

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

LÍVIA RIBEIRO DE ASSIS

**LASER DE BAIXA INTENSIDADE (830nm) NA
REGENERAÇÃO DO MÚSCULO TIBIAL ANTERIOR EM
RATOS**

SÃO CARLOS- SP
2008

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

LÍVIA RIBEIRO DE ASSIS

**“LASER DE BAIXA INTENSIDADE (830nm) NA
REGENERAÇÃO DO MÚSCULO TIBIAL ANTERIOR EM
RATOS”**

Dissertação de Mestrado apresentada à
Coordenação do programa de Pós-Graduação
em Fisioterapia da Universidade Federal de
São Carlos - PPG/UFSCar como parte dos
requisitos para obtenção do título de Mestre
em Fisioterapia.

Orientador: Prof. Dr. Nivaldo Antônio Parizotto

Apoio financeiro: CAPES

São Carlos
2008

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

A848Lb

Assis, Livia Ribeiro de.

Laser de baixa intensidade (830nm) na regeneração do músculo tibial anterior em ratos / Livia Ribeiro de Assis. -- São Carlos : UFSCar, 2008.

46 f.


Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2008.

1. Fisioterapia. 2. Laser de baixa intensidade. 3. Regeneração muscular. 4. Metaloproteinase (MMP-2). 5. Óxido nítrico. 6. Ciclooxigenase (COX-2). I. Título.


CDD: 615.82 (20^a)

**MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA PARA DEFESA DE
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE LIVIA RIBEIRO DE ASSIS ,
DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 27 DE FEVEREIRO DE 2008.**

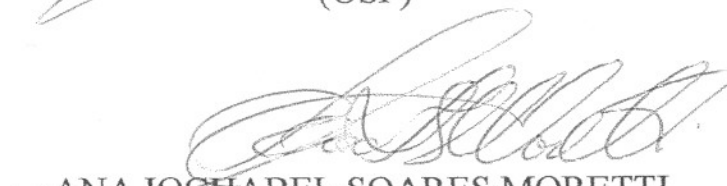
BANCA EXAMINADORA:



**NIVALDO ANTONIO PARIZOTTO
(UFSCar)**



**RODRIGO ÁLVARO B. LOPES MARTINS
(USP)**



**ANA IOCHABEL SOARES MORETTI
(USP)**

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho...

... à minha mãe Maria Aparecida Buck de Assis, pelo eterno amor e dedicação incondicionais e exemplo de garra, perseverança e humanidade...

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

.... meus “tios- avós”, José Urbinatti (*in memoriam*), Flora Buck Urbinatti- por tudo que fizeram e que fazem por mim - sem vcs eu não seria quem sou hoje...

... ao Thiago por estar sempre presente na minha vida e por me dar forças e compartilhar de todos meus sonhos e realizações...

AGRADECIMENTO ESPECIAL

... à Deus...

... ao meu orientador Prof. Dr. Nivaldo Antônio Parizotto, por sua orientação e dedicação. Sua competência e seriedade científica foram fundamentais para o processo que culminou a elaboração desta dissertação. Ademais, no curso do trabalho, pude cultivar, além de seus pertinentes ensinamentos, também sua sincera amizade ...

... ao Prof. Dr. Heraldo Possolo, o qual me recebeu em seu laboratório e disponibilizou-me a estrutura necessária para que experimentos fundamentais desta dissertação pudessem ser realizados. Agradeço também à sua valiosa equipe de trabalho, a qual me acolheu com maior carinho e dedicação...

... à Prof Dr Tânia de Fátima Salvini, por me ceder o espaço do seu laboratório e pelas orientações...

... aos Professores: Prof Dr. Rodrigo Alvaro B. Lopes e Prof Dra. Ana Iochabel Soares Moretti pelo aceite do convite como membros de minha banca. As preciosas sugestões propostas serão com certeza de grande valia para a execução final deste trabalho...

AGRADECIMENTOS

...ao amigos do Laboratório de Plasticidade Muscular, Sabrina Peviani, Thiago Russo, João Durigan , Gabriel e Teresa pela paciência, dedicação, auxílio e exemplo de trabalho...

...às amigas Davilene Gigo Benato, Natália Rodrigues e Olga Sueli, pelo apoio e carinho eterno... adoro vcs....

... aos companheiros de laboratório: Paulo, Renan, Emiliano, Marco, Poliana, Jaqueline, Wouber, Charles, Viviam, Carol...

... à minha família materna e paterna.... obrigada por tudo que proporcionaram em minha vida...amo vcs...

... aos amigos Emanueli, Marcos, Paty, Rejean, Telma, Amaral, Smooth, Janaina e Luís Arnaldo, pelos momentos de descontração (TUDO DE BOM) que passamos juntos...

... aos meus sogros e sogras rrsr... não assustem...mas tenho 4 pessoas maravilhosas em minha vida... Mauro & Sandrina e Godoy & Sueli

...enfim, agradeço a TODOS que me ajudaram diretamente ou indiretamente neste trabalho...

“ Pensamentos valem e vivem pela observação exata ou nova,
pela reflexão aguda ou profunda;
não menos querem a originalidade,
a simplicidade e a graça do dizer”

(Machado de Assis)

Esta dissertação foi estruturada em modelo de artigo, redigida com base nas normas metodológicas da *ABNT* e foi dividida em 3 partes.

A parte I contém uma breve exposição do problema, justificado a importância do estudo proposto.

A parte II compreende o artigo elaborado intitulado: “ Efeito do Laser de baixa intensidade (830nm) na regeneração do músculo tibial anterior em ratos”.

A parte III constitui-se das considerações finais e a bibliografia utilizada.

LISTA DE ABREVIATURAS

TLBI- Terapia Laser de baixa intensidade;

λ – Comprimento de onda;

NOx⁻ - Nitrato/ Nitrito;

COX-2- Ciclooxigenase – 2;

MMPs- Metaloproteinases;

TAD- Tibial anterior direito;

4J- Grupo apenas irradiado com laser $\lambda= 830\text{nm}$ e dose de $4\text{J}/\text{cm}^2$;

8J- Grupo apenas irradiado com laser $\lambda= 830\text{nm}$ e dose de $8\text{J}/\text{cm}^2$;

16J- Grupo apenas irradiado com laser $\lambda= 830\text{nm}$ e dose de $16\text{J}/\text{cm}^2$;

C- Grupo Controle;

CL-Grupo Controle Lesão;

L4J- Grupo criolesado e tratado com laser $\lambda= 830\text{nm}$ e dose de $4\text{J}/\text{cm}^2$;

L8J- Grupo criolesado e tratado com laser $\lambda= 830\text{nm}$ e dose de $8\text{J}/\text{cm}^2$;

L16J- Grupo criolesado e tratado com laser $\lambda= 830\text{nm}$ e dose de $16\text{J}/\text{cm}^2$;

TB- Coloração de Azul de Toluidina;

FA- Coloração de Fosfatase Acida;

ERO- Espécies Reativas de Oxigênio;

ERN- Espécies Reativas de Nitrogênio;

NO- Óxido Nítrico;

iNOS- Óxido Nítrico Sintase Induzida;

Ca²⁺- Cálcio;

Zn²⁺- Zinco;

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Esquema ilustrativo da aplicação da radiação laser.

Figura 2- Esquema ilustrativo da criolesão no ventre no TAD.

