2= $\lambda 514\text{nm+I}$; G3= $\lambda 660\text{nmWI}$; G4= $\lambda 660\text{nm+I}$; G5= $\lambda 780\text{nmWI}$; G6= $\lambda 780\text{nm+I}$; G7= Lesão; G8=Controle

DISCUSSÃO

O presente estudo foi designado para investigar o tempo do curso de alterações do perfil de expressão gênica de mRNA de Vegfa, Rcan1, Pdgfc e Ndufa1 durante a regeneração muscular. Nossos resultados mostram que a regeneração das fibras musculares expressa mRNA Vegfa, Rcan1 e Ndufa1, sugerindo que estas vias moleculares estão associadas com o processo de regeneração muscular *in vivo*.

Expressão gênica de mRNA Vegfa

Estudos mostram que a expressão de mRNA VEGF e proteínas é aumentada em músculos isquêmicos (Rissanen et al., 2002; Milkiewicz et al., 2004; Tuomisto et al., 2004). As proteínas VEGF estão aumentadas em músculos esqueléticos isquêmicos 11 dias após a ligação da artéria femoral

(Milkiewicz et al., 2004). Terapia gênica, utilizando VEGF-A age em músculos esqueléticos isquêmicos mediante aumento da expressão de mioglobina em modelos de isquemia aguda em patas traseiras de camundongos (van Weel et al., 2007). Estudos sobre angiogênese encontraram *over* expressão de VEGF em miócitos esqueléticos durante a regeneração muscular esquelética (Arsic et al., 2004; Kim, et al., 2006).

A produção de VEGF está aumentada pela hipóxia em ambos *in vitro* (Shweiki et al., 1992) e *in vivo* (Banai et al., 1994). Além disso, tem sido mostrado que em membros isquêmicos, VEGF e seus receptores estão aumentados várias horas após a indução de inquemia (Rissanem et al., 2002; Milkiewicz et al., 2001; Germani et al., 2003).

O efeito do laser de baixa intensidade (He-Ne) sobre a neoformação de capilares sangüíneos durante a regeneração do músculo gastrocnêmio em sapos (*Bufo viridis*) foi investigado e foi concluído que a irradiação laser He-Ne promove neoformação de vasos sangüíneos na área lesada (Bibikova and Oron, 1994). Outros estudos mostram que a irradiação laser de baixa intensidade promove aumento da microcirculação (Maegawa et al., 2000)

De acordo com nossos resultados podemos observar que a expressão de mRNA *Vegfa* foi aumentada nos músculos tratados quando comparados ao G8. Baseados nesses resultados nós podemos inferir que a terapia laser pode ter exercido influência sobre a expressão de mRNA *Vegfa* durante a regeneração muscular e provavelmente participou da angiogênese e processo de regeneração durante os 5 dias a partir da indução da lesão por congelamento, mas quando comparamos todos os grupos com o grupo G7, concluímos que VEGF também foi expresso sem a influência do laser.

De acordo com Wagatsuma et al. (2006), os transcritos mRNA VEGF transitoriamente aumentaram após 12 h após a lesão muscular e então retornaram aos níveis basais observados em músculos normais. O pico de expressão dos transcritos mRNA de Flt-1 e KDR/Flk-1 foi atingido no terceiro dia e após esse período, retornou aos níveis basais observados nos músculos normais em 10 dias. De acordo com Milkiewicz et al., (2004), as proteínas VEGF estão aumentadas no músculo esquelético durante 11 dias após a ligadura da artéria femoral. Wagatsuma et al. (2007) mostrou que mRNA VEGF começou aumentar a partir do 3º dia e atingiu o pico no 5º dia após a lesão

muscular. De acordo com nossos resultados os transcritos mRNA Vegfa foram aumentados durante os cinco dias da regeneração do músculo esquelético.

Expressão gênica de mRNA Rcan1

O gene RCAN1 humano está localizado no cromossomo 21 na região 21q22.12 (Hattori et al., 2000); é altamente expresso no músculo esquelético (Harris et al., 2005) e codifica uma proteína que interage fisicamente e funcionalmente com calcineurina A, uma subunidade catalítica de Ca^{2+} /calmodulin-dependente da proteína fosfatase (PP2B) (Klee et al., 1998; Wang et al., 2002).

Estudos mostram que RCAN1 desempenha um papel na angiogênese pela regulação da adesão e migração de células endoteliais (ECs) via interação com integrinas $\alpha\beta_3$ (Lizuka et al., 2004). Outros estudos mostram que RCAN1 age como um “circuito inibidor” na sinalização de VEGF e trombina, servindo como um circuito de feedback negativo para inibir a ativação e proliferação de células endoteliais e a angiogênese (Minami et al., 2004). RCAN1 pode estar envolvido nas vias de sinalização de remodelamento do músculo esquelético (Bassel-Duby and Olson, 2006; Schiaffino et al., 2007). Não existem dados na literatura em relação à influência do LBI sobre a expressão gênica de RCAN1 durante a regeneração do músculo esquelético. Nossos resultados mostram que os lasers 514 nm e 660 nm exerceram influência nas vias de sinalização da regeneração muscular e provavelmente influenciaram a angiogênese, revelada pelo aumento dos transcritos mRNA Rcan1 nos grupos tratados com estes comprimentos de onda. No entanto, nós consideramos diferença em relação ao efeito da luz sobre a expressão gênica de Rcan1 mRNA apenas para o tratamento com o laser $\lambda=780$ nm devido a expressão dos transcritos mRNA Rcan1 nos grupos tratados com $\lambda=514$ nm e $\lambda=660$ nm ter sido menor do que nos grupos tratados com laser $\lambda=780$ nm (tabela 1) e também porque os grupos 780 nm, tanto o grupo 780 nm lesado como o grupo 780 nm lesado e tratado, foram diferentes do grupo apenas lesão.

A transdução de sinais mediante VEGF e trombina ocorre através da translocação nuclear do fator de transcrição NF-AT calcineurin-dependente (Fig. 6) (Minami et al., 2004). Calcineurina está envolvida na hipertrofia de

mioblastos. RCAN1 pode evitar a translocação nuclear de NFAT para ligar-se aos promotores GATA4 e MEF-2 (Vega et al., 2002), prevenindo, assim, a hipertrofia (Harris et al. 2005). De acordo com os nossos resultados, o aumento da expressão de mRNA Rcan1 sugere que o laser $\lambda=780$ nm preveniu a regeneração do músculo esquelético pelas inibição de VEGF ou *thrombin-calcineurin*-NF-ATc (figura 6). Da mesma forma, é provável que o laser $\lambda=780$ nm exerceu um efeito inibidor sobre a angiogênese. Assim, podemos sugerir que VEGF pode participar da via de regeneração muscular. De fato, constituintes vasculares tais como progenitores associados a vasos (mesoangioblasts) isolados da aorta dorsal apresentam potencial miogênico e são capazes de participar na regeneração muscular (Sampaolesi, 2003; Shi e Garry, 2006).

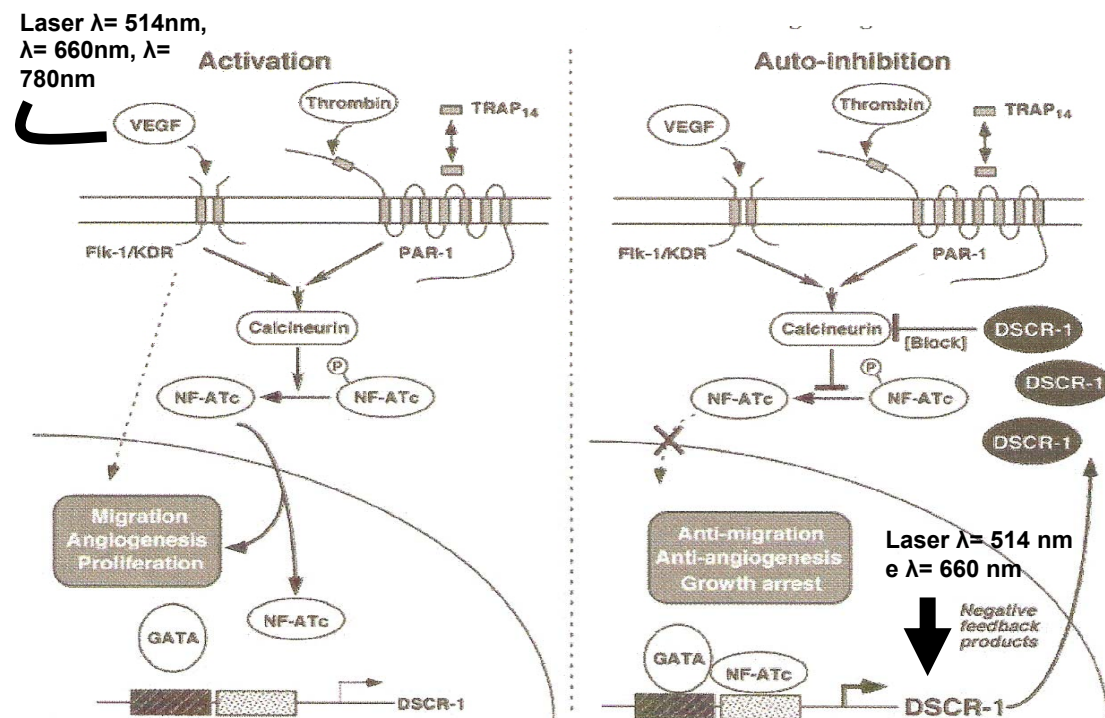


Figure 6 Modelo Esquemático, mostrando a sinalização de VEGF ou *thrombin-calcineurin*-NF-ATc e DSCR-1-mediando sistema de auto inibição em endotélio. Fonte: Minami et al. (2004).

Expressão gênica de mRNA Ndufa1

Em relação de mRNA Ndufa1, nossos resultados mostram que apenas os grupos G1 e G4 expressaram aumento nos transcritos. No entanto,

comparando todos os grupos com o grupo lesão, nossos resultados mostram que houve aumento nos transcritos nos grupos G1, G2, G3 e G4. Existe uma natural fotosensibilidade de várias células eucariontes à luz monocromática de baixa intensidade, sugerindo que mecanismos moleculares, tais como a estimulação de fotoceptores, estão envolvidos na fotosensibilidade celular. Mitocôndrias isoladas possuem fotosensibilidade; a cadeia respiratória funciona como cadeia redox e NADH dhdg faz parte do aparelho de citocromos. Os diferentes componentes da cadeia respiratória absorvem diferentes comprimentos de onda de acordo com seus respectivos espectros de absorção. A absorção nas bandas de muitos componentes da cadeia respiratória tais como flavoproteínas e hemoproteínas são na região do espectro do azul (400-450nm). Os citocromos absorvem na região do verde; na região do vermelho (630 nm) são absorvidas por formas semiquinonas de flavoproteínas bem como oxidase-cyt d terminais (Karu, 1988).

Estudos com culturas de levedura mostraram relação entre intensidade da respiração mitocondrial, aumento na atividade da NADH dhdg, aumento no acúmulo da biomassa e a ação do laser $\lambda=632,8$ nm (Karu, 1988; Karu et al., 1995); outros estudos mostraram aumento na atividade da NADH dhdg e aumento da síntese de ATP (Passarela et al., 1984; Weiss and Oron, 1992) e a ação da irradiação laser $\lambda=633$ nm (Karu et al., 1995).

A produção de ATP pelas mitocôndrias pode regular a execução de vários eventos regulatórios e biossintéticos envolvidos na miogênese (Dunguez et al., 2002) com provável aumento na atividade da NADH dhdg. A inibição da síntese de proteínas mitocondriais evita a diferenciação de mioblastos em miotubos (Hamaï et al., 1997; Dunguez et al., 2002).

A média de síntese de DNA e RNA aumentou após bioestimulação com laser (Karu, 1988; Karu, 1987; Vacca et al., 1993). Por outro lado, em doses elevadas, os fotoceptores são danificados e os efeitos do laser diminuem. Além disso, aumento na energia causa destruição dos fotoceptores, acompanhada por inibição celular e letalidade. A irradiação das células com luz visível e/ou infravermelha resultando em absorção pelas mesmas moléculas pode promover efeito positivo (aceleração da divisão celular e metabolismo), ou causar danos fotodinâmicos com altas doses (Karu, 1988). Portanto, os processos biológicos podem responder de modo diferente ao laser de baixa

intensidade de acordo com diferentes comprimentos de onda, energia, e frequência que são utilizados (Belkin et al., 1988; Bibikova and Oron, 1994).

De acordo com esses dados e nossos resultados podemos sugerir que os lasers $\lambda=514$ nm e $\lambda=660$ nm estimularam, mediante vias específicas, os citocromos Ndufa1 e alteraram o estado redox celular com esta dose específica e comprimentos de onda. Em relação ao laser $\lambda=780$ nm, este comprimento de onda não foi específico para estimular os citocromos Ndufa1 da cadeia respiratória. Estes dados estão de acordo com a literatura que afirma que os citocromos possuem um espectro de absorção muito similar ao das porfirinas, mas, os citocromos oxidase possuem absorção muito fraca na banda do $\lambda=780$ nm (Lubart et al., 1992). Por exemplo, Grossman et al. (1998) encontrou que antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos são suprimidos por laser $\lambda=780$ nm e o laser He-Ne estimulou a proliferação.

Em relação ao laser $\lambda=514$ nm, este comprimento de onda provavelmente alterou o estado redox em tecidos saudáveis e lesados, aumentando os transcritos mRNA Ndufa1. O processo de regeneração muscular demanda gasto energia na fase de proliferação e para iniciar a fase de diferenciação. (Dunguez et al., 2002). De acordo com este pesquisador, a regeneração do músculo esquelético recapitula a miogênese embrionária e pode estimular a biogênese mitocondrial, indicando que a regeneração do músculo é acompanhada por dramática estimulação da cadeia respiratória, concomitante com o início da diferenciação muscular. A progressão da miogênese foi associada com o início da expressão de proteínas específicas dos músculos que também demanda gasto energético. Assim, podemos concluir que os lasers $\lambda=660$ nm e $\lambda=514$ nm foram eficientes para estimular a fase proliferativa da regeneração muscular devido aos seus efeitos sobre a expressão de mRNA Ndufa1.

Expressão gênica de mRNA Pdgfc

Em relação à Pdgfc, a família PDGF consiste de quatro membros: PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-CC and PDGF-DD (Li et al. 2000; LaRochelle, et al., 2001; LI et al., 2005). Considerando que estes fatores de transcrição são potentes ativadores mitogênicos em diferentes células, podemos supor que eles

provavelmente estejam envolvidos na ativação da regeneração de células musculares lesadas (Best et al., 2001; Chargé et al., 2004; Järvinen et al., 2005). *In vivo*, PDGF-AA e PDGF-BB estimularam o crescimento de microvasos. PDGF-CC tem sido estudado em ampla extensão na angiogênese (Li et al., 2005). Estudos mostram que PDGF-CC induziu a liberação de VEGF (Li et al., 2003; Li et al., 2005) e angiogênese (Li et al., 2005). O tratamento com PDGF-CC incrementa a formação e maturação de novos vasos sanguíneos e aumenta a regeneração de músculos esqueléticos e, como resultado, também reduz a extensão da necrose muscular isquêmica, sugerindo que pode existir uma ligação entre a regeneração muscular e a angiogênese (Li et al., 2005). Contudo, permanece desconhecido se PDGF-CC é capaz de afetar diretamente a regeneração do músculo esquelético.

PDGF é reconhecido como um importante mediador na cicatrização de feridas e reparo tecidual (Ross et al., 1986; Reuveni et al., 1990), mas seu papel durante a regeneração do músculo esquelético não foi completamente investigado. Um estudo com células C2 da linhagem miogênica, derivada de músculos esqueléticos de camundongos adultos, demonstrou que estes mioblastos expressam receptores para PDGF e que PDGF exerceu efeito mitogênico sobre essas células. Entre os três conhecidos dímeros de PDGF, a isoforma BB tem o maior número de sítios ligantes em mioblastos C2; é reconhecido como o mais potente em promover a incorporação de H-TdR e em reduzir a frequência da diferenciação terminal em mioblastos. Apesar de PDGF-AA poder ligar-se às células, o número de sítios ligantes é muito inferior quando comparados àqueles do PDGF-BB e, em decorrência disso, nenhum efeito mitogênico pode ser demonstrado. PDGF-AB liga-se às células C2 em nível similar àquele do PDGF-AA e exerce um ligeiro efeito mitogênico sobre as células (Reuveni et al., 1990). De acordo com Bischoff (1986), PDGF não ativa a proliferação das células satélites quiescentes.

Uma questão persistente na biologia muscular refere-se ao mecanismo pelo qual ocorre a adição e a deleção de sarcômeros. (Epstein and Fischman, 1991; Tidball and Spencer, 1993). Estudos prévios mostram que estes processos ocorrem primariamente na terminação das miofibrilas, onde as junções miotendíneas (MTJs) são localizadas (Goldspink, 1980). Tidball e Spencer, (1993) mostraram alta concentração de receptores de PDGF nas MTJs

de fibras musculares completamente diferenciadas, sugerindo que PDGF participa da adição de sarcômeros durante a diferenciação muscular. Outro estudo, usando linhagem miogênica C2 mostrou que PDGF pode regular a proliferação e a diferenciação de mioblastos *in vitro*, exercendo um papel no aumento do número de mioblastos durante a regeneração do músculo esquelético pela estimulação da proliferação e/ou inibição da diferenciação, mas este estudo foi feito usando PDGF-AA PDGF-BB.

De acordo com nossos resultados não houve expressão dos transcritos de mRNA de *Pdgf-c* durante a fase proliferativa da regeneração do músculo esquelético. Apesar de PDGF-CC estimular a angiogênese por meio de estrita cooperação com VEGF (Li et al., 2005) nós não podemos explicar as razões porque em nosso estudo VEGF expressou seus transcritos de mRNA e *Pdgf-c* não expressou durante a regeneração do músculo esquelético.

Expressão gênica de *Ppib* mRNA

Em relação à ciclofilina-B como *housekeeping* dos genes investigados, podemos observar que houve ampla diferença nos transcritos de mRNA, entre os genes analisados. Não houve uniformidade de expressão em todos os ensaios, na expressão gênica dos transcritos para ciclofilina-B. Nós supomos que a diferença entre a expressão do *housekeeping* como gene controle de *Vegfa*, *Rcan1*, *pdgfc* e *Ndufa1* foi devido à diferença na variabilidade de expressão gênica entre os músculos dos animais. Concluímos que *cyclophilin-B* (*Ppib*) não é um *housekeeping* apropriado como gene controle para análise de expressão gênica de músculo esquelético porque é uma proteína da matrix extracelular (Lin and Hsu, 2005) e faz parte da via de homeostase muscular (Mitchell et al., 2002; Sakuma et al., 2003).

Expressão gênica de *b-actina* mRNA

Em relação à mRNA *b-actina* nós evidenciamos mais alta expressão do que mRNA *Pdgfc*, apesar de não haver diferença significativa quando comparada ao grupo controle. Portanto, podemos concluir, baseados nos valores expressos na tabela 1, que *b-actina* foi altamente sensível aos

tratamentos com laser. Portanto, b-actina não representa um *housekeeping* apropriado para análise de expressão gênica de músculos esqueléticos.

CONCLUSÕES

O presente estudo sugere que a irradiação laser influencia a expressão gênica de Vegfa, Rcan1, e Ndufa1 durante a regeneração do músculo esquelético *in vivo*.

A terapia laser pode exercer influência sobre a expressão de Vegfa e conseqüentemente sobre a angiogênese durante a regeneração do músculo esquelético.

O laser $\lambda=780\text{nm}$ pode prevenir a regeneração do músculo esquelético pelo aumento da expressão gênica Rcan1 e conseqüente inibição de VEGF ou thrombin-calcineurin-NF-ATc.

O laser $\lambda=660\text{nm}$ estimula especificamente citocromo NADH dhdg (Ndufa1 in mouse), alterando o estado redox celular. O laser $\lambda=780\text{ nm}$ não foi específico para estimular citocromo Ndufa1. O laser $\lambda=514\text{nm}$ altera o estado redox celular nos tecidos saudáveis. O laser $\lambda=514\text{ nm}$ provavelmente exerce seus efeitos na fase de diferenciação da regeneração do músculo esquelético.

Pdgfc não expressou durante a fase proliferativa da regeneração do músculo esquelético provavelmente por ser um gene estrito da via de angiogênese em cooperação com VEGF.

Ciclofilina-B e b-actina não são um *housekeeping* apropriado para análise de expressão gênica de músculos esqueléticos.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi suportado pelo CNPq e Fapesp.

REFERÊNCIAS

Arsic, N.; Zacchigna, S.; Zentilin, L.; Ramirez-Correa, G.; Pattarini, L.; Salvi, A.; Sinagra, G.; Giacca, M. vascular endothelial factor stimulates skeletal muscle regeneration *in vivo*. *Molecular Therapy*. 10(5):844-854, 2004.

Banai, S.; Shweiki, D.; Pinson, A.; Chandra, M. Lazarovici, G.; Keshet, E. Up-regulation of vascular endothelial growth factor expression induced by myocardial ischaemia: implications for coronary angiogenesis. *Cardiovascular Research*. 28: 1176-1179, 1994.

Bassel-Duby, R.; Olson, R. N. Signaling Pathways in Skeletal Muscle Remodeling. *Annual Review of Biochemistry*. 75: 19-37, 2006.

Beckerman, H.; de Bie, R. A.; Bouter, L. M.; De Cuyper, H. J.; Oostendorp, R. A. B. The efficacy of laser therapy for musculoskeletal and skin disorders: a criteria-based meta-analysis of randomized clinical trials. *Physical Therapy*. 72:483-491, 1992.

Belkin, M.; Zaturunsky, B.; Schwartz, M. A critical review of low energy laser bioeffects. *Lasers and Light in Ophthalmology*. 2: 63-71, 1988.

Best, T. M.; Shehadeh, S. E. Levenson, G.; Michel, J. T. Corr, D. T.; Aeschlimann, D. Analysis of changes in RNA levels of myoblasts and fibroblast-derived gene products in healing skeletal muscle using quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. *J. Orthop Res*. 19: 565-572, 2001.

Bibikova, A.; Oron, U. Attenuation of the process of muscle regeneration in the toad gastrocnemius muscle by low energy laser irradiation, *Lasers in Surgery and Medicine* 14:355-361, 1994.

Bischoff, R. Proliferation of muscle satellite cells on intact myofibers in culture. *Developmental Biology*. 115:129-139, 1986.

Burkin, D. J.; Kaufman, S. J. The $\alpha 7\beta 1$ integrin in muscle development and disease. *Cell and Tissue Research*. 296:183-190, 1999.

Carlson, B. M. The regeneration of skeletal muscle. *American Journal of Anatomy*. 137: 119-149, 1973.

Carlson, B. M; Faulkner, J. A. The regeneration of skeletal muscle fibers following injury: review. *Medicine & Science in Sports & Exercise*. 15: 187-198, 1983.

Chargé, S. B. P.; Rudnicki, M. A. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *American Physiological Society*. 84:209-238, 2004.

Duguez, S.; Féasson, L.; Denis, C.; Freyssenet, D. Mitochondrial biogenesis during skeletal muscle regeneration. *AJP- Endocrinology and Metabolism*. 282: 802-809, 2002.

Epstein, H. F.; Fischman, D. A. Molecular analysis of protein assembly in muscle development. *Science*. 251:1039-1044, 1991.

Germani, A; Di Carlo, A.; Mangoni, A.; Straino, S.; Giacinti, C.; Turrini, P.; Biblioli, P.; Capogrossi, M.C. Vascular endothelial growth factor modulates skeletal muscle regeneration function. *American Journal of Pathology*.(163):1417-1428, 2003.

Goldspink, D. Physiological factors influencing protein turnover and muscle growth in mammals. In *Development and Specialization of muscle*. D. Goldspink, editor. Cambridge University Press. Cambridge. 65-89, 1980.

Grossman, N.; Schneid, N.; Reuveni, H. Enhanced proliferation of keratinocyte cultures following 780nm low-power diode laser irradiation. Involvement of reactive oxygen species. *Lasers in Surgery and Medicine*. 22:212-218, 1998.

Hamaï, N.; Nakumura, M.; Asano, A. Inhibition of mitochondrial protein synthesis impaired C₂C₁₂ myoblast differentiation. *Cell Struct Funct*. 22: 421-431, 1997.

Harris, C. D.; Ermak, G.; Davis, J. A. Multiple roles of the DSCR1 (Adapt78 or RCAN1) gene and its protein product calcipressin 1 (or RCAN1) in disease. *Cellular and Molecular. Life Sciences*. 62: 2477-2486, 2005.

Hattori, M.; Fujiyama, A.; Taylor, T. D.; Watanabe, H.; Yada, T.; Park, H. S. et al. The DNA sequence of human chromosome 21. *405*: 311-319, 2000.

Heldin, C.-H.; Westermark, B. Platelet-derived growth factor: a family of isoforms that bind to two distinct receptors. *British Medical Bulletin* 45: 453-464, 1989.

Järvinen, T. A. H.; Järvinen, T. L. N.; Kääriäinen, M.; Kalimo, H.; Järvinen, M. Muscle injuries – Biology and Treatment. *The American Journal of Sports Medicine*. 33(5):745-764, 2005.

Karu, T.; Pyatibrat, L.; Kalendo, G. Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated in vitro. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 27:219-223, 1995.

Karu, T. I. Photobiological fundamentals of low-power laser therapy. *Journal of Quantum Electronics*. 23:1703-1717, 1987.

Karu, T. Molecular mechanism of the therapeutic effect of low-intensity laser radiation. *Lasers and Life Science*. 2(1): 53-74, 1988.

Kim, K. I.; Cho, H.J.; Hahn, J. Y.; Kim, T. Y.; Park, K. W.; Koo, B. K.; Shin, C. S.; Kim, C. H.; Oh, B. H.; Lee, M. M.; Park, Y. B.; Kim, H. S. β -Catenin overexpression augments angiogenesis and skeletal muscle regeneration through dual mechanism of vascular endothelial growth factor-mediated endothelial cell proliferation and progenitor cell mobilization. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 26: 1-8, 2006.

Klee, C. B.; Ren, H.; Wang, X. Regulation of the calmodulin stimulated protein phosphatase, calcineurin. *Journal of Biological Chemistry*. 273: 133367-133370, 1998.

LaRochelle, W.J. et al. PDGF-D, a new protease-activated growth factor *Nature Cell Biology*. 3:517-521, 2001.

Li, X. et al. PDGF-C is a new protease-activated ligand for PDGF α -receptor. *Nature Cell Biology*. 2:302-309, 2000.

Li, H.; Fredriksson, L.; Li, X.; Eriksson, U. PDGF-D is a potent transforming and angiogenic growth factor. *Oncogene*. 22: 1501-1510, 2003.

Li, X.; Tjwa, M.; Moons, L.; Fons, P.; Noel, A.; Ny, A.; Zhou, J. M.; Lennartsson, J.; Li, H.; Lutun, A.; Pontén, A.; Devy, L.; Bouché, A.; Oh, H.; Manderveld, A.; Blacher, S.; Communi, D.; Savi, P.; Bono, F. et al. Revascularization of ischemic tissues by PDGF-CC via Effects on endothelial cells and their progenitors. *The Journal of Clinical Investigation*. 115(1): 118-127, 2005.

Lin, C. S.; Hsu, C. W. Differentially transcribed genes in skeletal muscle of Duroc and Taoyuan pigs. *Journal of Animal Science*. 83:2075-2086, 2005.

Lizuka, M.; Abe, M.; Shiiba, K.; Sasaki, Y. S. Down syndrome candidate region 1, a downstream target of VEGF, participates in endothelial cell migration and angiogenesis. *Journal of Vascular Research*. 41:334-344, 2004.

Lubart, R.; Wollman, Y.; Friedmann, H.; Rochkind, S.; Laulicht, I. Effects of visible and near-infrared lasers on cell cultures. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 12:305-310, 1992.

Maegawa, Y.; Itoh, T.; Hosokawa, T.; Yasgashi, K.; Nishi, M. Effects of near-infrared low-level laser irradiation on microcirculation. *Lasers in Surgery and Medicine*. 27:427-437 2000.

Mauro, A. *Muscle regeneration*. Raven Press, New York. 560 pp. 1979.

Milkiewicz, M.; Brown, M. D.; Egginton, S.; Hudlicka, O. Association between shear stress, angiogenesis, and VEGF in skeletal muscle in vivo. *Microcirculation*. 8:229-241, 2001.

Milkiewicz, M.; Pugh, C. W.; Egginton, S. Inhibition of endogenous HIF inactivation induces angiogenesis in ischaemic skeletal muscles of mice. *The Journal of Physiology*. 560: 21-26, 2004.

Minami, T.; Horiuchi, K.; Miura, M.; Abid, R.; T, akabe, W.; Noguehi, N.; Kohro, T.; Ge, X.; Aburatani, H.; Hamakubo, T.; Kodama, T.; Aird, W. C. Vascular endothelial growth factor- and thrombin-induced termination factor, down

syndrome critical region-1, attenuates endothelial cell proliferation and angiogenesis. *The American Society for biochemistry and Molecular Biology*. 50537-50554, 2004.

Mitchell, P. O.; Mills, S. T.; Pavlath, G. K. Calcineurin differentially regulates maintenance and growth of phenotypically distinct muscle. *AJP–Cell Physiology*. 282:984-992, 2002.

Musaro, A.; McCullagh, K. J.; Naya, F. J.; Olson, E. N. Rosenthal, N. IGF-1 induces skeletal myocytes hypertrophy through calcineurin in association with GATA-2 and NF-ATc1. *Nature*. 400:581-585, 1999.

Oliveira, N. M. L.; Parizotto, N. A.; Salvini, T. F. S. GaAs (904-Nm) laser radiation does not affect muscle regeneration in mouse skeletal muscle. *Lasers in Surgery and Medicine*. 25: 13-21, 1999.

Passarella, S.; Casamassima, E.; Molinari, S.; Pastore, D.; Quagliariello, E.; Catalano, I. M.; Cingolani, A. Increase of proton electrochemical potential and ATP synthesis in rat liver mitochondria irradiated in vitro by Helion-Neon laser. *FEBS Letters*. 175:95-99, 1984.

Reuveni, Z. Y.; Balestreri, T. M. Bowen-Pope, D. F. Regulation of proliferation and differentiation of myoblasts derived from adult mouse skeletal muscle by isoforms of PDGF. *The Journal of Cell Biology*. 111: 1623-1629, 1990.

Rissanen, T. T.; Vajanto, I.; Hiltunen, M. O.; Rutanen, J.; Kettunen, M. I.; Niemi, M.; Leppänen, P.; Turunen, M. P.; Markkanen, J. E.; Arve, K.; Alhava, E.; Kauppinen, R. A.; Ylä-Herttuala, S. Expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor-2 (KDR/Flk-1) in ischemic skeletal muscle and its regeneration. *American Journal of Pathology*. 160: 1393-1403, 2002.

Ross, R.; Raines, E. W.; Bowen-Pope, D. F. The biology of platelet-derived growth factor. *Cell*. 46: 155-169. 1986.

Sakuma, K.; Nishikawa, J.; Nakao, R.; Watanabe, K.; Totsuka, T.; Nakano, H.; Sano, M.; Yasuhara, M. Calcineurin is a potent regulator for skeletal muscle

regeneration by association with NFATc1 and GATA-2. *Acta Neuropathologica*. 105:271-280, 2003.

Sampaolesi, M.; Torrente, Y.; Innocenzi, A.; Tonlorenzi, R.; D'Antona, G.; Pellegrino, M. A.; Barresi, R.; Bresolin, N.; De Angelis, M. G.; Campbell, K. P.; et al. Cell therapy of α -sarcoglycan null dystrophic mice through intra-arterial delivery of mesoangioblasts. *Science* 301: 487-492, 2003.

Shefer, G.; Partridge, T. A.; Heslop, L.; Gross, J. G.; Oron, U.; Halevy, O. Low-energy laser irradiation promotes the survival and cell cycle entry of skeletal muscle satellite cells. *Journal of Cell Science*. 115:1461-1469, 2002.

Shi, X.; Garry, D. J. Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. *Genes & Development*. 20:1692-1708, 2006.

Shweiki, D.; Ltin, A.; Soffer, D.; Keshner, E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia initiated angiogenesis. *Nature*, 359:843-845, 1992.

Stefano S.; Sandri, M.; Murgia, M. Activity-Dependent Signaling Pathways Controlling Muscle Diversity and Plasticity. *Physiology*. 22: 269-278, 2007.

Tidball, J. G.; Spencer, M. J. PDGF stimulation induces phosphorylation of talin and cytoskeletal reorganization in skeletal muscle. *The Journal of Cell Biology*. 123:(3) 27-635, 1993.

Tuomisto, T. T.; Rissanen, T. T.; Vajanto, I.; Korkeala, A.; Rutanen, J.; Yla-Herttuala, S. HIF-VEGF-VEGF-2, TNF-alpha and IGF pathways are upregulated in critical human skeletal muscle ischaemia as studied with DNA array. *Atherosclerosis*. 174: 111-120, 2004.

Vacca, R. A.; Marra, E.; Quagliariello, E.; Grego, M. Activation of mitochondrial DNA replication by He-Ne laser Irradiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 195 (2):704-109, 1993.

Vega, R. B. Yang, J.; Rothermel, B. A.; Bassel-Duby, R.; Williams R. S. Multiple domains of MCIPI contribute to inhibition of calcineurin activity. *Journal of Biological Chemistry*. 277: 30401-30407, 2002.

Wagatsuma, A.; Tamaki, H.; Ogitta, F. Sequential expression of vascular endothelial growth factor, Flt-1 and KDR/Flk-1 in regenerating mouse skeletal muscle. *Physiological Research*. 55: 633-640, 2006.

Wagatsuma, A. Endogenous expression of angiogenesis-related factors in response to muscle injury. *Molecular and Cellular Biochemistry- Biochemistry*. 298: 151-159, 2007.

Wang, Y.; De Keulenaer, G. W.; Weinberg, E. O.; Muangman, S.; Gualberto, A.; Landschulz, K. T.; Turi, T. G.; Thompson, J. F.; Lee, R. T. Direct biomechanical induction of endogenous calcineurin inhibitor Down syndrome critical Region-1 in cardiac myocytes. *AJP-Heart and Circulatory Physiology*. 283:533-539, 2002.

Weiss, N.; Oron, U. Enhancement of muscle regeneration in the rat gastrocnemius muscle by low energy laser irradiation. *Anatomy and Embriology*. 186:497-503, 1992.

Wilden, L.; Karthein, R. Import of radiation phenomena of electron and therapeutic low-level laser in regard to the mitochondrial energy. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*. 159-165, 1998.

PARTE III

Conclusões gerais
Considerações finais

CONCLUSÕES GERAIS

O Laser de baixa intensidade exerce influência sobre a expressão de genes das vias de regeneração muscular, incluindo fatores de transcrição que ativam a célula tronca muscular, bem como genes relacionados com processos metabólicos genes relacionados com a ativação e inibição da angiogênese.

O gene *Pdgfc* sofre expressão na angiogênese em estrita cooperação com VEGFa, mas não influencia diretamente na regeneração do músculo esquelético mediante a fluência e os comprimentos de onda investigados.

O laser de argônio apresenta efeitos biomoduladores do processo de regeneração do músculo esquelético.

A biotecnologia bDNA é eficaz para análise de expressão gênica com homogenatos de tecidos biológicos *in vivo*.

Pesquisas devem ser desenvolvidas para investigar a ação do laser de baixa intensidade, outros comprimentos de onda e fluência, envolvendo a análise de expressão de outros genes da via de regeneração muscular,

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta pesquisa demonstra a importância da investigação dos mecanismos de ação do laser de baixa intensidade em tecidos biológicos, através de biologia molecular, usando métodos de biotecnologia avançada. Além disso, este estudo amplia os horizontes para diversas pesquisas de genes envolvidos nas vias de regeneração muscular, permitindo investigações relevantes das respostas adaptativas do músculo esquelético a nível molecular.

Investigação pertinente seria realizar uma análise comparativa dos mecanismos envolvidos no processo de regeneração muscular; a ação do laser de baixa intensidade entre animais idosos e jovens, utilizando essa biotecnologia para análise de expressão gênica.

Dentre os genes que podem ser investigados, sugerimos a análise da expressão dos fatores de transcrição par box gene 3 (Pax3), par box gene 7 (Pax7); fatores de crescimento tais como, fator de crescimento fibroblástico (FGF do inglês: *fibroblast growth factor*), fator de crescimento hepatócito (HGF do inglês: *hepatocit Growth factor*), fator de crescimento insulínico-I (IGF-I do inglês: *insulin-like growth factor-I*), fator de crescimento insulínico-II (IGF-II do inglês: *insulin-like growth factor-II*), fator de crescimento transformante β (TGF- β do inglês: *transforming growth factor*), bem como as demais fatores regulatórios miogênicos (MRFs do inglês: *myogenic regulatory factors*): Myf5 (Myf6) MRF4.

Da mesma forma como foi observado com o laser de baixa potência, é provável, que outros recursos fisioterapêuticos tais como, termoterapia, eletroestimulação cinesioterapia em geral e técnicas proprioceptivas entre outros recursos, modifiquem a resposta celular, ativando a expressão gênica durante os processos terapêuticos.