Figura 3- Secções transversais seriadas da região média do TAD: **A)** Coloração de Azul de Toluidina; **B)** Colocação de Fosfatase Ácida.

Figura 4 - Área total e área de lesão.

Figura 5 - Níveis plasmáticos de nitrato e nitrito.

Figura 6 - Biotin switch - COX-2 ativa (S-nitrosada) nos grupos CL e L4J.

Figura 7 - Gel de Zimografia mostrando as bandas pró MMP-2 e Ativa MMP-2.

Figura 8 - Atividade da Pró/MMP-2 (A) Ativa/MMP-2 (B).

Figura 9 - Western Blotting mostrando a expressão da MMP-2.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

PARTE I	1
1 Justificativa.....	2
PARTE II	5
2 Artigo.....	6
2.1 Introdução.....	8
2.2 Objetivo.....	11
2.3 Materiais e Métodos.....	12
2.3.1 Animais de Experimentação.....	12
2.3.2 Delineamento Experimental.....	12
2.3.3 Criolesão.....	14
2.3.4 Equipamento Emissor da Radiação Laser.....	15
2.3.5 Dosagem dos Níveis Plasmáticos de Nitrito/Nitrato (NO _x -).....	16
2.3.6 Retirada e armazenamento dos músculos.....	16
2.3.7 Análise Morfológica e Morfométrica	17
2.3.8 Nitrosilação de COX-2 por biotin switch	17
2.3.9 Zimografia	18
2.3.10 Western Blotting-Expressão de COX- 2.....	19
2.3.11 Análise Estatística.....	20
2.4 Resultados.....	21
2.4.1 Análises Morfológicas.....	21
2.4.2 Morfometria da Lesão.....	23
2.4.3 Níveis Plasmáticos de Nitrito/Nitrato (NO _x -).....	23
2.4.4 COX-2 nitrosilada.....	24
2.4.5 Análise de Zimografia.....	25
2.4.6 Expressão de MMP-2.....	27
2.5 Discussão.....	28

PARTE III	34
Considerações finais.....	35
Referências Bibliográficas.....	36

PARTE I

1- INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

As lesões musculares são bastante comuns para profissionais da saúde que trabalham com traumatologia. Estas lesões são representativas na prática esportiva, caracterizando 10 a 55% de todas as lesões de eventos esportivos (JÄRVINEN et al., 1993, GARRET, 1996), o que causa, na maioria das vezes dor, edema, diminuição da amplitude de movimento perda de massa muscular, força e resistência a fadiga. A alta incidência e prevalência das lesões fazem com que os conhecimentos devam sempre estar atualizados com relação aos tratamentos, já que a a lesão do tecido musculoesquelético pode ser debilitante, gerando um grande impacto na qualidade de vida dos pacientes além que ocasionar inúmeros problemas sócio- econômico. Diante disso, diversos pesquisadores têm procurado compreender como se dá o processo de regeneração das fibras musculares, através da utilização de alguns métodos de indução de lesão, tais como, a contusão (MINAMOTO; BUNHO; SALVINI, 2001), eletroestimulação (HILL; WERNIG; GOLDSPINK, 2003), exercícios físicos (SERRÃO et al., 2003), injeções de miotoxinas (HILL; WERNIG; GOLDSPINK, 2003), criolesão (AMARAL et al., 2001), desnervação (JAKUBIEC-PUKA et al., 1999), e assim desenvolver meios que possam interferir positivamente nesta cadeia de eventos para uma recuperação mais rápida e eficaz do indivíduo acometido.

Os principais objetivos terapêuticos na reabilitação das lesões musculares são reduzir o processo inflamatório e estimular o processo de regeneração tecidual. Para atingir tal finalidade, é proposto à utilização de recursos terapêuticos capazes de interagir com as células responsáveis pelo processo de reparo tecidual e estimular sua funcionalidade, fazendo com que o processo de reparo ocorra em menor tempo e/ou apresente um padrão qualitativamente superior.

Contudo, pouco se conhece sobre as particularidades das modalidades terapêuticas abordadas no processo de regeneração musculoesquelética, como crioterapia (SALVINI et al., 1997), ultra-som (RANTANEN et al., 1999; WILKIN et al., 2004), laser (OLIVEIRA; PARIZZOTO; SALVINI, 1999), antiinflamatórios (LAPOINTE; FRÉMONT; CÔTÉ, 2003), mobilização e imobilização (JARVINEN et al., 2000; VENOJARVI et al., 2004).

A terapia laser de baixa intensidade (TLBI) vem sendo atualmente, uma das modalidades bioestimulantes mais utilizadas na reabilitação músculo esquelética. Entretanto, seus parâmetros de utilização são controversos. Os resultados conflitantes sobre o uso da laserterapia podem ser resultantes de inúmeras variáveis técnicas (em particular os parâmetros de irradiação) os quais se não forem adequadamente ajustados poderão reduzir o eventual sucesso do procedimento terapêutico (GIGOBENATO, GEUNA & ROCHKIND, 2005). Acredita-se que exista uma “janela terapêutica” para uma fotoestimulação efetiva acima de um valor limiar, porém abaixo de um valor que ocasione fotoinibição (ORTIZ et al., 2001). Seguindo a necessidade de estabelecer protocolos clínicos de aplicação da laserterapia ainda não testados, esse trabalho teve a intenção de aprofundar a análise dessa radiação sobre o processo de regeneração muscular, focalizando especial atenção na escolha das fluências da TLBI as quais são aspectos relevantes para a resposta tecidual.

Um crescente número de dados sugere que a TLBI possa mediar respostas celulares complexas sobre o tecido lesado (ORTIZ et al., 2003). Resultados positivos são encontrados em processos envolvidos com a regeneração muscular, como neoangiogêneses (MAEGAWA et al., 2000), atividade de fibroblastos (FEIST et al., 2003), concentrações de radicais livres e citocinas, produção de superóxido-dismutase (KARU et al., 1993; VLADIMIROV et al., 2004). Contudo, os possíveis mecanismos e as possíveis

vias na qual o laser poderia modular o processo de regeneração muscular ainda não são bem evidenciados.

Utilizando um modelo de lesão muscular por congelamento (criolesão) e realizando um tratamento de 5 dias consecutivos, estudamos os efeitos da TLBI nas alterações musculares decorrentes de análises histológicas da lesão muscular, atividade e expressão protéica de MMP-2, NOx⁻ circulantes e atividade de COX-2.

Acreditamos que os resultados deste estudo proporcionarão uma importante contribuição para a compreensão dos efeitos do laser de baixa intensidade no processo de regeneração do músculo esquelético, contribuindo para a recuperação mais rápida e efetiva do músculo.