Os resultados desse estudo abrem caminhos em direção a aplicações clínicas do laser de baixa intensidade com maior confiabilidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Amaral, A. C.; Parizotto, N. A.; Salvini, T. F. Dose-dependency of low-energy He-Ne laser effect in regeneration of skeletal muscle in mice. *Lasers in Medical Science*. 16:44-51, 2001.
2. Bibikova, A.; Oron, U. Attenuation of the process of muscle regeneration in the toad gastrocnemius muscle by low energy laser irradiation, *Lasers in Surgery and Medicine* 14:355-361, 1994.
3. Chargé, S. B. P.; Rudnicki, M. A. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *American Physiological Society*. 84:209-238, 2004.
4. Cossu, G. Biressi, S. Satellite Cells, myoblasts and other occasional myogenic progenitors: possible origin, phenotypic features and role in muscle regeneration. *Cellular Development & Biology*. 16: 623-631, 2005.
5. Dhawan, J.; Rando, T. A. Stem cell in postnatal myogenesis: molecular mechanisms of satellite cell quiescence, activation and replenishment. *Trends in Cell Biology*. 15: 666-673, 2005.
6. Duguez, S.; Féasson, L.; Denis, C.; Freyssenet, D. Mitochondrial biogenesis during skeletal muscle regeneration. *AJP- Endocrinology and Metabolism*. 282: 802-809, 2002.
7. Hauke, T.J.; Garry, D.J. Myogenic satellite cells: Physiology to molecular biology. *Journal of Applied Physiology*. 91:534-551, 2001.
8. Karu, T.; Mechanism of interaction of monochromatic visible light with cells. *SPIE*. 2630:1-9, 1995.
9. Lubart, R.; Eichler, M.; Lavi, R.; Friedman, H.; Shainberg, A. Low-energy laser irradiation promotes cellular redox activity. *Photomedicine and Laser Surgery*. 23:3-9, 2005.

10. Maegawa, Y.; Itoh, T.; Hosokawa, T.; Yagashi, K.; Nishi, M. Effects of near-infrared low-level laser irradiation on microcirculation. *Lasers in Surgery and Medicine*. 27:427-437 2000.
11. Oliveira, N. M. L.; Parizotto, N. A.; Salvini, T. F. S. GaAs (904-Nm) laser radiation does not affect muscle regeneration in mouse skeletal muscle. *Lasers in Surgery and Medicine*. 25: 13-21, 1999.
12. Reuveni, Z. Y.; Balestreri, T. M. Bowen-Pope, D. F. Regulation of proliferation and differentiation of myoblasts derived from adult mouse skeletal muscle by isoforms of PDGF. *The Journal of Cell Biology*. 111: 1623-1629, 1990.
13. Shi, X.; Garry, D. J. Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. *Genes & Development*. 20:1692-1708, 2006.
14. Vega, R. B. Yang, J.; Rothermel, B. A.; Bassel-Duby, R.; Williams R. S. Multiple domains of MCIPI contribute to inhibition of calcineurin activity. *Journal of Biological Chemistry*. 277: 30401-30407, 2002.
15. Vladimirov, Y. A.; Osipov, A. N.; Klebanov, G. I. Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation. *Biochemistry*. 69 (1):81-90, 2004.
16. Wilden, L.; Karthein, R. Import of radiation phenomena of electron and therapeutic low-level laser in regard to the mitochondrial energy. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*. 159-165, 1998.
17. Zammit, P.; Beauchamp, J. The skeletal muscle satellite Cell: Stem cell or son stem cell? *Differentiation*. 68: 193-204, 2001.
18. Zammit, P. S.; Relaix, F.; Negata, Y.; Ruiz, A. P.; Collins, C. A.; Partridge, T. A.; Beauchamp, J. R. Pax7 and myogenic progression in skeletal muscle satellite cells. *Journal of Cell Science*. 119:1824-1832, 2006.

ANEXOS

1. Manuscrito - 1 (em inglês)
2. Manuscrito - 2 (em inglês)
3. Figuras

MANUSCRITO – I

Low-Intensity Laser Alters the Expression of MyoD and Myogenin Genes *in vivo* Mouse Skeletal Muscle

Olga S. M. Moreira, MSc¹, Livia R. de Assis, MSc¹, Henrique-Silva, F. PhD², Vanderlei S. Bagnato, PhD³, Nivaldo A. Parizotto, PhD⁴

¹Master's Physical Therapy Program, Federal University de São Carlos, 13565-905 São Carlos, SP, Brazil

²Department of Genetics and Evolution, Federal University de São Carlos, 13565-905 São Carlos, SP, Brazil

³São Carlos Institute of Physics, São Paulo University, Cx. Postal 369, 13560-970, São Carlos, SP, Brazil

⁴Department of Physical Therapy, Federal University de São Carlos, 13565-905 São Carlos, SP, Brazil

Background and Objective: A branched DNA assay was used to investigate gene expression profiles of MyoD and myogenin *in vivo* in mouse skeletal muscle irradiated with low-intensity laser. The profiles revealed that MyoD and myogenin are regulated by the red, infrared and green laser irradiation. These genes play a role in the enhancement of *basic helix-loop-helix* (bHLH) transcription factor during the proliferation phase of muscle regeneration. The objective of the present study was to investigate the dependence of different wavelengths on MyoD and myogenin gene expression profiles in skeletal muscle regeneration.

Materials and Methods: Forty male mice (*Mus musculus*) were used. The experiment was carried out in seven days. On the 1st day, surgery was performed. On the 2nd, 3rd and 4th days, the animals were submitted to the irradiation protocol. On the 5th day, the animals were sacrificed and the muscles were frozen. On the 6th and 7th days, the muscles were defrosted and submitted to the QuantiGene System protocol (Panomics^(R)). Data from the eight treatments groups were transformed by log₁₀ and submitted to ANOVA using the generalized linear models (GLM) procedure of the SAS statistical package.

Results: Gene expression assays showed that MyoD and myogenin were expressed in the proliferation phase during skeletal muscle regeneration using irradiation at different wavelengths.

Conclusions: The present study suggests that the laser irradiation was effective on myogenesis *in vivo*. This may be due to its effect on satellite cell activation by MyoD and myogenin gene expression in the early proliferation phase of skeletal muscle regeneration. The transcripts investigated were expressed in both injured and healthy tissue. Cyclophilin-B is not an appropriate housekeeping gene for skeletal muscle.

Key words: Laser, branched DNA, gene expression, MyoD, myogenin, mouse

INTRODUCTION

Skeletal muscle regeneration is a highly orchestrated process that involves the activation of adult muscle satellite cell proliferation and differentiation. Activation of satellite cells requires the controlled up-regulation of muscle transcription factors and muscle specific genes.

Muscle injuries have been shown to activate the muscle regeneration pathway, including myogenic basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factors in skeletal myogenesis. A subset of the bHLH family includes MyoD, myf5, myogenin (MyoG) and Myf6 (MRF4) [1,2,3,4]. These proteins form heterodimeric DNA binding complexes that include other bHLH proteins from the E2 gene family (E12 and E47) and bind a canonical DNA sequence, CANNTG (E-box), within enhancer elements of genes that encode terminal differentiation markers of the skeletal muscle lineage [1,5,6].

In vitro studies have implicated an extensive number of both trophic and transcription factors in maintaining a balance between the growth and differentiation of satellite cells for restoring normal muscle architecture [1,7]. Some studies have shown that MyoD and myogenin are strongly coordinately induced three days following an injury and both are then rapidly transcriptionally repressed after 48 h [8]. On the other hand, studies have shown that MyoD is markedly more effective in activation and differentiation [9], while other studies have suggested myogenin is an important factor for terminal differentiation and fusion myoblasts in mature muscle fiber [10].

Although the muscle regeneration process has been well studied [3,11], questions remain concerning the effect of different wavelengths of low-intensity laser irradiation in muscle regeneration. An increase in regeneration through low-intensity laser therapy (LILT) has been studied in various tissues, such as the liver [12,13], skin [14], bone [15], nerve [16] and skeletal muscle [17,18]. In the skeletal muscle of rats and toads, He-Ne laser irradiation of the injured site enhances regeneration by two- and eightfold, respectively, when compared to non-irradiated controls [17,18,19].

The interaction between low-level laser irradiation and biological systems for the promotion of photobiomodulation and biostimulation is well established [20,21,22]. Although some studies have shown that low-level laser accelerates mitosis [23,24] and affects satellite cell differentiation [25], few studies have investigated the action of low-intensity laser on cell mechanisms during muscle regeneration using quantitative methods of molecular biology. Thus, the aim of the present study was to investigate *in vivo* the effect of the $\lambda=660\text{nm}$, $\lambda=780\text{nm}$ and $\lambda=514\text{nm}$ laser irradiation on the gene expression of the MyoD and myogenin during the first five days of the muscle repair process using branched DNA (bDNA).

MATERIALS AND METHODS

Animals

Forty male mice (*Mus musculus*) with a body mass of $40\text{g}\pm 1\text{g}$ were purchased from Bioterium of the Universidade Federal de São Carlos/SP, Brazil. Prior to the experimental surgery procedure, the animals were kept (five per cage) under a 12-hour light/dark cycle for environmental adaptation and illness control. Water and feed were offered *ad libitum*. The study was approved by Ethics Committee for Animal Studies of the Universidade Federal de São Carlos (Number 007/2005).

Surgery Technique and Irradiation Protocol

The experiment was carried out in seven days:

1st day – The body mass of the animals was measured. The animals were anaesthetized and the tibialis anterior muscle (TAM) was surgically exposed. Muscle freezing was performed by applying the flat end of a piece of iron pre-cooled in liquid nitrogen to the surface of part of the TAM and maintaining it in a transversal position in relation the muscle for 10 s (twice). The cold injury consisted of two freeze-thaw cycles of the muscle *in situ*. When the muscle had thawed, the wounds were closed with polyamide suture (3-0). The animals were then kept for 24 hours in a warm cage (37°C) to prevent hypothermia.

2nd, 3rd and 4th days – Animals were submitted to the irradiation protocol over three consecutive days in accordance with the dose and respective wavelength established for each group.

5th day – Animals from all groups were anesthetized and submitted to surgery for the removal of the TAM. The TAM of each animal was cut into five samples (10mg) and weighed. Approximately 10 mg of each muscle was placed in an Eppendorf tube with 300 μ l of homogenizing solution containing an RNAase-free solution. The muscles were frozen in liquid nitrogen and placed in a freezer at -80°C. The animals were then sacrificed with an overdose of anesthesia. All surgery incisions and muscle lesions were performed by the same researcher.

6th and 7th days – The muscles were submitted to the QuantiGene System protocol (Panomics^(R)).

Light Sources

Three light sources were used in the experiment:

- Indium-gallium-aluminum arsenide (InGaAlAs) $\lambda=660\text{nm}$ diode laser (MM Optics): 40mW output, $10\text{J}/\text{cm}^2$ fluency, 0.04cm^2 transverse section area of the laser beam and 10-second exposure time.
- Gallium-aluminum-arsenide (GaAlAs) $\lambda=780\text{nm}$ diode laser (MM Optics): 40mW output, $10\text{J}/\text{cm}^2$ fluency, 0.04cm^2 transverse section area of the laser beam and 10-second exposure time.
- Laser argon $\lambda=514\text{nm}$ (Nereid Light Phototherapy System, Healthtech, Shanghai, China): 40mW output, $10\text{J}/\text{cm}^2$ fluency, 0.07cm^2 transverse section area of the laser beam and 5-second exposure time.

Experimental Groups

The animals were separated into eight groups (n=5)

Group 1	G1	Animals without cold injury and treated	$\lambda=514\text{nmWI}$
Group 2	G2	Animals with muscles cold injury and treated with laser	$\lambda=514\text{nm+I}$
Group 3	G3	Animals without cold injury and treated	$\lambda=660\text{nmWI}$
Group 4	G4	Animals with muscles cold injury and treated with laser	$\lambda=660\text{nm+I}$
Group 5	G5	Animals without cold injury and treated	$\lambda=780\text{nmWI}$
Group 6	G6	Animals with muscles cold injury and treated with laser	$\lambda=780\text{nm+I}$
Group 7	G7	Animals with muscles cold injury	no treated
Group 8	G8	Control	-

Irradiation Protocol

The animals were immobilized by researcher's hand and placed in an appropriate position to expose the injured area and administer the laser beam. This was done to prevent anaesthetizing the animals during irradiation. Laser irradiation was performed directly on the skin covering the TAM. The animals from the G2, G4 and G6 groups were irradiated directly on the surgery incision, whereas the animals from G1, G3 and G5 groups were irradiated directly on the site corresponding to the injury. Laser irradiation was carried out in point mode at 24-hour intervals for three consecutive days beginning on the second day (24h after injury).

QuantiGene Assay Procedure

QuantiGene assays were performed in accordance with the Quantigene Reagent System procedure (Panomics®). For gene expression quantification, we used the Step-by-Step User's Guide for Animal Tissue Homogenates of the QuantiGene Reagent Systems Evaluation Program. Probes were synthesized using Panomics® based on the sequences deposited in GenBank for MyoD1 accession number NM_010866, myogenin accession number NM_031189 and peptidylprolyl isomerase-B ([Ppib] – cyclophilin-B) accession number NM_011149.

10 μg of tissue from each sample was mixed with 300 μl of homogenizing solution and 1 μl of proteinase K. Each tissue sample was ground in an Eppendorf tube using a pestle. 20 μl of tissue homogenate, 70 μl of diluted lysis mixture and 10 μl of working probe set (pool prepared with 3 μl each CE, LE, BL (Fig. 1-A) and 291 μl of lysis mixture) were then added in each well of capture plate. The capture plate was sealed and incubated at 53°C for 16 to 20 h. The wells were then washed once with

200µl/well wash buffer and three times with 300µl/well wash buffer. Residual wash buffer was removed through centrifugation of the plate (inverted) at 240x g for 1 min. Signals for the bound target mRNA were developed through sequential hybridization with branched DNA (bDNA) amplifier (Fig. 1-B) and alkaline phosphatase-conjugated label probe at 46° C for 1 h each. Four washes with wash buffer were used to remove unbound material after each hybridization step. Substrate working reagent (substrate plus lithium lauryl sulfate) (Fig. 1-C) was added to the wells and incubated at 46°C for 30min. Luminescence from each well was measured in a Victor 3 fluorimeter (Perkin Elmer). RNA sample assays were performed in duplicate (n=2) for all experiments. Measures were standardized, with the protein concentration of each sample tested using the Bradford method. Background signals were determined in the absence of RNA. The signals obtained in the presence of RNA were subtracted from background and divided by the protein concentration.

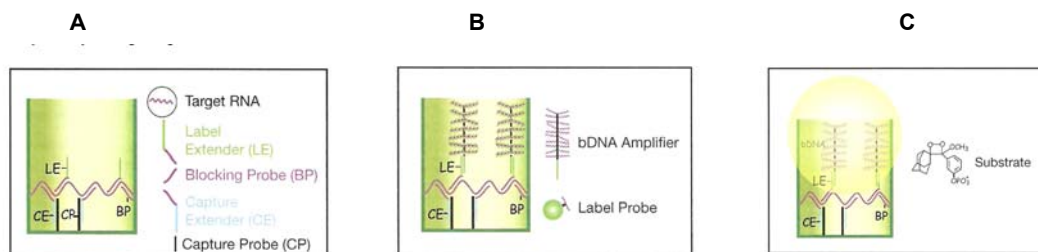


Fig. 1- RNA molecule released from the cells in the presence of Lysis mixture and hybridized to the Probe Sets (CE, LE, BL). B- Amplification signal: The bDNA amplifier hybridizes to LE for the RNA–Probe Set complex in the catch plate. C- Analysis Detection: The chemo-luminescent substrate is added to the catch plate and incubated for 30minutes at 43°. The luminescence signal is proportional to the amount of RNA in the sample.

Statistical Analysis

Means of the duplicate experiments were used for the statistical analysis. Data were transformed by log₁₀ (au) and submitted to ANOVA using the GLM procedure of SAS statistical package (SAS Institute, 2002/2003). ANOVA consisted of both inter-gene expression comparisons (gene expression versus control) and intra-gene comparisons (eight treatments within gene expression), employing the Tukey test.

RESULTS

1. Gene expression of myogenin mRNA through bDNA

ANOVA of the treatments and myogenin mRNA gene expression revealed differences ($p < 0.05$) between the G1, G2, G3, G4 and G6 groups when compared to G8. However, there was no difference in the G5 and G7 groups when compared to the G8. When we compared all groups with the G7, there were only differences ($p < 0.05$) in the G1 and G4 groups. There were no differences between the G1 e G2; G3 e G4; G5 and

G6 groups regarding myogenin mRNA gene expression. There was also no difference between the G7 and G8 (Fig. 4).

2. Gene expression of MyoD mRNA through bDNA

The analysis of variances between treatments and MyoD mRNA gene expression revealed differences ($p < 0.05$) in the G1, G2, G3, G4 and G6 groups when compared to the G8. However, there was no difference between G5 and the G8. When we compared all groups with G7, there were only differences ($p < 0.05$) in the G1, G3, G4 and G5 groups. Comparing treatments between groups for MyoD gene expression, there were only differences ($p < 0.05$) between the G5 and G6 groups. There was also a difference ($p < 0.05$) between the G7 and G8 (Fig. 5).

3. Ppib mRNA gene expression as housekeeping for myogenin mRNA

Regarding Ppib mRNA gene expression as housekeeping for myogenin mRNA (Fig. 4), there were differences ($P < 0.05$) in the G1, G2, G3 and G4 groups when compared to the G7 and G8 (Fig 1). There was no difference in the G5 and G6 groups when compared to the G7 and G8. Comparing treatments between the G1 and G2; G3 and G4; G5 and G6; G7 e G8 groups for Ppib mRNA gene expression, there were no differences in the groups. No difference were found when comparing myogenin mRNA with the respective Ppib mRNA expression in the G1, G2, G3, G4, G5, G6 and G7 groups. A difference was observed between G8 myogenin mRNA and Ppib mRNA gene expression ($p < 0.05$).

4. Ppib mRNA gene expression as housekeeping for MyoD mRNA

Regarding Ppib mRNA gene expression as housekeeping for MyoD mRNA (Fig. 5), there were differences ($p < 0.05$) in the G1, G3, G4 and G6 groups when compared to the G8. No differences were observed in the G5 and G2 groups when compared to the G8. There were differences in the G1 and G4 groups ($p < 0.05$) when compared to the G7 group (Fig.2).