PARTE II

2 - ARTIGO

**EFEITO DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE (830nm) NA
REGENERAÇÃO DO MÚSCULO TIBIAL ANTERIOR EM RATOS**

RESUMO

As lesões musculares são bastante comuns na prática esportiva e na reabilitação ortopédica. A terapia laser de baixa intensidade (TLBI) apresenta bons resultados no tratamento de diferentes afecções que acometem o tecido muscular esquelético, entretanto a fluência utilizada neste tratamento ainda é controversa. Este estudo tem como objetivo verificar os efeitos de diferentes fluências do laser de $\lambda = 830\text{nm}$ no processo de regeneração muscular. Foram utilizados ratos machos Wistar, distribuídos em 8 grupos de 7 animais cada: grupo controle (C); grupos em que os músculos tibial anterior direito (TAD) foram apenas irradiados com laser diodo ($\lambda = 830\text{nm}$) com fluência de $4\text{J}/\text{cm}^2$ (4J), $8\text{J}/\text{cm}^2$ (8J) e $16\text{J}/\text{cm}^2$ (16J); grupo lesão (CL), no qual o músculo foi submetido à criolesão; grupos em que os músculos TAD foram submetidos à criolesão e tratados com laser diodo ($\lambda = 830\text{nm}$) com fluência de $4\text{J}/\text{cm}^2$ (L4J), $8\text{J}/\text{cm}^2$ (L8J), $16\text{J}/\text{cm}^2$ (L16J). A irradiação teve início 24 horas após a lesão por 5 dias consecutivos de forma pontual, sobre a área de lesão. No sexto dia após a lesão, os animais foram eutanaziados. O sangue foi coletado para avaliação dos níveis plasmáticos de NO_x^- , através da técnica de Griess. A avaliação muscular contou com análises histológicas da área de lesão (Hematoxilina e Eosina e Fosfatase Ácida). Além disso, a atividade da COX-2 foi analisada pelas técnicas de Biotin Switch e a atividade e expressão protéica de MMP-2 por técnica de Zimografia e Western Blotting, respectivamente. Os resultados mostraram que houve uma diminuição da área de lesão conforme aumento da fluência do laser ($8\text{J}/\text{cm}^2$ e $16\text{J}/\text{cm}^2$); um aumento nos níveis plasmáticos de NO_x^- em todos grupos lesados e uma diminuição apenas no grupo L16J em relação aos grupos lesados; a COX-2 foi ativada apenas nos grupos CL e L4J; a atividade da MMP-2 aumentou em todos grupos lesados e a expressão protéica aumentou nos grupos L8J e L16J. Conjuntamente os resultados permitem concluir que as fluências de $8\text{J}/\text{cm}^2$ e $16\text{J}/\text{cm}^2$ foram as que apresentaram um melhor desempenho na TLBI nos processos que envolvem regeneração do músculo esquelético de ratos. Este estudo trouxe dados importantes para o uso clínico, pois confrontou variáveis importantes como o comportamento de diferentes fluências no processo de regeneração muscular, proporcionando verificar um protocolo de aplicação mais seguro e eficaz.

Palavras chaves: Terapia Laser de Baixa Intensidade (TLBI); Regeneração Muscular; MMP-2; NO_x^- ; COX-2; Dose ideal

2.1 INTRODUÇÃO

A lesão muscular é freqüente dentro da prática desportiva e ambiente de trabalho o que causa, na maioria das vezes, dor e incapacidade, levando a um comprometimento tanto nas atividades ocupacionais quanto nas atividades de lazer (KIRKENDALL & GARETT, 2002). Estas lesões podem ocorrer por uma variedade de mecanismos (JARVINEN et al, 2000) originando-se de trauma direto (laceração e contusão) ou de traumas indiretos (isquemia, lesão nervosa periférica e tensão - estiramento).

Embora a literatura mostre uma determinada semelhança nas seqüências de reparo do processo de regeneração muscular, independente da natureza e do estímulo lesivo (SATO et al., 2003; BEST & HUNTER., 2000; HUARD et al., 2002), o tempo e a eficácia desse processo pode variar de acordo com alguns fatores, como: vascularização tecidual (BODINE-FOWLER, 1994; LEFAUCHER; SEBILLE, 1995); idade (HARRIDGE, 2003); sexo (GROUNDS, 1991); tipo de músculo submetido ao trauma (BASSAGLIA & GAUTRON, 1995). Desse modo, a tentativa de compreender o processo regenerativo do músculo é de grande relevância no contexto da medicina, fisioterapia e demais profissões que trabalham com a compreensão do movimento humano.

O complexo processo de cicatrização após lesão pode ser dividido em fases que incluem degeneração, inflamação, fibrose e/ou formação de cicatriz e fase de remodelamento. Durante a fase inflamatória, fatores como estímulo fagocítico leva à produção excessiva de radicais livres, espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN), com conseqüente depleção do sistema de defesa antioxidantes, conduzindo o tecido ao “estresse oxidativo” (DRÖGRE, 2002). Nos últimos anos, um número significativo de estudos evidenciaram que as espécies reativas (radicais livres, ERO e ERN) em baixas concentrações, exercem um papel importante na

homeostasia redox do músculo esquelético, encontram-se envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes (JACKSON et al, 2007; LECARPENTIER, 2005, REID, 2001; REID et al., 1993). Entretanto, situações com altas concentrações destas espécies podem danificar os constituintes vitais da célula, como lipídios, proteínas e DNA (HENSLEY et al., 2000), ativar alguns fatores de transcrição, aumentar a expressão da isoforma Óxido Nítrico Sintase Induzida (iNOS) elevando a síntese de óxido nítrico (NO) (GOMES et al., 2005; ADAMS et al., 2002). Os danos moleculares às estruturas celulares, com consequente alteração funcional e prejuízo das funções vitais podem representar um significativo papel em condições inflamatórias de muitas doenças (GILAD et al., 1998, DRÖGE, 2002).

Condições inflamatórias estimulam a produção de prostaglandinas que são importantes mediadores de uma variedade de processos fisiológicos e patológicas. Elas são sintetizadas por duas distintas isoformas, COX-1 e COX-2. A COX-1 é expressa em vários tipos de células regulando as funções fisiológicas normais, enquanto a COX-2 pode ser induzida na presença de citocinas pró- inflamatórias, fatores de crescimento, endotoxinas e expressa caracteristicamente por células envolvidas no processo inflamatório (VANE et al.,1998). Portanto, COX-2 e iNOS são consideradas potentes mediadores inflamatórios, visto que o aumento da expressão de iNOS e concomitante ao acúmulo de NO pode promover a S-nitrosilação de COX-2, ativando-a (KIM et al., 2005).

No remodelamento do tecido lesado, vários eventos são necessários para a ocorrência da degradação proteolítica dos componentes extracelulares, nos quais as metaloproteinases (MMPs) possuem um papel fundamental (VU & WERB, 2000; PAGE-Mc CAW et al., 2007). A família das MMPs é composta por mais de 20 membros

subdivididos em colagenases, estromelinas, gelatinases e metaloproteinase do tipo membrana (STAMENKOVIC, 2000). Estas proteases são Ca^{2+} e Zn^{2+} dependentes secretadas na forma de pro-enzimas, e sua expressão é altamente regulada por citocinas produzidas durante o remodelamento tecidual (BERNAL et al., 2005; KOSKINEN et al., 2001; PAGE Mac CAW et al., 2007; STEMLICHT et al., 2001; VERMA et al., 2006). Uma das mais importantes MMPs associadas com a função e disfunção do músculo esquelético parece ser a metaloproteinase de matriz tipo 2 (MMP-2), também conhecida como gelatinase A, ou colagenase tipo IV 72-KDa. A MMP-2 está ativada nos diversos tipos de eventos fisiológicos e patológicos como desenvolvimento, isquemia, angiogênese, lesão, atrofia, reparo ou miopatias (KOSKINEN et al., 2001; PAGE-MCCAW et al., 2007). Por regular a integridade e a composição da matriz extracelular do músculo esquelético, a MMP-2 exerce um papel essencial na proliferação e diferenciação de miofibras, cicatrização após lesão além da manutenção do tecido conectivo (CARMELI et al., 2004).