No differences were observed regarding Ppib mRNA gene expression between the G1 and G2, G3 and G4 groups as well as between the G7 and G8. However, there were a difference ($p < 0.05$) between the G5 and G6 groups. There were no differences regarding MyoD mRNA with his respectively Ppib mRNA gene expression in the G1, G2, G3 and G4 groups. However, there were differences ($p < 0.05$) regarding Ppib mRNA gene expression between the G5, G6, G7 and G8.

The transformation $\log_{10}(\text{au})$ proved effective in improving the quality of the data. Skewness, kurtosis and coefficient of variation values for the observed au were 1.7496, 3.1269 and 112.4302, respectively. After the transformation $\log_{10}(\text{au})$ was reduced, values were -0.5353, -0.3765 and 11.5878, respectively. Figure 1 displays the results of the analysis for myogenin and Figure 2 displays the results for MyoD.

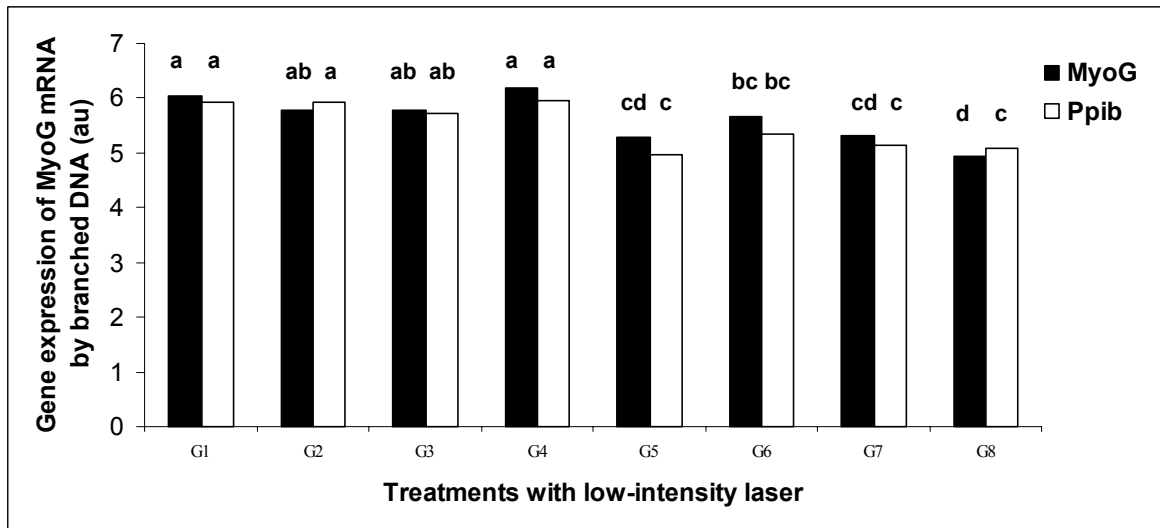


Fig. 4- Gene expression of myogenin (MyoG) mRNA and cyclophilin (Ppib) mRNA analyzed by branched DNA in muscles treated with low-intensity laser. The data from the eight treatment groups were transformed by \log_{10} in arbitrary units (au) and submitted to ANOVA using the GLM procedure of SAS statistical package. The significance level was set at $p < 0.05$.

a,b,c,d differences when compared with respective laser treatment and gene expression.

G1= $\lambda 514\text{nmWI}$; G2= $\lambda 514\text{nm+I}$; G3= $\lambda 660\text{nmWI}$; G4= $\lambda 660\text{nm+I}$; G5= $\lambda 780\text{nmWI}$; G6= $\lambda 780\text{nm+I}$; G7=Injury; G8=Control

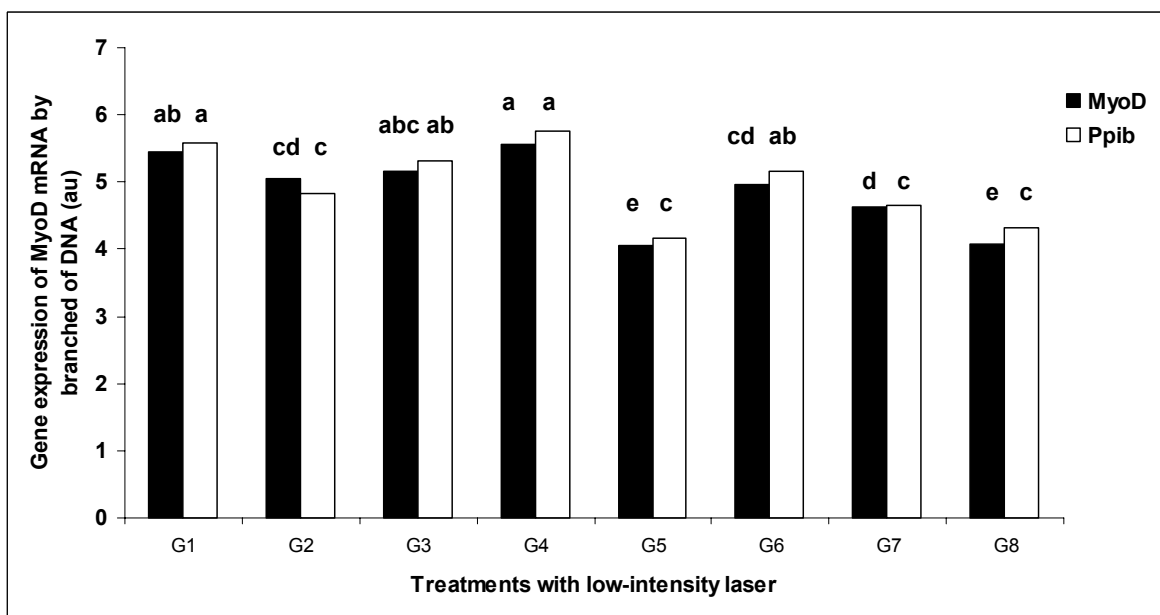


Fig. 5- Gene expression of MyoD mRNA and cyclophilin (Ppib) mRNA analyzed by branched DNA in muscles treated with low-intensity laser. The data from the eight treatment groups were transformed by \log_{10} in arbitrary units (au) and submitted to ANOVA using the GLM procedure of SAS statistical package. The significance level was set at $p < 0.05$.

a,b,c,d differences when compared with respective laser treatment and gene expression.

G1= $\lambda 514\text{nmWI}$; G2= $\lambda 514\text{nm+I}$; G3= $\lambda 660\text{nmWI}$; G4= $\lambda 660\text{nm+I}$; G5= $\lambda 780\text{nmWI}$; G6= $\lambda 780\text{nm+I}$; G7=Injury; G8=Control

DISCUSSION

In the present study, bDNA was employed to improve our understanding of the interactions between low-intensity laser therapy and molecular and cellular mechanisms in skeletal muscle regeneration. This is the first study to investigate *in vivo* three wavelengths of the low-intensity laser on myogenin and MyoD gene expression during muscle regeneration through bDNA. For such, we decided to analyze the effects laser irradiation on MyoD and myogenin gene expression known to mediate the proliferation and differentiation pathway of satellite cell during muscle regeneration [1,2,8,9,26]. Our results demonstrate that treatment with $\lambda=514\text{nm}$ and $\lambda=660\text{nm}$ lasers exerted a greater influence over the gene expression of myogenin mRNA and MyoD mRNA in the G1, G2, G3, G4 and G6 groups when compared to the control group. The 780 nm laser exerted no influence on myogenin gene expression in the treated groups. However, this laser influenced the gene expression of myoD in the groups without injury. 780 nm laser no exerted influence on myogenin gene expression in treated groups. However, this laser influenced the gene expression of myoD in the groups without injury, treated with 780nm laser. Studies have shown that laser irradiation activates quiescent satellite cells; it then directs them toward an earlier cell cycle and mediates the effects on satellite cell proliferation [21,25].

Studies have also shown that low-energy laser irradiation promotes skeletal muscle regeneration *in vivo* [17,25,27]. Laser irradiation was found to enhance satellite cell proliferation, as indicated by the increase of cyclin A protein expression and greater thymidine incorporation, which was followed by a higher growth rate in irradiated cells when compared to non-irradiated controls [25]. In our results, the laser treatment in the G1, G2, G3, G4 and G6 (Fig. 4) groups exerted an influence over the proliferation phase of muscle regeneration, as the lasers have exerted an influence over the gene expression of myogenin and MyoD on Day 5 of regeneration. Our results are in agreement with those found by Zhao and Hoffman [8], who demonstrated that MyoD and myogenin are strongly coordinately induced on day 3 of regeneration and both are rapidly transcriptionally repressed within 48 h.

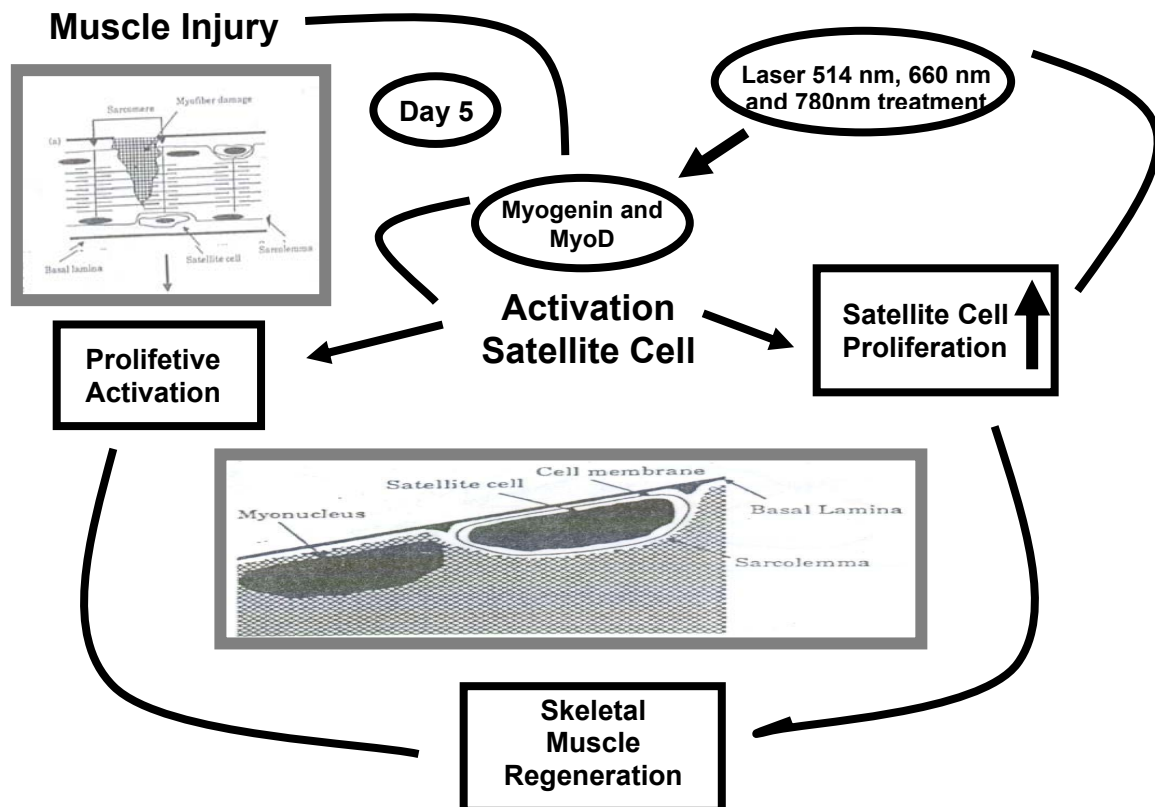


Figure 4. Satellite cell activation via upregulation of myogenin and MyoD transcription factor activation during skeletal muscle regeneration.

There are a number of disagreements in the literature regarding the up-regulation of MyoD and myogenin in myogenic regulation during muscle regeneration. MyoD and myogenin gene products have been demonstrated to be critical for muscle cell determination, differentiation and activation of muscle-specific gene expression [1,9,10,28]. One study [29] shows that myogenin is expressed in repair and regeneration following the local injury of muscle fibers. Other studies have shown that myogenin is also important to the terminal differentiation and fusion myoblasts in mature muscle fibers [10]. Studies have shown that MyoD and myogenin are strongly coordinately induced on day 3 of regeneration [8]. Indeed, muscle regeneration appears to recapitulate, to some extent, the embryonic developmental process [3], in which myogenin and MyoD are expressed in the myotome beginning at E 8.5 at 10.0 somites [30]. From our results, we may state that the $\lambda=514\text{nm}$, $\lambda=660\text{nm}$ and $\lambda=780\text{nm}$ lasers exerted an influence over myogenin mRNA and MyoD mRNA gene expression in the proliferation phase of muscle regeneration. Regarding myogenin mRNA and MyoD mRNA gene expression in the G1 and G3 groups, the laser irradiation likely exerted an influence over the intracellular redox state of the cells in the group without injury. There is no consensus in literature regarding the occurrence of laser actions on injured or healthy tissue.

Studies have shown three regulation pathways in cellular signalization through lasers. The first is the control of the photoacceptor over the level of intracellular ATP. Small changes in the ATP level can alter cell metabolism and influence the regulation of redox homeostasis. The second and third regulation pathways are mediated through the cellular redox state. These pathways involve redox-sensitive transcription factors (NF- κ B and AP-1) or cellular signaling homeostatic cascades from cytoplasm via cell

membrane to the nucleus. It is believed that extra-cellular stimuli elicit cellular responses such as proliferation and differentiation through the cellular signaling pathways. Modulation of the cellular redox state affects gene expression via mechanisms of cellular signaling (via effectors molecules such as transcription factor and phospholipase A₂). There are at least two well-defined transcription factors – nuclear factor kappa β (NF- κ B) and activator protein (AP)-1 – that have been identified as being regulated by the intracellular redox state. The activation of cell metabolism by monochromatic visible light is a redox-regulated phenomenon: the radiation is absorbed by the components of the respiratory chain, which is the start of redox regulation [31,32]. According to our results, these mechanisms likely occur in healthy tissue as well.

In order to interact with the cell, light has to be absorbed by intracellular chromophores. The interaction depends on the absorption spectrum of the chromophore, the wavelength of the light source as well as its intensity and energy dose. Porphyrins, flavins, mitochondrial cytochromes and the plasma membrane NADPH oxidase system, which contains flavoproteins and cytochrome-b, are the main candidates for endogenous chromophores. These chromophores are photosensitizers. They absorb visible light and transfer it to nearby oxygen molecules, thus producing reactive oxygen species (ROS). It is well known that if present in low concentrations below that required for cytotoxicity, ROS have a wide range of positive stimulatory effects on the cell [33].

Studies have shown that ROS stimulate signal transduction processes for transcription factor activation, gene expression, muscle contraction and cell growth [22,34,35]. Micro-array studies to assess gene expression profiles in human fibroblasts cells irradiated with red laser have shown that among 111 genes expressed by light effect, NADH dehydrogenase and ATP synthase were up-regulated [36]. According to our results, it is likely that the $\lambda=514\text{nm}$ and $\lambda=660\text{nm}$ lasers were capable of interacting electively with the intracellular chromophore, acting in the DNA and consequently increasing the transcription of myogenin mRNA and MyoD mRNA.

In the present study, the $\lambda=780\text{nm}$ laser exerted no influence over MyoD mRNA and myogenin mRNA gene expression in uninjured muscle tissue. From this, we can infer that the $\lambda=780\text{nm}$ laser does not activate photobiostimulation mechanisms in muscle cells. A number of studies have shown that visible light can change the redox state of the cell, increasing the cellular reduction capability and enhancing ATP and DNA synthesis [20,31,33,37,38]. This change in the redox state of cells likely occurs due to interactions of light stimulation in photoacceptors located in the mitochondria. The interaction depends on the wavelength of the light source as well as its intensity and energy dose [33]. This phenomenon likely occurs regardless of whether or not there is tissue injury. In our study, it is likely that this mechanism was not activated by the $\lambda=780\text{nm}$ laser in no damaged tissue.

Previous demonstrations of the stimulatory effect of LILT on cell proliferation have been reported in primary cell cultures [24], indicating that low energy doses of $\lambda=780\text{nm}$ diode laser accelerate cell mitosis. Ben-Dov et al. [25] showed that LILT affects satellite cell proliferation and differentiation *in vitro*. This energy level was found to activate quiescent satellite cells and possibly mediates its effect on satellite cell proliferation. From our results, it is likely that the $\lambda=514\text{nm}$, $\lambda=660\text{nm}$ and $\lambda=780\text{nm}$ lasers activated satellite cells in the proliferation phase of muscle regeneration, as evidenced by the enhancement of myogenin mRNA and MyoD mRNA gene expression in injury-treated groups by day 5 following injury.

One study has shown that $\lambda=514\text{nm}$ laser irradiation may promote ATP synthesis [40]. Clinical studies have reported that coherent green light (argon laser) promotes the

healing of wounds [41,42]. The $\lambda=514\text{nm}$ laser irradiation acts on the electron-transport chain and increases electron flow, promoting proton influx through ATP synthesis [40]. It is possible that small changes in concentration of adenine nucleotides (ATP, ADP, and AMP) induce considerable changes in cell metabolism, as the nucleotides act as allosteric effectors (activators and inhibitors) of the several key enzymes of energy metabolism [37,43].

One study has shown that visible laser is more effective in promoting regeneration in diverse tissues, whereas infrared laser has a better effect on the treatment of pain and inflammation [44]. In agreement with these results, we can conclude that only the $\lambda=660\text{nm}$ laser exerted an influence over skeletal muscle regeneration, based on the increase in myogenin and MyoD expression in the proliferation phase of muscle regeneration

In comparing the treatments with regard to myogenin mRNA gene expression, our results revealed that there were no differences between groups. Moreover, in comparing the treatments with regard to MyoD mRNA gene expression, there were only differences between the G1 and G2; G5 and G6 groups. These groups expressed MyoD mRNA, but the G6 group exhibited greater expression. Studies have shown that the $\lambda=780\text{nm}$ laser stimulates the mitochondria, generating ROS and enhanced proliferation of keratinocyte cultures [24,39]. Our results demonstrate that the $\lambda=780\text{nm}$ diode laser had an effect on the biostimulation of cell activities, increasing cell proliferation during muscle regeneration, as determined by the enhancement of MyoD mRNA gene expression.

Based on the literature, we cannot explain the difference between the Ppib housekeeping gene expression as a control of myogenin and MyoD. We suggest that this difference in expression was due to a difference in the variability of gene expression between animal muscles. We conclude that cyclophilin-B (Ppib) is not an appropriate housekeeping gene for skeletal muscle, as it is a cell matrix protein and makes up part of the muscle homeostasis pathway. Studies using micro-array analysis have shown that cyclophilin-B is a cell matrix protein of skeletal muscle in Duroc and Taoyuan pigs [45]. Mitchell et al. [46] have shown that cyclophilin is involved in both normal muscle maintenance and growth via calcineurin (CN) and cyclosporin A (CsA). CN and CsA are also involved in the maintenance of muscle homeostasis. CN is a potent regulator of skeletal muscle regeneration via NFATc1 and GATA-2 [47]. The expression of regulatory proteins involved in the CN signaling pathway involves the regulation of expression of the various isoforms of cyclophilin (A, B and C), the intracellular receptors for CsA that bind and inhibit CN to different extents. Nevertheless, it is likely that Ppib is more sensitive to laser irradiation during muscle regeneration.

CONCLUSIONS

The present study suggests that laser irradiation promotes effects on myogenesis *in vivo*, which may be due to its effect on satellite cell activation by MyoD and myogenin gene expression in the early proliferation phase of skeletal muscle regeneration. Gene expression was evidenced for both transcriptional factors for MyoD and myogenin in both injury-induced muscle tissue and normal muscle tissue in mice. Cyclophilin-B is not an appropriate housekeeping gene for analyzing the gene expression of skeletal muscle.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Brazilian financial agencies CNPq and Fapesp.

REFERENCES

1. Hauke, T.J.; Garry, D.J. Myogenin-enriched satellite cells: Physiology to molecular biology. *Journal of Applied Physiology*. 91:534-551, 2001.
2. Moran, J. L.; Li, Y.; Hill, A. A.; Mounts, W. M.; Miller, C. P. Gene Expression changes during mouse skeletal myoblast differentiation revealed by transcriptional profiling. *Physiological Genomics*. 10:103-111, 2002.
3. Chargé, S. B. P.; Rudnicki, M. A. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *American Physiological Society*. 84:209-238, 2004.
4. Shi, X.; Garry, D. J. Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. *Genes & Development*. 20:1692-1708, 2006.
5. Cserjesi, P.; Olson, E. N. Myogenin induces the myocyte-specific enhancer binding factor MEF-2 independently of other muscle-specific gene products. *Molecular and Cellular Biology*. 11:4854-4862, 1991.
6. Lassar, A. B.; Davis, R. L.; Wright, W. E. Kadesch, T.; Murre, C.; Voronova, A. Baltimore, D.; Weintraub, H. Functional activity of Myogenin-enriched HLH proteins requires hetero-oligomerization with E12/E47-like proteins in vivo. *Cell*. 66:305-315, 1991.
7. Stamler, J.S.; Meissner, G. Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. *Physiological Reviews*. 81:209-237, 2001.
8. Zhao, P.; Hoffman, E. P. Myosin isoforms and repression of MyoD in muscle regeneration. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 342:835-842, 2006.
9. Ishibashi, J.; Perry, R. L.; Asakura, A.; Rudnicki, M. A. MyoD induces differentiation through cooperation of its NH²- and COO-terminal regions. *The Journal of Cell Biology*. 171:(3), 471-482, 2005.
10. Rawls, A.; Wilson-Rawls, J.; Olson, E. N. Genetic regulation of somite formation. *Developmental Biology*. 47:131-154, 2000.
11. Järvinen, T. A. H.; Järvinen, T. L. N.; Kääriäinen, M.; Kalimo, H.; Järvinen, M. Muscle injuries – Biology and Treatment. *The American Journal of Sports Medicine*. 33(5):745-764, 2005.
12. Castro-e-Silva, O.J.; Zucoloto, S.; Menegazzo, L.A.G.; Granato, R.G.; Marcassa, L.G.; Bagnato, V.S. Laser enhancement in hepatic regeneration for partially hepatectomized rats. *Lasers in Surgery and Medicine*. 29:73-77, 2001.

13. Castro-e-Silva, O. J.; Zucoloto, S.; Marcassa, L. G.; Marcassa, J.; Kurachi, C.; Melo, C.A. S.; Ramalho, F. S.; Ramalho, L. N. Z.; Bagnato, V.S. Spectral response for laser enhancement in hepatic regeneration for hepatectomized rats. *Lasers in Surgery and Medicine*. 32:50-53, 2003.
14. Colan, M. J.; Rapley, J. W.; Cobb, C. M. Biostimulation of wound healing by low-energy laser irradiation. A review. *Journal of Clinical Periodontology*. 23:492-496, 1996.
15. Yaakobi, T.; Maltz, L.; Oron, U. Promotion of bone repair in the cortical bone of the tibia in rats by low-energy laser (He-Ne) irradiation. *Calcified Tissue International*. 59:297-300, 1996.
16. Gigo-Benato, D.; Geuna, S.; Rochkind, S. Phototherapy for enhancing peripheral nerve repair: a review of the literature. *Muscle & Nerve*. 31:694-701, 2005.
17. Weiss, N.; Oron, U. Enhancement of muscle regeneration in the rat gastrocnemius muscle by low energy laser irradiation. *Anatomy and Embriology*. 186:497-503, 1992.
18. Bibikova, A. Oron, U. Promotion of muscle regeneration in the toad (*Bufo viridis*) gastrocnemius muscle by low-energy laser irradiation. *The Anatomical Record*. 235:374-380, 1993.
19. Amaral, A. C.; Parizotto, N. A.; Salvini, T. F. Dose-dependency of low-energy He-Ne laser effect in regeneration of skeletal muscle in mice. *Lasers in Medical Science*. 16:44-51, 2001.
20. Karu, T.; Pyatibrat, L.; Kalendo, G. Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated *in vitro*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 27:219-223, 1995.
21. Shefer, G.; Partridge, T. A.; Heslop, L.; Gross, J. G.; Oron, U.; Halevy, O. Low-energy laser irradiation promotes the survival and cell cycle entry of skeletal muscle satellite cells. *Journal of Cell Science*. 115:1461-1469, 2002.
22. Vladimirov, Y. A.; Osipov, A. N.; Klebanov, G. I. Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation. *Biochemistry*. 69 (1):81-90, 2004.
23. Yu, W.; Nain, J. Q.; Lanzafame, R. J. The effect of laser irradiation on the release of bFGF from 3t3 fibroblasts. *Photochemistry and Photobiology*. 59:167-170, 1994.
24. Grossman, N.; Schneid, N.; Reuveni, H. Enhanced proliferation of keratinocyte cultures following 780nm low-power diode laser irradiation. Involvement of reactive oxygen species. *Lasers in Surgery and Medicine*. 22:212-218, 1998.
25. Ben-Dov, N.; Shefer, G.; Irintchev, A.; Wernig, A.; Oron, U.; Halevy, O. Low-energy laser irradiation affects satellite cell proliferation and differentiation *in vitro*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1448:372-380, 1999.
26. Hill, M.; Werning, A.; Goldspink, G. Muscle satellite (stem) cell activation during local tissue injury and repair. *Journal of Antomy*. 203:89-99, 2003.

27. Bibikova, A. Oron, U. Regeneration in denervated toad (*Bufo viridis*) gastrocnemius muscle and the promotion of the process by low energy laser irradiation. *The Anatomical Record*. 241:123-128, 1995.
28. Vivian, J. L.; Olson, E. N.; Klein, W. H. Thoracic skeletal defects in Myogenin- and MRF4-deficient mice correlate with early defects in myotome in intercostal musculature. *Developmental Biology*. 224:29-41, 2000.
29. Cornelison, D. D. Wold, B. J. Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells. *Developmental Biology*. 191: 270-283, 1997.
30. Sassoon, D.; Lyons, G. E.; Wright, W. E.; Lin, V. K.; Lassar, A. B.; Weintraub, H.; Buckingham, M. Expression of two Myogenin regulatory factors Myogenin and MyoD1 during mouse embryogenesis. *Nature*. 341:303-307, 1989.
31. Karu, T. Low-power laser therapy. *Biomedical Photonics Handbook*. 48:1-25, 2003.
32. Karu, T.; Mechanism of interaction of monochromatic visible light with cells. *SPIE*. 2630:1-9, 1995.
33. Lubart, R.; Eichler, M.; Lavi, R.; Friedman, H.; Shainberg, A. Low-energy laser irradiation promotes cellular redox activity. *Photomedicine and Laser Surgery*. 23:3-9, 2005.
34. Suzuki, Y. J.; Ford, G. D. Redox regulation of signal transduction in cardiac and smooth muscle. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 31:345-353, 1999.
35. Rhee, S. G. Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger. *Experimental and Molecular Medicine*. 31:53-59, 1999.
36. Zhang, Y.; Song, S.; Fong, C-C.; Tsang, C-H.; Yang, Z.; Yang, M. cDNA microarrays analysis of gene expression profiles in human fibroblast cells irradiated with red light. *Journal of Investigative Dermatology*. 120:849-857, 2003.
37. Vacca, R. A.; Marra, E.; Quagliariello, E.; Grego, M. Activation of mitochondrial DNA replication by He-Ne laser Irradiation. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 195 (2):704-109, 1993.
38. Karu, T. I. Photobiological fundamentals of low-power laser therapy. *Journal of Quantum Electronics*. 23:1703-1717, 1987.
39. Grossman, N.; Schneid, N.; Reuveni, H.; Halevy, S.; Lubart, R. 780nm low power diode laser irradiation stimulates proliferation of keratinocyte culture: involvement of reactive oxygen species. *Lasers in Surgery and Medicine*. 22: 212- 218, 1998.
40. Morimoto, Y.; Arai, T.; Kikuchi, M.; Nakajima, S.; Nakamura, H. Effect of low-intensity Argon laser irradiation on mitochondrial respiration. *Lasers in Surgery and Medicine*. 15:191-199, 1994.

41. Kana, J. S.; Hutschenreiter, G.; Haina, D.; Waidelich, W. Effect of low-power density laser irradiation on healing of open skin wounds in rats. *Archives of Surgery*. 116:293-296, 1981.
42. Mester, E.; Mester, A. F.; Mester, A. The biomedical effects of laser application. *Lasers in Surgery and Medicine*. 5:31-39, 1985.
43. Maddaiah, V. T. Exercise and energy metabolism. *Pediatric Annals*. 13:565-572, 1984.
44. Carrinho, P.M. Rennó, A.C.M. Koeke, P.U.; Salate, A.C.B.; Parizotto, N.A. ; Vidal, B. C. Comparative Study Using 685-nm and 830-nm lasers in tissue repair of tenotomized tendons in the mouse. *Photomedicine & Laser Surgery*. 24:754-758, 2006.
45. Lin, C. S.; Hsu, C. W. Differentially transcribed genes in skeletal muscle of Duroc and Taoyuan pigs. *Journal of Animal Science*. 83:2075-2086, 2005.
46. Mitchell, P. O.; Mills, S. T.; Pavlath, G. K. Calcineurin differentially regulates maintenance and growth of phenotypically distinct muscle. *AJP–Cell Physiology*. 282:984-992, 2002.
47. Sakuma, K.; Nishikawa, J.; Nakao, R.; Watanabe, K.; Totsuka, T.; Nakano, H.; Sano, M.; Yasuhara, M. Calcineurin is a potent regulator for skeletal muscle regeneration by association with NFATc1 and GATA-2. *Acta Neuropathologica*. 105:271-280, 2003.

MANUSCRITO – II

Effect of Low-Intensity Laser on Skeletal Muscle Regeneration *in Vivo* through an Analysis of Gene Expression Profile Vegfa, Rcan1, Pdgfc and Ndufa1

Olga S. M. Moreira, MSc¹, Lívia R. de Assis, MSc¹, Henrique-Silva, F. PhD², Vanderlei S. Bagnato, PhD³, Nivaldo A. Parizotto, PhD⁴

¹Master's in Physical Therapy Program, Federal University of São Carlos, 13565-905 São Carlos, SP, Brazil

²Department of Genetic and Evolution, Federal University of São Carlos /SP, 13565-905 São Carlos, SP, Brazil

³Institute of Physics of São Carlos, São Paulo University, Cx. Postal 369, 13560-970, São Carlos, SP, Brazil

⁴Department of Physical Therapy, Federal University de São Carlos, 13565-905 São Carlos, SP, Brazil

Background and Objective: The branched DNA method was used to investigate the gene expression profiles of Vascular endothelial growth factor-a (Vegfa), Regulator of calcineurin 1 (Rcan1) [Human] DSCR1 or Adapt78], Ndufa1 ([NADH dehidrogenase] NADH dhdg) and Platelet derived growth factor-c (Pdgfc) in mouse skeletal muscle irradiated *in vivo* with low-intensity laser. The gene expression profiles revealed that Vegfa, Rcan1, were upregulated by the red, infrared and green laser irradiation. Ndufa1 was upregulated by the red and green laser. Pdgfc was not upregulated by laser irradiation during skeletal muscle regeneration. The VEGF-A, RCAN1, NADH dhdg, PDGF-C genes respectively play roles in the enhancement of angiogenesis, inhibition of angiogenesis, supplying energy for metabolic mechanisms, and mitogen factor and angiogenesis. The objective of the present study is to investigate *in vivo* the dependence of different laser wavelengths on mRNA Vegfa, Rcan1, Ndufa1 and Pdgfc gene expression profiles in skeletal muscle regeneration.

Materials and Methods: Forty male mice (*Mus musculus*) were used in this study. The experiment was carried out over seven days. Surgery was performed on the 1st day; the animals were submitted to the irradiation protocol on the 2nd, 3rd and 4th days; the animals were sacrificed on the 5th day and the muscles were frozen; the muscles were defrosted and submitted to the QuantiGene System (Panomics^(R)) protocol on the 6th and 7th days. The data from the eight treated groups were transformed by log₁₀ and submitted to ANOVA using the Generalized Linear Models (GLM) procedure of SAS.

Results: Gene expression assays revealed that Vegfa, Rcan1, Ndufa1 were expressed in proliferative phase during skeletal muscle regeneration using different irradiation wavelengths. Pdgfc was not expressed by the influence of the treatments during skeletal muscle regeneration.

Conclusions: The present study suggests that laser irradiation is effective on skeletal muscle regeneration *in vivo*, which may be due to its effect on activation by Vegfa, Rcan1 and Ndufa1 gene expression in the early proliferation phase of skeletal muscle regeneration. Pdgfc is not expressed during the proliferation phase of the skeletal muscle regeneration. The transcripts investigated were expressed in both injured and healthy

tissue. Cyclophilin-B and β -actin are not appropriate housekeeping for the investigation of skeletal muscle regeneration.

Key words: Laser, branched DNA, gene expression, Vegfa, Rcan1, Ndufa1, Pdgfc, mouse

INTRODUCTION

Skeletal muscle exhibits a high capacity to regenerate/repair damaged tissue following injury. After injury, myogenic cells are activated to proliferate and then differentiate myoblasts into myotubes (Shi and Garry, 2006; Germani et al., 2003). Muscle regeneration depends on several signalization molecular events, which can be influenced by low-intensity laser therapy (Beckerman et al., 1992; Oliveira et al., 1999; Shefer et al., 2002). The effects of low-intensity laser irradiation (LILI) on biological tissue regeneration depend on timing, dosage, wavelength, frequency of irradiation and spectral absorption in the molecular chromophores (Amaral et al., 2001).

There is a close relationship between maintaining blood supply and muscle regeneration (Carlson, 1973; Wagatsuma, 2007), indicating that revascularization plays an important role in the success of muscle regeneration (Carlson, 1983; Wagatsuma, 2007; Shi & Garry, 2006). Studies suggest that the molecular events during angiogenesis occur at an early stage of muscle regeneration (Wagatsuma et al., 2006; Wagatsuma, 2007). Vascular endothelial growth factor (VEGF) is an angiogenic growth factor that plays an important role in vascular development as well as in physiological and pathological angiogenesis (Germani et al., 2003). However, evidence suggests that VEGF and its receptors participate in muscle regeneration (Wagatsuma et al., 2006). VEGF binds to two receptor-type tyrosine kinases, Flt-1 and Flk-1/KDR (Minami et al., 2004; Wagatsuma, 2006; Wagatsuma, 2007). VEGF may regulate muscle fiber formation through a direct effect on satellite cells because the exogenous administration of VEGF stimulates myoblast migration (Germani et al., 2003). Vegfa expression is enhanced in ischemic skeletal muscle and is thought to play a key role in the angiogenesis response to ischemia (Rissanen et al. 2002; Germani et al., 2003; Milkiewicz et al., 2004). VEGF and its receptors are altered in response to muscle injury, suggesting their increase could play an important role in angiogenesis during muscle regeneration (Wagatsuma, 2007).

The human RCAN1 gene is located on chromosome 21 in the region 21q22.12 (Hattori et al., 2000; Harris et al., 2005) and is highly expressed in skeletal muscle (Harris et al., 2005). There is disagreement in the literature regarding the functions of RCAN1. Some studies suggest that RCAN1 stimulates angiogenesis (Lizuka et al., 2004), whereas others have shown that RCAN1 acts to inhibit angiogenesis (Minami et al., 2004). There are studies that establish a relationship between the upregulation of RCAN1 and skeletal muscle hypertrophy (Musaro et al., 1999; Harris et al., 2005).

Myogenic precursor cells in adults, which are often referred to as satellite cells, can reinitiate proliferation activity after muscle injury and their progeny fuses into multinucleated fibers (Mauro, 1979; Reuveni et al., 1990). Studies on adult-derived myoblasts have identified several physiological growth factors that could regulate the quiescent and proliferation states of satellite cells, including platelet-derived growth factor (PDGF) (Reuveni et al., 1990; Tidball and Spencer, 1993; Järvinen et al., 2005). PDGF has been indicated as an important mediator of injury healing and tissue repair (Ross et al., 1986; Reuveni et al., 1990), but its role in skeletal muscle regeneration has

not been fully investigated. It is a potent mitogen for many mesenchymal cells, including fibroblasts and smooth muscle cells (Heldin and Westermark, 1989; Reuveni et al., 1990). PDGF can also elicit other biological responses, including increased metabolic rates and chemotaxis (Heldin and Westernack, 1989; Reuveni et al., 1990). Furthermore, it is expressed in the injured muscle by physiological stimuli (micro traumas) such as external stretching or mechanical loading (Burkin and Kaufman, 1999; Järvinen et al., 2005).

NADH dhdg is one the most important electron donators of the mitochondrial energy transfer system, which produces ATP through oxidative phosphorylation (Wilden and Karthein, 1998). Recapitulation of the myogenic program requires energy production for the execution of a number of regulatory and biosynthesis events. Muscle cell differentiation appears to depend on mitochondrial function (Duguez et al., 2002).

The aim of the present study was to investigate *in vivo* the influence of low-intensity laser therapy on Vegfa, Rcan1, Pdgfc and Ndufal gene expression during skeletal muscle regeneration.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Forty male mice (*Mus musculus*) with a body mass of 40g±1g were purchased from the Bioterium of the Federal University of São Carlos/SP, Brazil. Prior to and after the experimental surgery procedure, the animals were maintained five per cage under 12 h light/dark cycles for environmental adaptation, water and chow *ad libitum* and illness control. The study was approved by Ethics Committee for Animal Experiments of the Federal University of São Carlos (Number 007/2005).