Visando o reparo tecidual do músculo esquelético é importante a utilização de modalidades terapêuticas eficientes que reduzam a resposta inflamatória aguda e acelerem as fases de reparação, de modo que a regeneração e a formação de ferida sejam realçadas, objetivando o restabelecimento da atividade funcional do paciente como um todo (FISHER et al., 2000). Dentre os recursos terapêuticos utilizados na reabilitação clínica de lesões músculo- esqueléticas, a terapia laser de baixa intensidade (TLBI) tem merecido destaque nos últimos anos. Estudos experimentais mostram que a TLBI devidamente aplicada apresenta efetividade no processo de regeneração muscular (MEDRADO et al., 2003; SHEFER et al., 2003; MORRONE et al., 1998), pois estimula a proliferação de células satélites (BEN- DOV et al., 1999); aumenta a proliferação de fibroblastos devido ao aumento da produção de fatores de crescimento fibroblásticos

básicos (DEMIR et al., 2004; STADLER et al., 2001) aumenta a mobilidade de mioblastos e a formação de fibras musculares, interferindo na adaptação muscular (BAXTER, 1994; AMARAL et al., 2001). Entretanto, existem discrepâncias na literatura em relação aos parâmetros empregados na TLBI, principalmente das fluências utilizadas, que visam uma regeneração muscular efetiva e segura (ORTIZ et al., 2003).

Além disso, o uso do laser de baixa intensidade tem demonstrado inibir a expressão gênica de citocinas pró inflamatórias (GAVISH et al., 2006), reduzir prostaglandinas e COX-2 (ALBERTINI et al., 2007), modular atividade e expressão de MMP- 2 (GAVISH et al., 2006) e reduzir o estresse oxidativo em diferentes tecidos (FILLIPIN et al., 2005; FUJIMAKI et al., 2003; BERKI et al., 1991). Embora existam algumas evidências científicas demonstrando a potencialidade biomodulatória dessa radiação, são escassos os estudos demonstrando a influência do laser de $\lambda= 830\text{nm}$ sobre os níveis plasmáticos de NOx-, expressão protéica e atividade da MMP-2, atividade de COX-2 e análises morfológicas e morfométrica da lesão no processo de reparação muscular. Portanto, a compreensão dos efeitos da TLBI na nestas variáveis seria um importante alvo terapêutico na modulação do dano muscular.

Sendo assim, na busca de parâmetros clínicos efetivos e melhor entendimento dos mecanismos de ação desse recurso terapêutico nas lesões músculo esqueléticas, este estudo propõe investigar os efeitos de diferentes fluências do laser de $\lambda= 830 \text{ nm}$ durante o processo de regeneração do músculo esquelético de ratos após criolesão.

2.2 OBJETIVO

Analisar o efeito de diferentes fluências do *laser* de baixa intensidade ($\lambda= 830\text{nm}$) durante a regeneração muscular em ratos sobre os seguintes parâmetros:

- 1) avaliar a morfologia e morfometria da lesão;
- 2) identificar o grau de alteração do óxido nítrico, através dos níveis plasmáticos de nitrato/nitrito (NO_x^-);
- 3) verificar a atividade de COX-2 (S- nitrosilação);
- 4) avaliar o remodelamento da matriz extracelular pela análise da atividade e expressão protéica de MMP-2;

2.3 MATERIAS E MÉTODOS

2.3.1 Animais de Experimentação

Para a execução do trabalho proposto, foram utilizados 56 ratos (*Rattus norvegicus: var. albinus, Rodentia, Mammalia*), da linhagem Wistar, machos, com três meses de idade e massa corporal variando de 301.4±14,3g gramas. Os animais procedentes do Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) foram mantidos no Biotério do Departamento de Fisioterapia da mesma instituição, durante todo o procedimento experimental. Permaneceram 2 animais em gaiolas apropriadas de polietileno padrão, em condições ambientais controladas (ciclo claro/escuro de 12/12 horas, temperatura na faixa de 22° - 27°C e ambiente higienizado), recebendo ração própria comum e água *ad libitum*.

Os experimentos foram conduzidos seguindo as recomendações éticas do *Guide for Care and Use of Laboratory Animals* (National Research Council, 1996) e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFSCar CEEA/UFSCar (Parecer 006/06).

2.3.2 Delineamento Experimental

Os animais utilizados foram pesados e distribuídos aleatoriamente em 8 grupos de 7 animais:

Grupo (C) - Controle: os animais não foram submetidos a nenhum procedimento.

Grupo (CL) - Lesão: os animais tiveram o músculo tibial anterior direito (TAD) criolesados.

Grupo (4J) - o músculo TAD sem criolesão foi submetido à irradiação laser ($\lambda = 830\text{nm}$), com fluência de $4\text{J}/\text{cm}^2$, por 6 segundos, depositada uma energia total de $0,12\text{J}$.

Grupo (8J) - o músculo TAD sem criolesão foi submetido à irradiação laser ($\lambda = 830\text{nm}$), com fluência de $8\text{J}/\text{cm}^2$, por 12 segundos, depositada uma energia total de $0,24\text{J}$.

Grupo (16J) - o músculo TAD sem criolesão foi submetido à irradiação laser ($\lambda = 830\text{nm}$), com fluência de $16\text{J}/\text{cm}^2$, por 23 segundos, depositada uma energia total de $0,46\text{J}$.

Grupo (L4J) - o músculo TAD foi criolesado e submetido à irradiação laser ($\lambda = 830\text{nm}$), com fluência de $4\text{J}/\text{cm}^2$, por 6 segundos, depositada uma energia total de $0,12\text{J}$.

Grupo (L8J) - o músculo TAD foi criolesado e submetido à irradiação laser ($\lambda = 830\text{nm}$), com fluência de $8\text{J}/\text{cm}^2$, por 12 segundos, depositada uma energia total de $0,24\text{J}$.

Grupo (L16J) - o músculo TAD foi criolesado e submetido à irradiação laser ($\lambda = 830\text{nm}$), com fluência de $16\text{J}/\text{cm}^2$, por 23 segundos, depositada uma energia total de $0,46\text{J}$.

Em todos os grupos a irradiação foi aplicada 24 horas após a lesão por cinco dias consecutivos de forma pontual com contato, transcutaneamente ao ponto referente à área da lesão. A caneta do equipamento foi posicionada perpendicularmente ao local de aplicação com o auxílio de um suporte (Figura 1).



Figura 1- Aplicação da TLBI, com a caneta posicionada a 90°.

2.3.3 Criolesão

Os animais foram pesados, anestesiados proporcionalmente à massa corporal, via intraperitoneal, com uma associação de ketamina (95mg/kg) e xilazina (12mg/kg). Na seqüência, a pele que recobre o músculo tibial anterior (TAD) foi tricotomizada e limpa, sendo então realizado uma incisão transversal (aproximadamente 1 cm) com o afastamento da fáscia na região correspondente ao ventre muscular.