Surgery Technique and Irradiation Protocol

The experiment was carried out in seven days:

1st day – The body mass of the animals was determined. The animals were anaesthetized and the tibialis anterior muscle (TAM) was surgically exposed. Muscle freezing was performed by applying the flat end of a piece of iron pre-cooled in liquid nitrogen to the surface of part of the TAM and maintaining it in transversal position in relation the muscle for 10s (twice). The cold injury consisted of two freeze-thaw cycles of the muscle *in situ*. Once, the muscle had thawed and the wounds were closed with polyamide sutures (3-0). The animals were then kept for 24 hours in a warm cage (37°C) to prevent hypothermia.

2nd, 3rd and 4th days – The animals were submitted to the irradiation protocol in accordance to the dose and respective wavelength established for each group for three consecutive days.

5th day – The animals from all groups were anesthetized and submitted to surgery to remove the TAM. The TAM of each animal was cut into five samples (10mg) and weighed. Approximately 10mg of each muscle was placed in an Eppendorf tube with 300µl of homogenizing solution that had an RNAase free solution. The muscles of the animals were then frozen in nitrogen and placed in a freezer at -80°C. The animals were then sacrificed with an overdose of anesthetic. All surgery-incisions and all muscle lesions were performed by the same researcher.

6th and 7th days – The muscles that were removed and previously frozen were submitted to the QuantiGene System (Panomics^(R)) protocol.

Light sources

Three light sources were used in this experiment:

- Indium-gallium-aluminum arsenide (InGaAlAs) $\lambda=660\text{nm}$ diode laser (MM Optics) – output of 40mW, fluency of $10\text{J}/\text{cm}^2$, transverse section area of laser beam of 0.04cm^2 and exposure time of 10 seconds.
- Gallium-aluminum-arsenide (GaAlAs) $\lambda=780\text{nm}$ diode laser (MM Optics) - output of 40mW, fluency of $10\text{J}/\text{cm}^2$, transverse section area of laser beam of 0.04cm^2 and exposure time of 10 seconds.
- Argon laser $\lambda=514\text{nm}$ (Nereid Light Phototherapy System, Healthtech, Shanghai, China) – output of 40mW, fluency of $10\text{J}/\text{cm}^2$, transverse section area of laser beam of 0.07cm^2 and exposure time of 5 seconds.

Experimental Groups

The animals were divided into eight groups (n=5)

Group 1	G1	Animals without cold injury and treated	$\lambda=514\text{nmWI}$
Group 2	G2	Animals with muscles cold injury and treated with laser	$\lambda=514\text{nm}+I$
Group 3	G3	Animals without cold injury and treated	$\lambda=660\text{nmWI}$
Group 4	G4	Animals with muscles cold injury and treated with laser	$\lambda=660\text{nm}+I$
Group 5	G5	Animals without cold injury and treated	$\lambda=780\text{nmWI}$
Group 6	G6	Animals with muscles cold injury and treated with laser	$\lambda=780\text{nm}+I$
Group 7	G7	Animals with muscles cold injury	no treated
Group 8	G8	Control	-

Irradiation Protocol

The animals were immobilized by researcher's hand and placed in an appropriate position to expose the injured area and administer the laser beam. This was done to prevent anaesthetizing the animals during irradiation.

Laser irradiation was performed directly on the skin covering the TAM. The animals from groups G2, G4 and G6 were irradiated directly on surgery incision, whereas those from groups G1, G3 and G5 were irradiated directly on the site

corresponding to the injury. Laser irradiation was performed daily in point mode for three consecutive days every 24 hours beginning on the second day (24 h after injury).

QuantiGene Assay Procedure

QuantiGene assays were performed according to the procedure of Quantigene Reagent System (Panomics®). To quantify of gene expression, we used the Step-by-Step User's Guide for Animal Tissue Homogenates of the QuantiGene Reagent System Evaluation Program.

Probes were synthesized by Panomics® upon request based on the sequences deposited in the GenBank for Vegfa (VEGF) accession number NM_009505, Rcan1 (DSCR1) accession number NM_162305, Ndufb2 (NADH dhg) accession number NM_026612, Pdgfc (PDGF) accession number NM_019971, peptidylprolyl isomerase-B ([Ppib] – Cyclophilin-B) accession_number NM_011149 and Actb (actin beta) accession number NM_007393.

Ten µg of tissue from each sample was mixed with 300µl of homogenizing solution and 1µl of proteinase K. Each tissue sample was grinded in an Eppendorf tube using a pestle. Next, 20µl of tissue homogenate, 70µl of diluted lysis mixture and 10µl of a working probe set (pool prepared with 3µl each CE, LE, BL (Fig. 1) and 291µl of lysis mixture) were added into each well of the capture plate. The capture plate was sealed and incubated at 53°C for 16-20h. The wells were then washed once with 200µl/well wash buffer and three times with 300µl/well wash buffer. Residual wash buffer was removed by centrifugation of the plate (inverted) at 240x g for 1min. Signals for the bound target mRNA were developed by sequential hybridization with branched DNA (bDNA) amplifier (Fig. 2) and alkaline phosphatase-conjugated label probe at 46°C for 1h each. Four washes with wash buffer were used to remove unbound material after each hybridization step. Substrate working reagent (substrate plus lithium lauryl sulfate) (Fig. 3) was added to the wells and incubated at 46°C for 30min. Luminescence from each well was measured in a Victor 3 fluorimeter (Perkin Elmer). RNA samples were assayed directly in duplicate (n=2) for all experiments. Measures were standardized with the protein concentration of each sample attested by the Bradford method. Background signals were determined in the absence of RNA. Signals obtained in the presence of RNA were subtracted from the background and divided by the protein concentration.

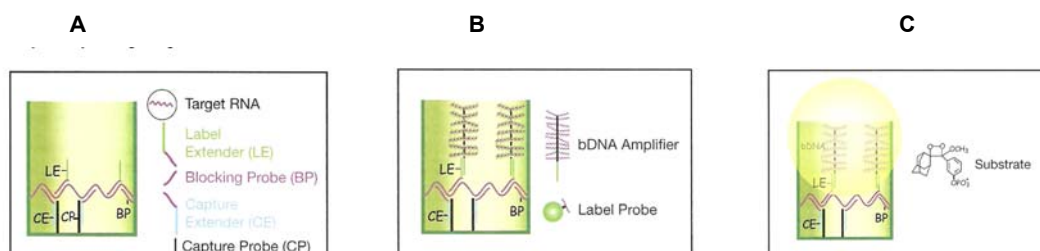


Fig. 1- RNA molecule released from the cells in the presence of Lysis mixture and hybridized to the Probe Sets (CE, LE, BL). B- Amplification signal: The bDNA amplifier hybridizes to LE for the RNA–Probe Set complex in the catch plate. C- Analysis Detection: The chemo-luminescent substrate is added to the catch plate and incubated for 30minutes at 43°. The luminescence signal is proportional to the amount of RNA in the sample.

Statistical analysis

The mean of the duplicate assays was used for the analysis. Observed data were transformed by log₁₀ (au) and submitted to ANOVA by the SAS GLM procedure (SAS Institute, 2002/2003). The ANOVA consisted of inter-gene expression comparisons (gene expression versus control) and intra-gene comparisons (eight treatments within gene expression), considering the Tukey test.

RESULTS

1. Gene expression of Vegfa mRNA through bDNA

ANOVA regarding Vegfa mRNA gene expression revealed differences ($p < 0.05$) between the CG and groups G1, G2, G3, G4, G5, G6 and G7. There were no differences when we compared the groups to G7. Comparing treatments between groups G1 and G2; G3 and G4; G5 and G6 our results revealed no differences in relation to Vegfa mRNA gene expression. There was a difference, however, between G7 and G8 (Fig. 2).

2. Gene expression of Rcan1 mRNA through bDNA

ANOVA regarding Rcan1 mRNA gene expression revealed differences ($p < 0.05$) between the G8 and groups G1, G2, G3 and G4. There was no difference between G5 and G6 and the G8. However, the G8 expressed more than groups G1, G2, G3 and G4 (Table 1). There was no difference between the G7 and G8. There were differences ($p < 0.05$) between the G7 and groups G1, G2, G3, G5 and G6. Comparing treatments between groups for Rcan1 gene expression, there were only differences ($p < 0.05$) between groups G3 and G4. There was no difference between G7 and G8 (Fig. 3).

3. Gene expression of Ndufa1 mRNA through bDNA

ANOVA regarding Ndufa1 mRNA gene expression revealed differences ($p < 0.05$) between the G8 and groups G1 and G4. There were no difference between the G8 and groups G2, G3, G5, G6 and G7. There were differences ($p < 0.05$) between the G7 and groups G1, G2, G3 and G4. Comparing treatments between groups regarding Ndufa1 gene expression, there were only differences ($p < 0.05$) G3 and G4. There was no difference between G7 and G8 (Fig 4).

4. Gene expression of Pdgfc mRNA through bDNA

ANOVA regarding Pdgfc mRNA gene expression revealed no differences between all treated groups. Comparing treatments between groups there was only a difference ($p < 0.05$) between the G7 and G8 (Fig.5).

5. Ppib mRNA gene expression as housekeeping for Vegfa mRNA

In relation to Ppib mRNA gene expression as housekeeping for Vegfa mRNA, there were differences ($p < 0.05$) between the G8 and groups G1 and G5. There was a difference ($p < 0.05$) between the G7 and G8 as well. However, the G8 expressed more than all treated groups (Table 1). Comparing treatments between groups, there were

differences ($p < 0.05$) between G1 and G2; G7 and G8 regarding Ppib mRNA gene expression.

Comparing the groups G1, G2, G3, G4, G5, G6 and G7 Vegfa mRNA with their respective Ppib mRNA expression, there were differences ($p < 0.05$) between G1 mRNA Vegfa and G1 mRNA Ppib; G2 mRNA Vegfa and G2 mRNA Ppib; G3 mRNA Vegfa and G3 mRNA Ppib; G8 mRNA Vegfa and G8 mRNA Ppib (Fig. 2).

6. Ppib mRNA gene expression as housekeeping for Rcan1 mRNA

In relation to Ppib mRNA gene expression as housekeeping for Rcan1 mRNA, there were differences ($p < 0.05$) between the G8 and groups G1, G2, G3, and G4. However, only G5 and G6 expressed more than G8 (Table 1).

Comparing treatments between groups, there were differences ($p < 0.05$) between G3 and G4; G7 and G8 to expression of mRNA Ppib. Comparing the groups G1, G2, G3, G4, G5, G6 and G7 Rcan1 mRNA with their respective Ppib mRNA gene expression, there were differences ($p < 0.05$) between G2 Rcan1 mRNA and G2 Ppib mRNA; G3 Rcan1 mRNA and G3 Ppib mRNA; G4 mRNA Rcan1 and G4 mRNA Ppib (Fig. 3).

7. Ppib mRNA gene expression as housekeeping for Ndufa1 mRNA

In relation to Ppib mRNA gene expression as housekeeping for Ndufa1 mRNA, there were differences ($p < 0.05$) between the G8 and groups G2, G3, G6 and G7. However, the G8 expressed more than G2 and G3 (Table 1). Comparing treatments between groups, there were differences ($p < 0.05$) between G1 and G2; G3 and G4; G5 and G6; G7 and G8 regarding Ppib mRNA gene expression.

Comparing the groups G1, G2, G3, G4, G5, G6 and G7 Ndufa1 mRNA with their respective Ppib mRNA expression, there were differences ($p < 0.05$) between G1 Ndufa1 and G1 Ppib mRNA; G2 Ndufa1 and G2 Ppib mRNA; G4 Ndufa1 and G4 Ppib mRNA (Fig. 4).

8. b-actin mRNA gene expression as housekeeping for Pdgfc mRNA

In relation to b-actin mRNA gene expression as housekeeping for Pdgfc mRNA, there was no difference ($p < 0.05$) between the G8 and treated groups. Comparing the groups G1, G2, G3, G4, G4, G5 and G7 Pdgfc mRNA with their respective b-actin mRNA gene expression, there was a difference ($p < 0.05$) between G1 Pdgfc and G1 b-actin.

The transformation \log_{10} (au) proved effective in improving the quality of the data; the values of skewness, kurtosis and coefficient of variation for the observed au were 1.7496, 3.1269 and 112.4302, respectively. After the transformation \log_{10} (au), these were reduced to -0.5353 , -0.3765 and 11.5878 , respectively. The results of the analysis are presented in Figure 1 for the Vegfa, Figure 2 for Rcan1, Figure 3 for Ndufa1 and Figure 4 for Pdgfc.

Table 1. Analysis of gene expression of Vegfa, Rcan1, Ndufa1 and Pdgfc with the luminescence data transformed into \log_{10} (au) submitted to phototherapy with different laser wavelengths.

	Treatments
--	------------

Genes	G514WI	G514+ I	G660WI	G660+I	G780WI	G780+I	Injury	Control
Vegfa	5.25 ab	4.96 b	5.05 b	5.26 ab	5.31 ab	5.42 a	5.11 ab	4.51 c
Ppib	3.99 c	4.75 a	4.73 a	4.74 a	4.18 bc	4.50 ab	4.19 bc	4.77 a
Rcan1	4.88 de	4.75 e	4.61 e	5.14 cd	5.77 a	5.74 a	5.69 ab	5.40 bc
Ppib	4.53 d	4.51 d	4.46 d	4.96 c	6.03 a	5.88 a	5.96 a	5.50 b
Pdgfc	4.42 ab	4.57 ab	4.50 ab	4.47 ab	4.70 a	4.66 a	4.18 b	4.87 a
Actb	4.30 c	4.73 abc	4.73 abc	4.64 abc	4.93 a	4.92 ab	4.40 bc	4.76 abc
Ndufa	5.22 cd	5.49 bc	5.44 bc	4.97 d	5.67 ab	5.69 ab	5.91 a	5.70 ab
Ppib	5.03 b	4.29 d	4.63 c	4.95 b	4.96 b	5.68 a	5.51 a	5.12 b

Different letters in the same row indicate significance ($P < .05$) using the Tukey test

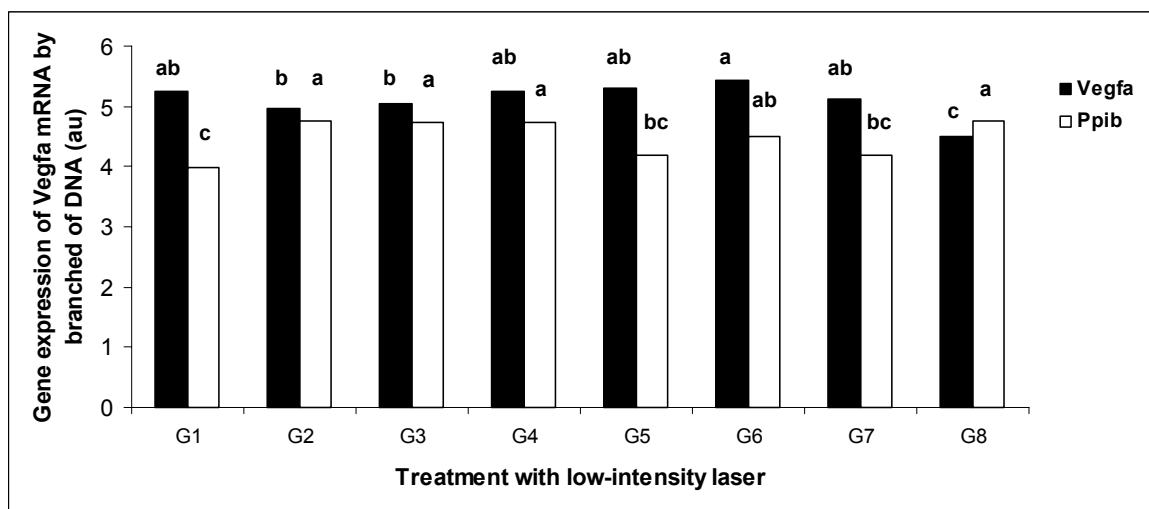


Fig. 2. Gene expression of Vegfa mRNA and cyclophilin (Ppib) mRNA analyzed by branched DNA in muscles treated with low-intensity laser. The data of the eight treatments groups were transformed by \log_{10} in arbitrary units (au) and submitted to ANOVA by GLM procedure of SAS. The significance level was ($p < 0.05$).

a,b,c differences when compared with respective laser treatment and gene expression.

Letters different in the same row indicates significance ($P < .05$) by Tukey test.

G1= λ 514nmWI; G2= λ 514nm+I; G3= λ 660nmWI; G4= λ 660nm+I; G5= λ 780nmWI; G6= λ 780nm+I; G7=Injury; G8=Control

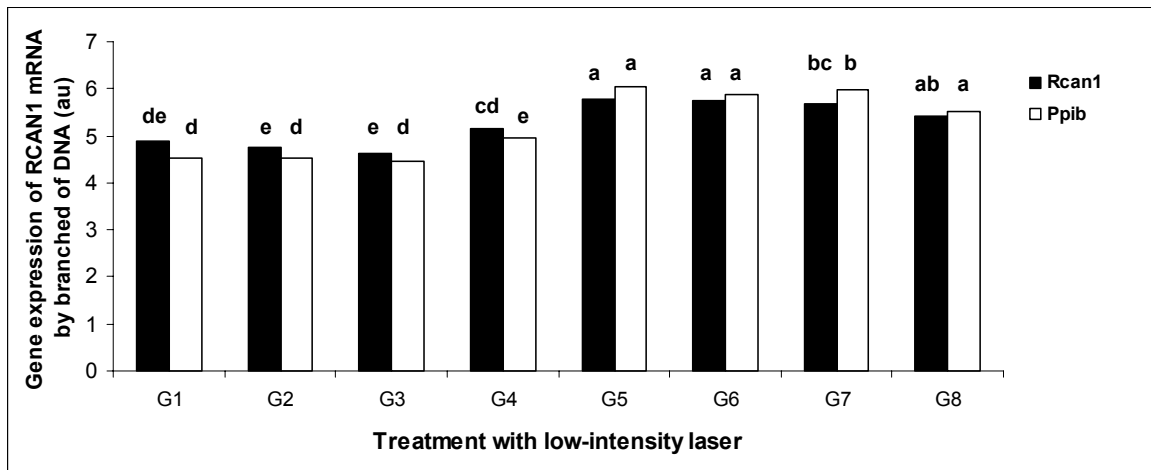


Fig. 3. Gene expression of Rcan1 mRNA and cyclophilin (Ppib) mRNA analyzed by branched DNA in muscles treated with low-intensity laser. The data of the eight treatments groups were transformed by \log_{10} in arbitrary units (au) and submitted to ANOVA by GLM procedure of SAS. The significance level was ($p < 0.05$).

a,b,c,d differences when compared with respective laser treatment and gene expression.