A lesão tecidual foi induzida por congelamento (criolesão) na região central do ventre do músculo TAD. Este método gera uma lesão homogênea, sendo previamente testada e reproduzida em diferentes unidades experimentais (CARLSON; FAUKNER, 1983; BIBIKOVA; ORON, 1993, OLIVEIRA et al., 2006; MYABARA et al., 2006). Para isso, um bastão de ferro com 6mm de largura e 30 mm de comprimento, previamente imerso em nitrogênio líquido, foi pressionado transversalmente contra o ventre do músculo por 10 segundos. Após novo resfriamento do bastão, esse procedimento foi repetido e em seguida a pele foi suturada (Fio Nylon 3-0 – Shalon Ltda) e limpa com álcool iodado. (Figura 2).



Figura 2 – Esquema ilustrativo da criolesão no ventre no TAD.

2.3.4 Equipamento Emissor da Radiação Laser

Utilizou-se um *laser* de diodo com meio ativo composto por GaAlAs (arsenieto de gálio- alumínio), com comprimento de onda de 830nm, classe 3B, da marca DMC equipamentos Ltda, potência óptica de saída de 20mW, área da secção transversal do feixe de 0,0028cm², ângulo de divergência de 1,5° e emissão em modo contínuo. Inicialmente o equipamento foi calibrado e após o procedimento experimental foi novamente aferido no Laboratório de Biofotônica do Grupo de Óptica do Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo (USP), a fim de se obter uma alta confiabilidade na intensidade efetiva da emissão laser. Foram testadas as fluências em um intervalo crescente de 4J/cm², 8J/cm² e 16J/cm², com o objetivo de encontrar uma possível “janela terapêutica” para as aplicações do laser na reabilitação de lesões músculo esquelética. Essas fluências foram escolhidas a partir dos estudos de Turner & Hode (2003) que evidenciaram as fluências de 4 a 10J/cm² como as mais efetivas para a promoção da regeneração tecidual.

2.3.5 Dosagem dos Níveis Plasmáticos de Nitrito/Nitrato (NO_x-)

Aproximadamente 3ml de amostras de sangue foram coletadas da aorta abdominal, em tubos contendo EDTA (conforme instrução do fabricante), centrifugados a 1.000 g por 10 minutos, à 4°C, para separação do plasma, sendo então aliqüotadas e armazenadas em freezer -80°C até a realização das dosagens. Após, as amostras foram centrifugadas em tubos de ultra-filtração (Millipore) para separação da hemoglobina (reduz a absorbância do kit). O preparo das amostras, dos padrões, dos cofatores e do reagente de Griess foi realizado de acordo com a descrição dos kits comercialmente disponíveis (Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit; Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EUA). Os ensaios foram realizados em duplicatas e lidos em espectrofotômetro de placa no comprimento de onda 540-550nm.

2.3.6 Retirada e Armazenamento dos Músculos

O período de irradiação e da retirada dos músculos no 6° dia após indução da lesão foram escolhidos na tentativa de adequar temporalmente a possível influência bioestimulante das radiações aos eventos envolvidos durante o processo de regeneração do tecido muscular esquelético (CHAMERS e McDERMOTT, 1996). Todos músculos TAD foram retirados com os animais anestesiados e após a retirada, os músculos foram pesados. Em seguida, os animais foram eutanaziados com dose letal de anestésico. A região da lesão ou correspondente a mesma foi dividida ao meio, porções proximal e distal, com um corte horizontal. A porção distal foi utilizada para análise histoquímica e a proximal foi utilizada para a análise de Biotin Switch, Zimografia e Western Blotting. Em seguida, os músculos foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer a -86°C para posterior análise.

2.3.7 Análise Morfológica e Morfométrica

Da região distal correspondente à lesão de todos os músculos TA foram obtidos cortes histológicos transversais e seriados (10 µm), em micrótomo criostato (HM 505E – Microm) com temperatura de -25°C. As lâminas histológicas com os cortes seriados foram, alternadamente, coradas com Azul de Toluidina (TB) e com reação enzimática para Fosfatase ácida. A coloração com TB foi usada para avaliar as características estruturais do músculo, pois permite a identificação de mionúcleos, área de mionecrose e as regiões basofílicas da fibra. A reação de FA foi usada para identificar os sinais de necrose. As fibras musculares normais não mostram uma reação positiva de fosfatase que indica uma alta concentração de lisossomos, que é considerado como prova da necrose tecidual e fagócitos (PEVIANI et al, 2007).

Para a análise morfométrica da área de lesão, as imagens foram processadas para a obtenção de um mosaico demonstrando a extensão total do corte histológico. Ambas foram analisadas em microscópio óptico (Axioplan 2, Carl Zeiss, Jena, Alemanha) e a mensuração da área total e lesada de cada corte foi realizada através do software Axion Vision (Carl Zeiss).

2.3.8 Atividade de COX-2 (nitrosilação) por Biotin Switch

Aproximadamente 80 mg de tecido foram coletados, da região proximal de lesão ou referente a mesma e pulverizado em nitrogênio líquido. Foi adicionado 5 ml de tampão de lise/bloqueio [chaps 0,5%, SDS 1%, NEM 20mM, diluídos em HEN super (HEPES 250 mM, EDTA 25mM, neocupoeine 0,1mM)] e inibidor de protease (Sigma). O material foi deixado em gelo e no escuro, sob agitação por 2 horas. Em seguida, o material lisado foi centrifugado a 5000 rpm, 4 °C por 5 minutos. O sobrenadante contendo as proteínas extraídas foi precipitado com acetona (2x o volume de tampão) e o

pellet ressuspendido em 1 ml de HEN super “S” (HEN super, 1% SDS). As proteínas foram dosadas pelo método de BCA, sendo que a curva padrão foi diluída em HEN super “S”. Cada amostra obteve concentração final de 500µg de proteína para 400µl de volume total. Em seguida, foi adicionado 50 µl de ascorbato (100 mM de ascorbato diluído em HEN super) e 50 µl de MPB (500 µM de MPB diluída em HEN super) nas amostras e as mesmas foram incubadas em temperatura ambiente por 1 hora, deixar sob agitação e no escuro. As proteínas foram novamente precipitadas em acetona e novamente quantificadas pelo método de BCA. Logo após, foi adicionado 150 µg de proteína para imunoprecipitar COX-2, 50 µl de proteína G agarose e 2 µg de anticorpo anti-COX-2. O material foi deixado a 4°C *overnight* sob agitação. As *beads* foram lavadas com PBS e eluídas em tampão amostra (LAEMLY, sem agente redutor), fervidas por 5 minutos e aplicadas em gel de poliacrilamida 10%. As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose. Por fim, a membrana foi bloqueada em solução de soro albumina bovina (BSA) 5% diluída em PBS com 0,5% de Tween 20 (PBST), lavadas 3 vezes de 10 minutos em PBST e o anticorpo anti-biotina conjugada com HRP (Sigma), diluído em PBST com 0,5% de BSA (1:1000), foi incubado por 2 horas a temperatura ambiente. A membrana foi revelada com Super Signal (Pierce).

2.3.9 Zimografia

A metodologia empregada foi adaptada de Marqueti et al. (2006). O tecido congelado foi lavado 3 a 4 vezes com salina gelada e incubado com o tampão de extração (ácido cacodílico 10 mM pH 5,0, NaCl 0,15 mM, ZnCl₂ 1 µM, CaCl₂ 20 mM, NaN₃ 1,5 mM e Triton X-100 0,01% [v/v]) a 4°C, com agitação contínua, durante 24 horas. Após este tempo, o tampão de extração foi coletado por centrifugação de 14000g por 10 minutos a

4°C. A concentração de proteínas foi determinada utilizando-se o kit *BCA™ Protein Assays* (Pierce), segundo instruções do fabricante. Iguais quantidades de proteína total (30 µg / poço) compostas por um pool de 5 músculos TA por grupo (6 µg por animal) foram submetidas à eletroforese em quadruplicata.

Os géis de zimografia consistiram de géis de SDS(10%) com gelatina(1mg/ml) sob condições não reduzidas. Após a eletroforese, o gel foi lavado 2 vezes durante 30 minutos em solução 2,5 % de Triton X-100 para remoção do SDS. Em seguida, o gel foi incubado em tampão de revelação (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, CaCl₂ 5 mM e NaN₃ 0,02%) a 37° C, durante 24 horas. Após este tempo, o gel foi corado com Coomassie Blue por 30 minutos, descorado com ácido acético:metanol:água (1:4:5) para visualização das bandas de atividade. As amostras também foram incubadas com EDTA para confirmar se a protease era uma metaloprotease. Para documentação, o gel foi escaneado e as bandas de atividade foram analisadas quanto sua densitometria no software Gene Tool da Syngene .

2.3.10 Expressão de MMP-2 por Western Blotting

Da região correspondente a parte proximal da lesão, foi utilizada 25 µg de proteína obtida a partir do extrato total dosadas pelo kit *BCA™ Protein Assays* (Pierce). As amostras foram diluídas em tampão amostra (LAEMLY, com agente redutor, Beta-mercapto). O material foi fervido por 5 minutos e submetidas à eletroforese em um sistema SDS-PAGE, gel de poliacrilamida 10%. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Bio-Rad) em aparelho transferidor semi-seco (Bio-Rad). A membrana foi bloqueada em solução de soro albumina bovina (BSA) 5% diluída em PBS com 0,5% de Tween 20 (PBST) por 1 hora em temperatura

ambiente. Em seguida, foram lavadas 3 vezes de 10 minutos em PBST. Os anticorpos MMP-2 primários e secundários (Santa Cruz) foram diluídos em PBST com 0,5% de BSA (1:1000) e incubado por 2 horas a temperatura ambiente. A membrana foi revelada com Super Signal (Pierce).

2.3.11 Análise Estatística

Os dados referentes às análises realizadas foram submetidos ao teste de variância (ANOVA Two Way), permitindo a análise comparativa entre os grupos experimentais. Os testes de Tukey e Newman Keuls foram eleitos para a caracterização das diferenças entre grupos específicos. O nível de significância aceito foi o de 5% ($p < 0,05$).

2.4 RESULTADOS

2.4.1 Análises Morfológicas

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

As análises demonstraram que os aspectos morfológicos exibidos foram similares em todos os grupos experimentais lesados. A região comprometida pela criolesão, que se apresentou restrita à região superficial do músculo TA, pode ser facilmente visualizada nos cortes corados com TB. Uma demarcação bem definida delimita a interface entre a área intacta e o sítio da lesão (Figuras 3). As fibras contidas na região intacta demonstram as características peculiares de um tecido muscular esquelético saudável apresentando um formato poligonal, núcleo periférico, organização fascicular e não apresentaram reação positiva a fosfatase ácida. Na região do sítio da lesão próximo à interface, são identificadas fibras jovens, caracterizadas por núcleos centralizados e menor área de secção transversa. Já na região superficial da lesão, pode-se indentificar uma elevada concentração de células mononucleadas (inflamatórias e/ou miogênicas), ausência de fibras musculares jovens, matriz extracelular abundante e alta concentração de lisossomos.

Com relação aos grupos em que não houve lesão e os que apenas foram submetidos à irradiação, não se encontrou nenhuma alteração na morfologia da fibra e a reação da fosfatase ácida foi negativa.

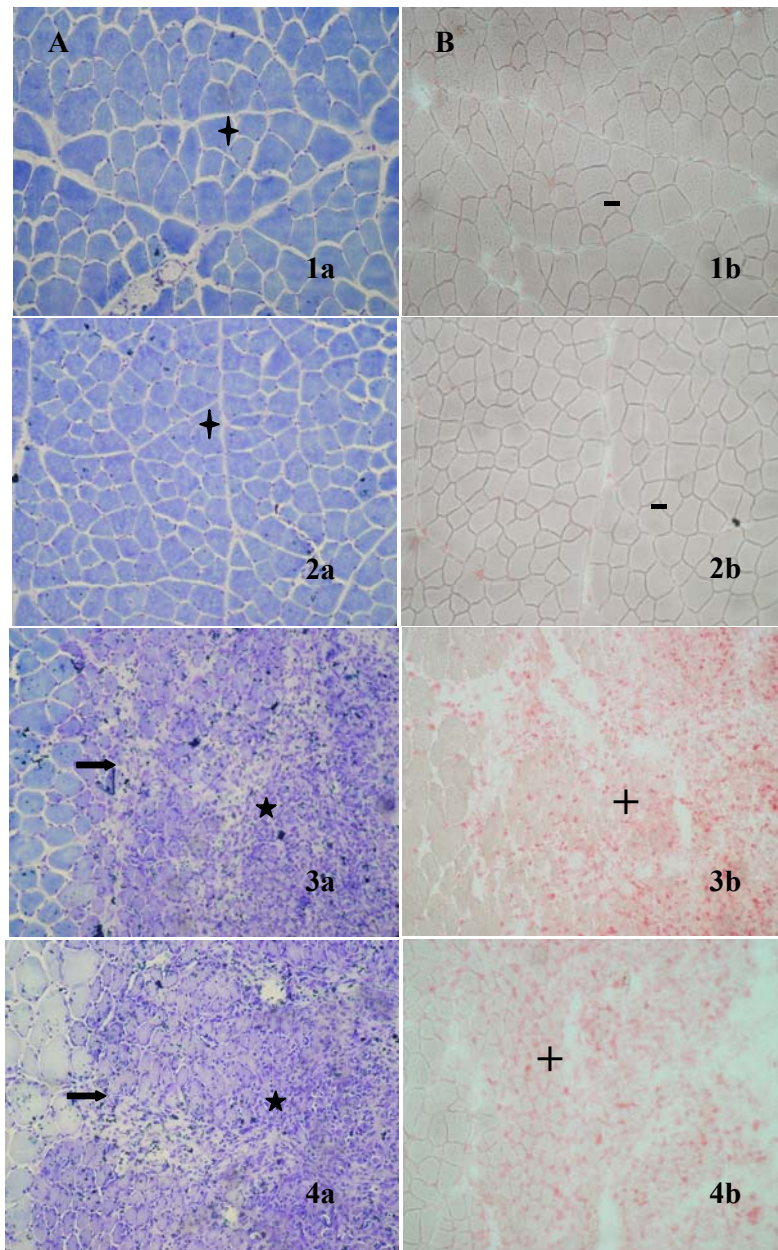


Figura 3 - Secções transversais seriadas da região média do TAD: **A)** Coloração de Azul de Toluidina; **B)** Colocação de Fosfatase Ácida; **1a e 1b** grupo controle (C); **2a e 2b** grupo apenas irradiados (8J); **3a e 3b** grupo lesado (CL); **4 a e 4b** (L8J) grupo lesado e irradiado. Evidenciam-se ✦ fibras normais musculares normais (1a e 2a); ⇒ interface entre regiões normais e lesadas (3a e 4a); ☆ região correspondente a lesão (3a e 4a). (-) reações negativas (1b e 2b); (+) reações positivas caracterizando alta concentração de lisossomos considerados como prova da necrose tecidual (3b e 4b). (aumento 200x)

3.4.2 Morfometria da Lesão

Os resultados representados na figura 4 mostram que houve uma redução significativa nas áreas lesadas nos grupos L8J ($p < 0,01$) e L16J ($p < 0,01$) quando comparado ao grupo controle lesão (CL). Não houve diferença entre os grupos com relação a área total de secção transversa do músculo TAD.