Letters different in the same row indicates significance ($P < .05$) by Tukey test.

G1= $\lambda 514\text{nmWI}$; G2= $\lambda 514\text{nm+I}$; G3= $\lambda 660\text{nmWI}$; G4= $\lambda 660\text{nm+I}$; G5= $\lambda 780\text{nmWI}$; G6= $\lambda 780\text{nm+I}$; G7=Injury; G8=Control

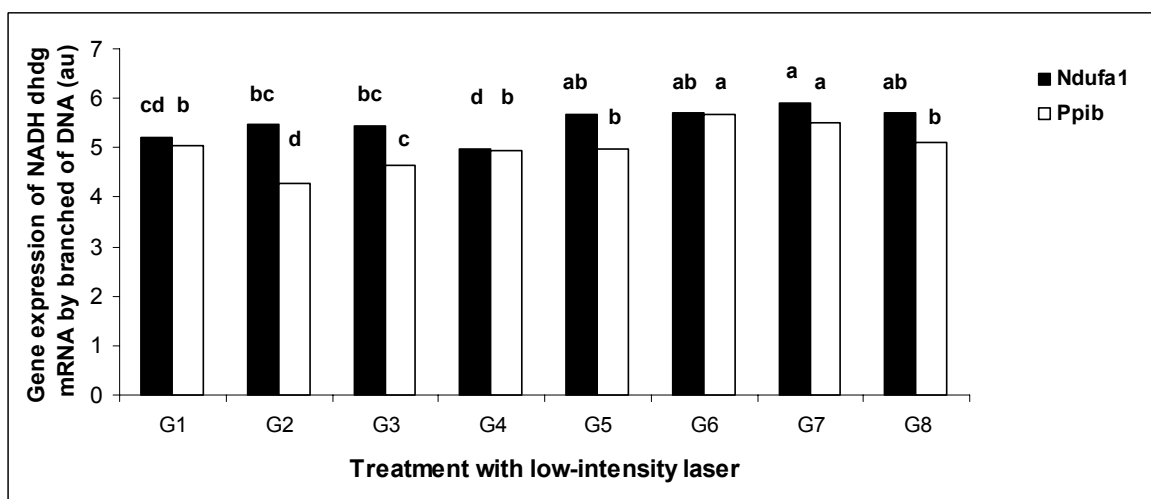


Fig. 4. Gene expression of Ndufa1 mRNA and cyclophilin (Ppib) mRNA analyzed by branched DNA in muscles treated with low-intensity laser. The data of the eight treatments groups were transformed by \log_{10} in arbitrary units (au) and submitted to ANOVA by GLM procedure of SAS. The significance level was ($p < 0.05$).

a,b,c,d differences when compared with respective laser treatment and gene expression.

Letters different in the same row indicates significance ($P < .05$) by Tukey test.

G1= $\lambda 514\text{nmWI}$; G2= $\lambda 514\text{nm+I}$; G3= $\lambda 660\text{nmWI}$; G4= $\lambda 660\text{nm+I}$; G5= $\lambda 780\text{nmWI}$; G6= $\lambda 780\text{nm+I}$; G7=Injury; G8=Control

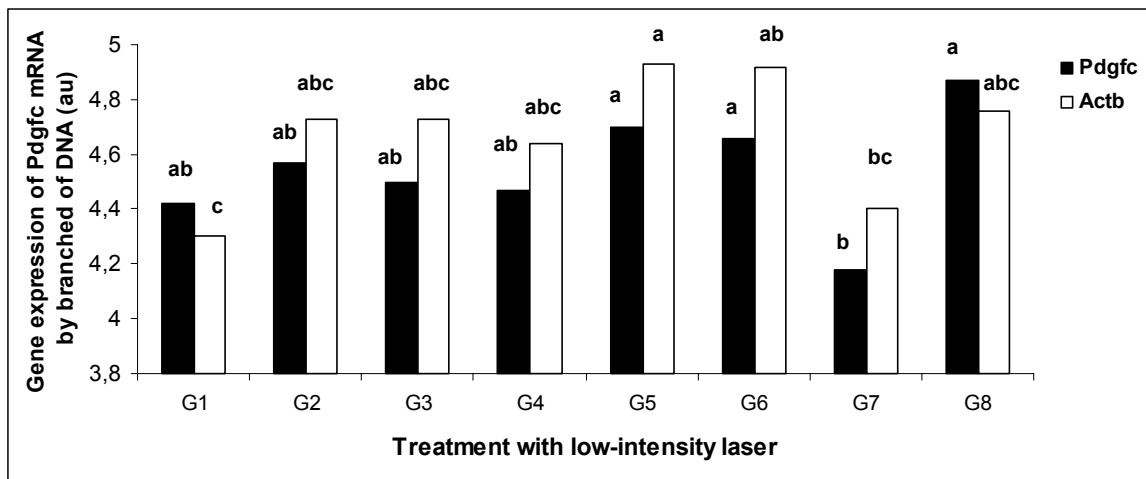


Fig. 5. Gene expression of Pdgfc mRNA and b-actin (Actb) mRNA analyzed by branched DNA in muscles treated with low-intensity laser. The data of the eight treatments groups were transformed by \log_{10} in arbitrary units (au) and submitted to ANOVA by GLM procedure of SAS. The significance level was ($p < 0.05$).

a,b,c,d differences when compared with respective laser treatment and gene expression.

Letters different in the same row indicates significance ($P < .05$) by Tukey test.

G1= $\lambda 514\text{nmWI}$; G2= $\lambda 514\text{nm+I}$; G3= $\lambda 660\text{nmWI}$; G4= $\lambda 660\text{nm+I}$; G5= $\lambda 780\text{nmWI}$; G6= $\lambda 780\text{nm+I}$; G7=Injury; G8=Control

DISCUSSION

The present study was designed to investigate time course changes in mRNA expression profiles of Vegfa, Rcan1, Pdgfc and Ndufa1 during muscle regeneration. Our results show that regeneration muscle fibers express Vegfa, Rcan1 and Ndufa1 mRNA, suggesting that these molecular pathways are associated to the process of muscle regeneration *in vivo*.

1. Gene expression of Vegfa mRNA

Studies have shown that VEGF mRNA and protein expression are upregulated in ischemic muscle (Rissanen et al., 2002; Milkiewicz et al., 2004; Tuomisto et al., 2004). VEGF protein was shown to increase in ischemic skeletal muscle 11 days after a femoral artery ligation (Milkiewicz et al., 2004). VEGF-A gene-therapy acts on ischemic skeletal muscle by upregulating myoglobin expression in a mouse model with acute hind limb ischemia (van Weel et al., 2007). A study on angiogenesis found an overexpression of VEGF in skeletal myocytes during skeletal muscle regeneration (Kim, et al., 2006; Arsic et al., 2004).

VEGF production is enhanced by hypoxia in both *in vitro* (Shweiki et al., 1992) and *in vivo* assays (Banai et al., 1994). Moreover, it has been shown that VEGF and its receptors in an ischemic limb are upregulated several hours after the induction of ischemia (Rissanen et al., 2002; Milkiewicz et al., 2001; Germani et al., 2003).

The effect of low-energy laser (He-Ne) on the neoformation process of blood capillaries during regeneration in the toad (*Bufo viridis*) gastrocnemius muscle was investigated and it was concluded that laser He-Ne irradiation during skeletal muscle regeneration markedly promotes the neoformation process of blood vessels in the injured region (Bibikova and Oron, 1994). Another study found that low-intensity laser irradiation promotes an increase in microcirculation (Maegawa et al., 2000)

According to our results, Vegfa mRNA was upregulated in treated muscles when compared to the CG. These results suggest that laser therapy may have exerted an influence over Vegfa expression during muscle regeneration and likely participated in the angiogenesis and regeneration process 5 days following the induction of freeze injury, but when we compared all groups with G7, we concluded that VEGF was also expressed without the influence of the laser.

According to Wagatsuma et al. (2006), the VEGF mRNA transcript transiently increases after 12 h of muscle injury and then returns to baseline levels observed in normal muscle on Day 1. The expression of Flt-1 and KDR/Flk-1 mRNA transcripts peaked on Day 3 and then returned to the baseline levels observed in normal muscle on Day 10. According to Milkiewicz et al. (2004), VEGF protein is increased in skeletal muscle 11 days after femoral artery ligation. Wagatsuma et al. (2007) found that VEGF mRNA began to increase from Day 3 and peaked on Day 5 following muscle injury. Our results revealed that the VEGF mRNA transcript was upregulated for 5 days during skeletal muscle regeneration.

2. Gene expression of Rcan1 mRNA

The human RCAN1 gene is located on chromosome 21 in the region 21q22.12 (Hattori et al., 2000). This gene is highly expressed in skeletal muscle (Harris et al., 2005) and encodes a protein that interacts physically and functionally with calcineurin A, a catalytic subunit of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein phosphatase (PP2B) (Klee et al., 1998; Wang et al., 2002). One study has shown that RCAN1 plays a role in angiogenesis by regulating adhesion and migration of endothelial cells (ECs) through the interaction with integrin $\alpha\beta 3$ (Lizuka et al., 2004). Another study found that RCAN1 acts as a “circuit breaker” in VEGF and thrombin signaling, serving as a negative feedback loop to inhibit endothelial cell proliferation and activation as well as angiogenesis (Minami et al., 2004). RCAN1 may be involved in signaling pathways in skeletal muscle remodeling (Bassel-Duby and Olson, 2006; Schiaffino et al., 2007). There are no data in the literature investigating the influence of LILI on RCAN1 gene expression during skeletal muscle regeneration. Our results reveal that the 514 nm and 660 nm laser exerted an influence over the signaling pathway during muscle regeneration or angiogenesis, revealed by an increase in Rcan1 mRNA transcripts in groups treated with this wavelength. Therefore, we believe that differences in light effects on the gene expression of Rcan1 mRNA only occur in the $\lambda=780$ nm treatment, as the expression of mRNA in groups treated with $\lambda=514$ nm and $\lambda=660$ nm was less than groups treated with $\lambda=780$ nm laser (table 1) and because the 780 nm groups (both injured 780 nm group and the injured and treated 780 nm group) were different from the group with injury alone.

VEGF and thrombin signals are transduced through calcineurin-dependent nuclear translocation of NF-AT transcription factors (Fig 5) (Minami et al., 2004). Calcineurin has been shown to be involved in skeletal myoblast hypertrophy. RCAN1 can prevent NFAT from translocating to the nucleus and binding to the GATA4 and MEF-2 promoters (Vega et al., 2002), thus preventing hypertrophy (Harris et al. 2005). According to our results, the increase of Rcan1 mRNA expression suggests that the $\lambda=780$ nm laser prevented skeletal muscle regeneration through the inhibition of Vegfa or thrombin-calcineurin-NF-ATc. Similarly, it is likely that the $\lambda=780$ nm laser exerted an inhibitor effect on angiogenesis as well. We therefore suggest that Vegfa may participate in the muscle regeneration process. In fact, vascular components, such as vessel-associated progenitors (mesoangioblasts) isolated from the dorsal aorta, have

been shown to have a myogenic potential and are capable of participating in muscle regeneration (Sampaolesi, 2003; Shi & Garry, 2006).

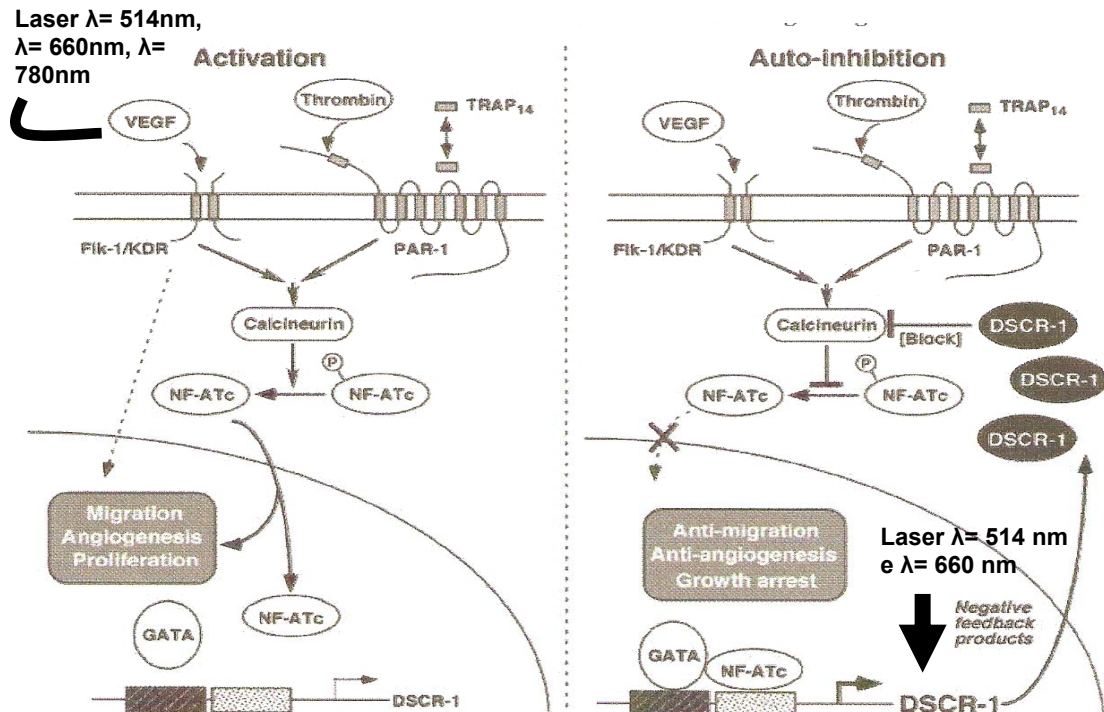


Figure 6 - Schematic model showing the VEGF or thrombin-calcineurin-NF-ATc signaling and the DSCR-1-mediated auto-inhibition system in endothelium. The action of low-intensity laser therapy in this model was included. Modified from Minami et al. (2004).

3. Gene expression of Ndufa1 mRNA

With regard to Ndufa1 mRNA expression, our results reveal that only the G1 and G4 groups exhibited an increase in the transcripts. However, comparing all the groups with the injury group, our results show that there was an increase in the transcripts in G1, G2, G3 e G4. There is a natural photosensitivity of various eukaryotes cells to low-intensity monochromatic light, suggesting that molecular mechanisms, such as the stimulation of photoceptors, are involved in cell photosensitivity. Isolated mitochondria have photosensitivity; the respiratory chain serve as the redox chain and NADH dhdg is part of a set of cytochromes. The different components of the respiratory chain absorb different wavelengths according to their respective spectrum absorption. Absorption bands of most components of the respiratory chain, such as flavoproteins and hemoproteins, are in the blue (400-450nm) part of spectrum. Cytochromes absorb in the green region; in the red region (about 630 nm), they are absorbed by semiquinone forms of flavo-proteins as well as terminal -cytochrome d oxidase (Karu, 1988).

Studies with yeast culture have shown a correlation between respiration intensity, an increase in NADH dhdg activity, increase in biomass accumulation and the action of $\lambda = 632.8\text{nm}$ laser (Karu, 1988; Karu et al., 1995); as well as an increase in NADH dhdg activity and increase in ATP synthesis (Passarella et al., 1984; Weiss and Oron, 1992).

ATP production by mitochondria could regulate the execution of a number of regulatory and biosynthetic events involved in myogenesis (Dunguez et al., 2002) with a likely increase in NADH dehydrogenase activity. Respiration-deficient myoblasts devoid of mitochondrial DNA fail to differentiate (Herzberg et al., 1993; Dunguez et al., 2002). Inhibition of mitochondrial protein synthesis prevents the differentiation of myoblasts into myotubes (Hamaï et al., 1997; Dunguez et al., 2002).

The rate of DNA and RNA synthesis increases after laser biostimulation (Karu, 1988; Karu, 1987; Vacca et al., 1993). On the other hand, when the dose is increased, the photoreceptors are damaged and this effect decreases. A further increase in energy causes destruction of the photoreceptors, which occurs through cell inhibition and death. The irradiation of cells with visible and/or near infrared light leading to absorption by these same molecules can promote a positive effect (acceleration of cell division metabolism), and, at high doses, there occurs photodynamic damage (Karu, 1988). Nevertheless, the biological process could respond differently to low-energy laser if different wavelengths, power, and frequencies are used (Belkin et al., 1988; Bibikova and Oron, 1994).

Based on these data and our results, we suggest that the 514 nm and $\lambda=660$ nm laser stimulated the cytochrome Ndufa1 in a specific way and altered the cell redox state with this specific dose and wavelength. The $\lambda=780$ nm infrared laser was not specific enough to stimulate cytochrome Ndufa1 in the respiratory chain. These data are in agreement with the literature affirming that the cytochromes have an absorption spectrum very similar to that of porphyrins, but one of the cytochrome oxidases has very weak absorption bands at $\lambda=780$ nm (Lubart et al., 1992). For example, Grossman et al. (1998) found that enzymatic and non-enzymatic antioxidants suppressed by $\lambda=780$ nm and He-Ne laser stimulates proliferation.

The $\lambda=514$ nm laser wavelength likely altered the redox state in both healthy and injured tissues, thereby increasing the mRNA Ndufa1 transcripts. The muscle regeneration process requires energy expenditure in the proliferation phase and in order to initiate the differentiation phase (Dunguez et al., 2002). Skeletal muscle regeneration, which recapitulates embryonic myogenesis, can stimulate mitochondrial biogenesis and this indicates that skeletal muscle regeneration is accompanied by a dramatic stimulation of the respiratory chain concomitant with the onset of muscle differentiation. The progression of myogenesis is also associated with the onset of muscle-specific protein expression, which demands energy expenditures as well. Thus, we may conclude that the $\lambda=660$ nm and $\lambda=514$ nm lasers were efficient in stimulating the proliferation phase of muscle regenerations due to their effects on the expression of mRNA Ndufa1

We can therefore conclude that the $\lambda=660$ nm laser was efficient in establishing stimulation in proliferation phase of muscle regeneration, whereas the $\lambda=514$ nm laser may be important to exerting its effect in the differentiation phase of muscle regeneration because of its effect on Ndufa1 mRNA expression present in healthy muscle, but absent in the proliferation phase of muscle regeneration. In this case, the effect of this laser was likely interrupted because of the interruption of the treatment on Day 5.