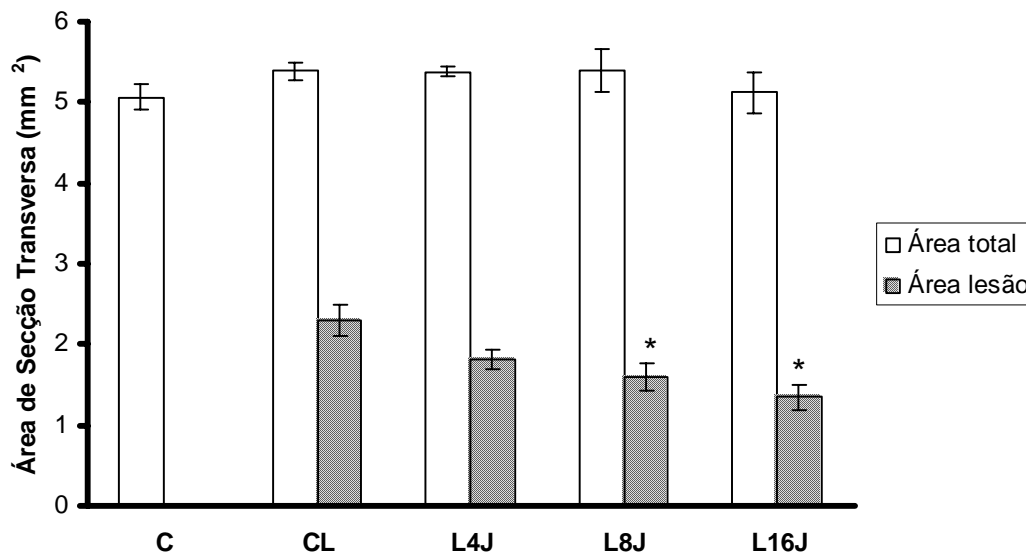


Figura 4 - Área total e área de lesão. * $p < 0,01$ vs CL.

2.4.3 Níveis Plasmáticos de Nitrito/Nitrato (NO_x^-)

Houve um aumento nos níveis plasmáticos de nitrato e nitrito (NO_x^-) (Figura 5) em todos grupos lesados quando comparados aos não lesados ($p < 0,05$). Em relação à ação do laser de baixa intensidade sobre os níveis plasmáticos de NO_x^- observou-se que apenas L16J apresentou valores inferiores ao CL ($p < 0,05$).

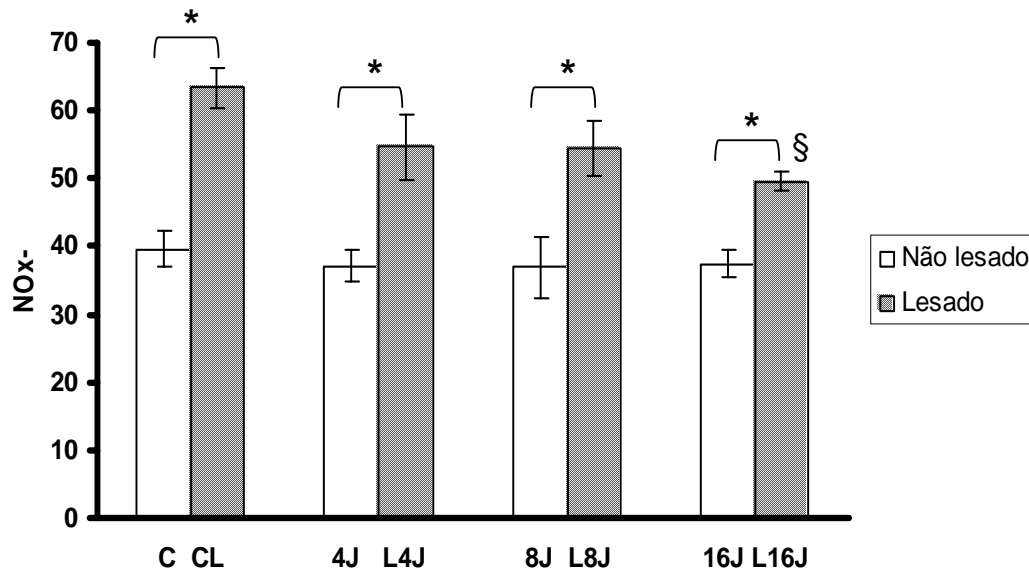


Figura 5- Níveis plasmáticos de nitrato e nitrito. * ($p < 0,05$) vs não lesado; § ($p < 0,05$) vs CL.

2.4.4 Atividade de COX-2- Análise de S- Nitrosilação

As análises de biotin switch mostraram que a COX-2 ativa (S-nitrosilada) foi detectada apenas nos grupos CL e L4J (Figura 6). O laser foi eficaz em diminuir a atividade de COX-2 com a menor fluência (L4J) e aboliu a atividade de COX-2 nos grupos L8J e L16J.

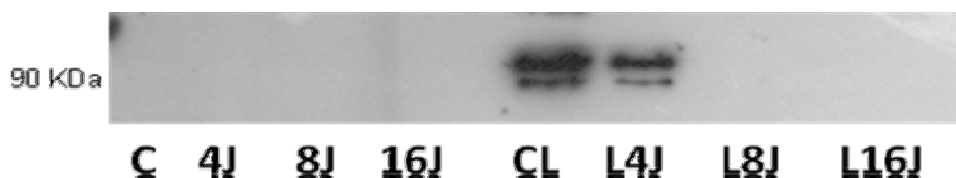


Figura 6 - Biotin switch - COX-2 ativa (S-nitrosilada) nos grupos CL e L4J.

2.4.5 Análise de Zimografia

A análise de Zimografia mostrou 2 bandas (Figura 7) bem definidas (72 kDa / pro-MMP-2 e 64 kDa /ativa MMP-2). A análise quantitativa da densidade das bandas mostrou que a MMP-2 aparece constitutivamente ativa no grupo controle (C) e nos grupos sem lesão apenas irradiados (4J, 8J e 16J). Dois componentes da MMP-2 tiveram sua atividade aumentada nos grupos lesados (CL, L4J, L8J, L16J) com relação ao não lesados (C, 4J, 6J, 16J) ($p < 0,05$) (Figura 8). Não houve diferença estatística ($p > 0,05$) nos grupos sem lesão apenas irradiados (4J, 6J, 16J) quando comparados ao controle (C) e nem dos grupos lesados e irradiados (L4J, L8J, L16J) quando comparado ao controle lesão (CL).