4. Gene expression of Pdgfc mRNA

With regard to Pdgfc, the PDGF family consists of 4 members: PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-CC and PDGF-DD (Li et al. 2000; LaRochelle, et al., 2001; LI et al., 2005). As these growth factors are potent mitogenic activators for a large number of different

cells, we supposed that they were also likely to be involved in the activation of the regeneration of the injured muscle cells (Best et al., 2001; Chargé et al., 2004; Järvinen et al., 2005). *In vivo*, both PDGF-AA and BB stimulated microvessel growth. PDGF-CC has been studied only to a limited extent (Li et al., 2005). One study found that PDGF-CC induced the release of VEGF (Li et al., 2003; Li et al., 2005) and induced angiogenesis (Li et al., 2005). Treatment with PDGF-CC was found to increase both the formation and maturation of new blood vessels and enhance skeletal muscle regeneration; as a result, also reduced the extent of ischemic muscle necrosis, which suggests that muscle regeneration and angiogenesis may be linked (Li et al., 2005). However, it remains unknown whether PDGF-CC is capable of affecting skeletal muscle regeneration directly.

PDGF has been indicated as an important mediator of injury healing and tissue repair (Ross et al., 1986; Reuveni et al., 1990), but its role in skeletal muscle regeneration has not been fully investigated. One study with the C2 myogenic line derived from adult mouse skeletal muscle demonstrated that these myoblasts express receptors for PDGF and that PDGF exert a mitogenic effect on these cells. Of the three known PDGF dimmers, the BB isoform has the greatest number of binding sites on the C2 myoblasts and is the most potent in promoting H-TdR incorporation and reducing the frequency of terminally differentiated myoblasts. Although PDGF-AA can bind to the cells, the number of binding sites is much lower than that of PDGF-BB and no mitogenic effect has been demonstrated. PDGF-AB binds to the C2 cells at a level similar to that of PDGF-AA and exerts a very slight mitogenic effect on the cells (Reuveni et al., 1990). Bischoff (1986) found that PDGF did not activate the proliferation of quiescent satellite cells.

A persistent question in muscle biology concerns the mechanism by which sarcomere addition and deletion occurs (Epstein and Fischman, 1991; Tidball and Spencer, 1993). Previous studies have shown that these processes occur primarily at the ends of myofibrils, where myotendinous junctions (MTJs) are located (Goldspink, 1980). Tidball and Spencer (1993) found a high concentration of PDGF-receptors at the MTJs of fully differentiated muscle fibers, suggesting that PDGF participates in the addition of sarcomere during muscle differentiation. Another study using the C2 myogenic line found that PDGF can regulate myoblast proliferation and differentiation *in vitro*, exerting a role in increasing the number of myoblasts during skeletal muscle regeneration by stimulating proliferation and/or inhibiting differentiation, but this study was conducted using the PDGF-AA and PDGF-BB family.

According to our results, Pdgf-c did not express its mRNA transcripts during the proliferation phase of skeletal muscle regeneration. Although PDGF-CC stimulates angiogenesis by the strict cooperation with VEGF (Li et al., 2005), we cannot explain why Vegfa expressed its mRNA transcript during skeletal muscle regeneration and Pdgf-c did not in our study.

5. Gene expression of Ppib mRNA

With regard to Ppib as housekeeping control for the genes investigated in this study, there was a large difference in the mRNA transcripts between the genes analyzed. There was no uniformity in gene expression of the transcripts for cyclophilin-B in all tests. We can suppose that the difference between the Ppib housekeeping gene expression as a control of Vegfa, Rcan1, pdgfc and Ndufa1 was due the difference in the variability of gene expression between animal muscles. We conclude that cyclophilin-B

(Ppib) is not an appropriate housekeeping gene for skeletal muscle, as it is a cell matrix protein (Lin and Hsu, 2005) and makes up part of the muscle homeostasis pathway (Mitchell et al., 2002; Sakuma et al., 2003).

6. Gene expression of b- actin mRNA

In regard to b-actin mRNA, we evidenced higher expression than Pdgfc mRNA, although there was no significant difference when compared the control group. Based on the values expressed in Table 1, we can conclude that b-actin was highly sensitive to laser treatment. Therefore, b-actin does not represent an appropriate housekeeping gene for analyzing the gene expression of skeletal muscle.

CONCLUSIONS

The present study suggests that laser irradiation influences Vegfa, Rcan1, Pdgfc and Ndufa1 gene expression during skeletal muscle regeneration *in vivo*.

Laser therapy can exert an influence over Vegfa expression and, consequently, angiogenesis during skeletal muscle regeneration.

$\lambda=780\text{nm}$ laser therapy can prevent skeletal muscle regeneration by increasing the RCAN1 gene expression and, consequently, inhibiting Vegfa or thrombin-calcineurin-NF-ATc.

$\lambda=660\text{nm}$ laser therapy specifically stimulated the cytochrome Ndufa1 in mouse) and altered the state redox cell. $\lambda=780\text{nm}$ laser was not specific enough to stimulate cytochrome Ndufa1. The $\lambda=514\text{nm}$ laser altered the cellular redox state in healthy tissue. It is likely that the $\lambda=514\text{nm}$ laser exerts its effect in the differentiation phase of skeletal muscle regeneration.

Pdgfc did not express during the proliferation phase of skeletal muscle regeneration, probably for being be a strict gene of the angiogenesis pathway in cooperation with Vegfa.

Cyclophilin-B and b-actin are not appropriate housekeeping genes for analyzing the gene expression of skeletal muscle.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Brazilian financing agencies CNPq and Fapesp.

REFERENCES

1. Arsic, N.; Zacchigna, S.; Zentilin, L.; Ramirez-Correa, G.; Pattarini, L.; Salvi, A.; Sinagra, G.; Giacca, M. vascular endothelial factor stimulates skeletal muscle regeneration *in vivo*. *Molecular Therapy*. 10(5):844-854, 2004.

2. Banai, S.; Shweiki, D.; Pinson, A.; Chandra, M. Lazarovici, G.; Keshet, E. Up-regulation of vascular endothelial growth factor expression induced by myocardial ischaemia: implications for coronary angiogenesis. *Cardiovascular Research*. 28: 1176-1179, 1994.
3. Bassel-Duby, R.; Olson, R. N. Signaling Pathways in Skeletal Muscle Remodeling. *Annual Review of Biochemistry*. 75: 19-37, 2006.
4. Beckerman, H.; de Bie, R. A.; Bouter, L. M.; De Cuyper, H. J.; Oostendorp, R. A. B. The efficacy of laser therapy for musculoskeletal and skin disorders: a criteria-based meta-analysis of randomized clinical trials. *Physical Therapy*. 72:483-491, 1992.
5. Belkin, M.; Zaturunsky, B.; Schwartz, M. A critical review of low energy laser bioeffects. *Lasers and Light in Ophthalmology*. 2: 63-71, 1988.
6. Best, T. M.; Shehadeh, S. E. Leverson, G.; Michel, J. T. Corr, D. T.; Aeschlimann, D. Analysis of changes in RNA levels of myoblasts and fibroblast-derived gene products in healing skeletal muscle using quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. *J. Orthop Res*. 19: 565-572, 2001.
7. Bibikova, A.; Oron, U. Attenuation of the process of muscle regeneration in the toad gastrocnemius muscle by low energy laser irradiation, *Lasers in Surgery and Medicine* 14:355-361, 1994.
8. Bischoff, R. Proliferation of muscle satellite cells on intact myofibers in culture. *Developmental Biology*. 115:129-139, 1986.
9. Burkin, D. J.; Kaufman, S. J. The $\alpha 7\beta 1$ integrin in muscle development and disease. *Cell and Tissue Research*. 296:183-190, 1999.
10. Carlson, B. M. The regeneration of skeletal muscle. *American Journal of Anatomy*. 137: 119-149, 1973.
11. Carlson, B. M; Faulkner, J. A. The regeneration of skeletal muscle fibers following injury: review. *Medicine & Science in Sports & Exercise*. 15: 187-198, 1983.

12. Chargé, S. B. P.; Rudnicki, M. A. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *American Physiological Society*. 84:209-238, 2004.
13. Duguez, S.; Féasson, L.; Denis, C.; Freyssenet, D. Mitochondrial biogenesis during skeletal muscle regeneration. *AJP- Endocrinology and Metabolism*. 282: 802-809, 2002.
14. Epstein, H. F.; Fischman, D. A. Molecular analysis of protein assembly in muscle development. *Science*. 251:1039-1044, 1991.
15. Germani, A; Di Carlo, A.; Mangoni, A.; Straino, S.; Giacinti, C.; Turrini, P.; Biblioli, P.; Capogrossi, M.C. Vascular endothelial growth factor modulates skeletal muscle regeneration function. *American Journal of Pathology*.(163):1417-1428, 2003.
16. Goldspink, D. Physiological factors influencing protein turnover and muscle growth in mammals. In *Development and Specialization of muscle*. D. Goldspink, editor. Cambridge University Press. Cambridge. 65-89, 1980.
17. Grossman, N.; Schneid, N.; Reuveni, H. Enhanced proliferation of keratinocyte cultures following 780nm low-power diode laser irradiation. Involvement of reactive oxygen species. *Lasers in Surgery and Medicine*. 22:212-218, 1998.
18. Hamaï, N.; Nakumura, M.; Asano, A. Inhibition of mitochondrial protein synthesis impaired C₂ C₁₂ myoblast differentiation. *Cell Struct Funct*. 22: 421-431, 1997.
19. Harris, C. D.; Ermak, G.; Davis, J. A. Multiple roles of the DSCR1 (Adapt78 or RCAN1) gene and its protein product calcipressin 1 (or RCAN1) in disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 62: 2477-2486, 2005.
20. Hattori, M.; Fujiyama, A.; Taylor, T. D.; Watanabe, H.; Yada, T.; Park, H. S. et al. The DNA sequence of human chromosome 21. *Genomics*. 405: 311-319, 2000.

21. Heldin, C.;-H.; Westermark, B. Platelet-derived growth factor: a family of isoforms that bind to two distinct receptors. *British Medical Bulletin* 45: 453-464, 1989.
22. Järvinen, T. A. H.; Järvinen, T. L. N.; Kääriäinen, M.; Kalimo, H.; Järvinen, M. Muscle injuries – Biology and Treatment. *The American Journal of Sports Medicine*. 33(5):745-764, 2005.
23. Karu, T.; Pyatibrat, L.; Kalendo, G. Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated in vitro. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 27:219-223, 1995.
- Karu, T. I. Photobiological fundamentals of low-power laser therapy. *Journal of Quantum Electronics*. 23:1703-1717, 1987.
24. Karu, T. Molecular mechanism of the therapeutic effect of low-intensity laser radiation. *Lasers and Life Science*. 2(1): 53-74, 1988.
25. Kim, K. I. et al. β -Catenin overexpression augments angiogenesis and skeletal muscle regeneration through dual mechanism of vascular endothelial growth factor-mediated endothelial cell proliferation and progenitor cell mobilization. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 26: 1-8, 2006.
26. Klee, C. B.; Ren, H.; Wang, X. Regulation of the calmodulin stimulated protein phosphatase, calcineurin. *Journal of Biological Chemistry*. 273: 133367-133370, 1998.
27. LaRochelle, W.J. et al. PDGF-D, a new protease-activated growth factor *Nature Cell Biology*. 3:517-521, 2001.
28. Li, X. et al. PDGF-C is a new protease-activated ligand for PDGF alpha-receptor. *Nature Cell Biology*. 2:302-309, 2000.
29. Li, H.; Fredriksson, L.; Li, X.; Eriksson, U. PDGF-D is a potent transforming and angiogenic growth factor. *Oncogene*. 22: 1501-1510, 2003.

30. Li, X. et al. Revascularization of ischemic tissues by PDGF-CC via Effects on endothelial cells and their progenitors. *The Journal of Clinical Investigation*. 115(1): 118-127, 2005.
31. Lin, C. S.; Hsu, C. W. Differentially transcribed genes in skeletal muscle of Duroc and Taoyuan pigs. *Journal of Animal Science*. 83:2075-2086, 2005.
32. Lizuka, M.; Abe, M.; Shiiba, K.; Sasaki, Y. S. Down syndrome candidate region 1, a downstream target of VEGF, participates in endothelial cell migration and angiogenesis. *Journal of Vascular Research*. 41:334-344, 2004.
33. Lubart, R.; Wollman, Y.; Friedmann, H.; Rochkind, S.; Laulicht, I. Effects of visible and near-infrared lasers on cell cultures. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 12:305-310, 1992.
34. Maegawa, Y.; Itoh, T.; Hosokawa, T.; Yasgashi, K.; Nishi, M. Effects of near-infrared low-level laser irradiation on microcirculation. *Lasers in Surgery and Medicine*. 27:427-437 2000.
35. Mauro, A. *Muscle regeneration*. Raven Press, New York. 560 pp. 1979.
36. Milkiewicz, M.; Brown, M. D.; Egginton, S.; Hudlicka, O. Association between shear stress, angiogenesis, and VEGF in skeletal muscle in vivo. *Microcirculation*. 8:229-241, 2001.
37. Milkiewicz, M.; Pugh, C. W.; Egginton, S. Inhibition of endogenous HIF inactivation induces angiogenesis in ischaemic skeletal muscles of mice. *The Journal of Physiology*. 560: 21-26, 2004.
38. Minami, T. et al. Vascular endothelial growth factor- and thrombin-induced termination factor, down syndrome critical region-1, attenuates endothelial cell proliferation and angiogenesis. *The American Society for biochemistry and Molecular Biology*. 50537-50554, 2004.
39. Mitchell, P. O.; Mills, S. T.; Pavlath, G. K. Calcineurin differentially regulates maintenance and growth of phenotypically distinct muscle. *AJP–Cell Physiology*. 282:984-992, 2002.

40. Musaro, A.; McCullagh, K. J.; Naya, F. J.; Olson, E. N. Rosenthal, N. IGF-1 induces skeletal myocytes hypertrophy through calcineurin in association with GATA-2 and NF-ATc1. *Nature*. 400:581-585, 1999.
41. Oliveira, N. M. L.; Parizotto, N. A.; Salvini, T. F. S. GaAs (904-Nm) laser radiation does not affect muscle regeneration in mouse skeletal muscle. *Lasers in Surgery and Medicine*. 25: 13-21, 1999.
42. Passarella, S.; Casamassima, E.; Molinari, S.; Pastore, D.; Quagliariello, E.; Catalano, I. M.; Cingolani, A. Increase of proton electrochemical potential and ATP synthesis in rat liver mitochondria irradiated in vitro by Helion-Neon laser. *FEBS Letters*. 175:95-99, 1984.
43. Reuveni, Z. Y.; Balestreri, T. M. Bowen-Pope, D. F. Regulation of proliferation and differentiation of myoblasts derived from adult mouse skeletal muscle by isoforms of PDGF. *The Journal of Cell Biology*. 111: 1623-1629, 1990.
44. Rissanem, T. T. et al. Expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor-2 (KDR/Flk-1) in ischemic skeletal muscle and its regeneration. *American Journal of Pathology*. 160: 1393-1403, 2002.
45. Ross, R.; Raines, E. W.; Bowen-Pope, D. F. The biology of platelet-derived growth factor. *Cell*. 46: 155-169. 1986.
46. Sakuma, K.; Nishikawa, J.; Nakao, R.; Watanabe, K.; Totsuka, T.; Nakano, H.; Sano, M.; Yasuhara, M. Calcineurin is a potent regulator for skeletal muscle regeneration by association with NFATc1 and GATA-2. *Acta Neuropathologica*. 105:271-280, 2003.
47. Sampaolesi, M. et al. Cell therapy of α -sarcoglycan null dystrophic mice through intra-arterial delivery of mesoangioblasts. *Science* 301: 487-492, 2003.
48. Shefer, G.; Partridge, T. A.; Heslop, L.; Gross, J. G.; Oron, U.; Halevy, O. Low-energy laser irradiation promotes the survival and cell cycle entry of skeletal muscle satellite cells. *Journal of Cell Science*. 115:1461-1469, 2002.

49. Shi, X.; Garry, D. J. Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. *Genes & Development*. 20:1692-1708, 2006.
50. Shweiki, D.; Ltin, A.; Soffer, D.; Keshner, E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia initiated angiogenesis. *Nature*, 359:843-845, 1992.
51. Stefano S.; Sandri,M.; Murgia, M. Activity-Dependent Signaling Pathways Controlling Muscle Diversity and Plasticity. *Physiology*. 22: 269-278, 2007.
52. Tidball, J. G.; Spencer, M. J. PDGF stimulation induces phosphorylation of talin and cytoskeletal reorganization in skeletal muscle. *The Journal of Cell Biology*. 123:(3)27-635, 1993.
53. Tuomisto, T. T.; Rissanem, T. T.; Vajanto, I.; Korkeela, A.; Rutanen, J.; Yla-Herttuala, S. HIF-VEGF-VEGD-2, TNF-alpha and IGF pathways are upregulated in critical human skeletal muscle ischaemia as studied with DNA array. *Atherosclerosis*. 174: 111-120, 2004.
54. Vacca, R. A.; Marra, E.; Quagliariello, E.; Grego, M. Activation of mitochondrial DNA replication by He-Ne laser Irradiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 195 (2):704-109, 1993.
55. Vega, R. B. Yang, J.; Rothermel, B. A.; Bassel-Duby, R.; Williams R. S. Multiple domains of MCIPI contribute to inhibition of calcineurin activity. *Journal of Biological Chemistry*. 277: 30401-30407, 2002.
56. Wagatsuma, A.; Tamaki, H.; Ogitta, F. Sequential expression of vascular endothelial growth factor, Flt-1 and KDR/Flk-1 in regenerating mouse skeletal muscle. *Physiological Research*. 55: 633-640, 2006.
57. Wagatsuma, A. Endogenous expression of angiogenesis-related factors in response to muscle injury. *Moleccular and Cellular Biochemistry- Biochemistry*. 298: 151-159, 2007.
58. Wang, Y.; De Keulenaer, G. W.; Weinberg, E. O.; Muangman, S.; Gualberto, A.; Landschulz, K. T.; Turi, T. G.; Thompson, J. F.; Lee, R. T. Direct

biomechanical induction of endogenous calcineurin inhibitor Down syndrome critical Region-1 in cardiac myocytes. *AJP-Heart and Circulatory Physiology*. 283:533-539, 2002.

59. Weiss, N.; Oron, U. Enhancement of muscle regeneration in the rat gastrocnemius muscle by low energy laser irradiation. *Anatomy and Embriology*. 186:497-503, 1992.

60. Wilden, L.; Karthein, R. Import of radiation phenomena of electron and therapeutic low-level laser in regard to the mitochondrial energy. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*. 159-165, 1998.

FIGURAS

1. Modelo de animal utilizado durante o procedimento experimental:



Camundongo *Mus músculo*

2. Área correspondente ao local da lesão muscular no TAD



3. Laser $\lambda=660$ nm e $\lambda=780$ nm, TWIN - MM OPTICS



4. Laser de Argônio $\lambda=514\text{nm}$ (Nereid Light Phototherapy System, Healthtech, Shanghai, China)



5. Procedimento adotado para irradiação dos animais com o laser de argônio.



6. Procedimento de Criolesão