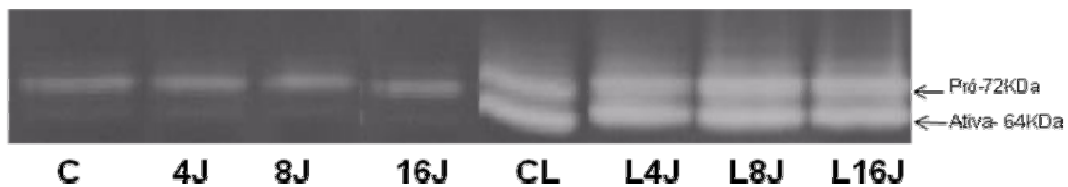


Figura 7- Gel de Zimografia mostrando as bandas pró MMP-2 e Ativa MMP-2.

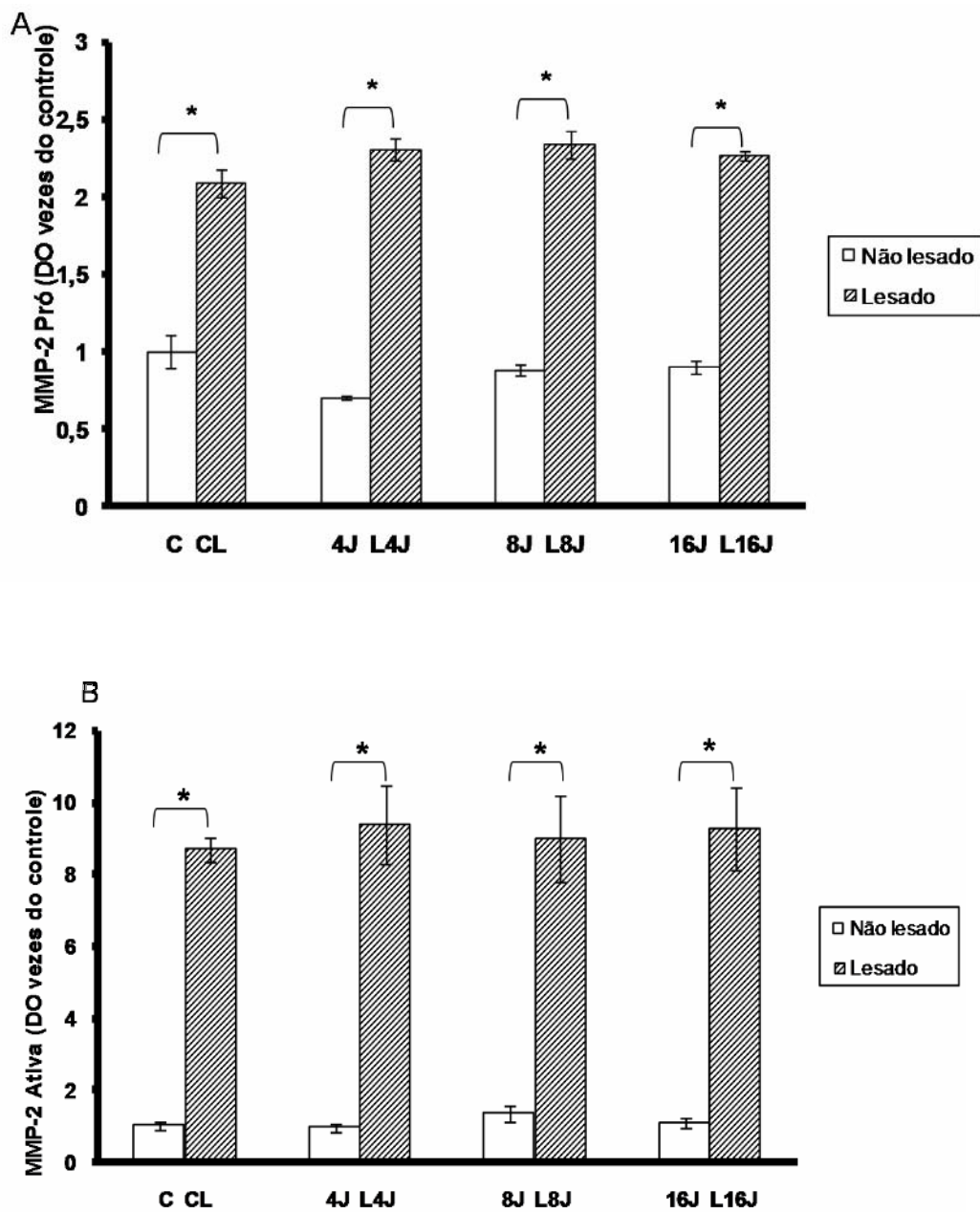


Figura 8 - Atividade da Pró/MMP-2 (A) Ativa/MMP-2 (B). * ($p < 0,01$).

2.4.6 Expressão de MMP-2

Os resultados referentes aos níveis totais de proteínas mostraram que a expressão protéica de MMP-2 aumentou em todos os grupos lesados com destaque nos grupos L8J e L16J (Figura 9).



Figura 9 - Western Blotting mostrando a expressão da MMP-2.

2.5 DISCUSSÃO

O laser de baixa intensidade vem sendo cada vez mais utilizado na prática terapêutica, constituindo-se atualmente em uma das modalidades bioestimulantes mais utilizadas na reabilitação músculo-esquelético (AMARAL et al., 2001). Entretanto, os mecanismos pelos quais a TLBI interage com estruturas biológicas durante o processo de regeneração, especialmente no tecido musculo-esquelético, não são suficientemente compreendidos. Utilizando um modelo de lesão muscular por criogenia (CARLSON; FAUKNER, 1983; BIBIKOVA A, BELKIN V, ORON U, 1994; BIBIKOVA; ORON, 1993, OLIVEIRA et al., 2006; MYABARA et al., 2006), este estudo trouxe resultados relevantes para a prática clínica, principalmente nas fluências de $8\text{J}/\text{cm}^2$ e $16\text{J}/\text{cm}^2$ demonstrando ser mais efetivo para a promoção da cicatrização tecidual representada pela resposta das análises morfológica e morfométrica da lesão, níveis plasmáticos de nitrato/nitrito, expressão protéica de MMP-2 e atividade de COX-2.

Embora muitos estudos mostrem os efeitos positivos da radiação λ de 632,8nm sobre a regeneração muscular (BIBIKOVA & ORON, 1993, 1994; WEISS & ORON, 1992; AMARAL et al., 2001), esta encontra-se pouco representativa dentro do arsenal das radiações laser utilizadas atualmente na terapêutica clínica. Isto se deve ao custo proporcionalmente elevado do equipamento e as baixas potências de emissão, que impossibilita seu uso no tratamento de tecidos profundos tendo em vista a limitada capacidade de penetração diante da técnica transdérmica de aplicação. Com base neste contexto, foi desenvolvido o presente estudo utilizando o laser de $\lambda= 830\text{nm}$, que age mais profundamente, está disponível comercialmente e é freqüentemente utilizado na prática clínica nas fluências de $4\text{J}/\text{cm}^2$ a $10\text{J}/\text{cm}^2$, devido a sua efetividade na promoção do reparo tecidual (TURNER & HODE, 2003).

Diante disso, a análise morfológica do presente estudo demonstrou similaridade em todos os grupos experimentais, ou seja, pequenas fibras de regeneração próximo à interface, delimitando a zona de lesão possivelmente indicando a ocorrência dos processos de ativação, proliferação, diferenciação e fusão de células miogênicas (SALVINI et al., 2001). Além disso, a presença de matriz extracelular abundante e uma alta concentração de lisossomos considerados como prova da necrose tecidual e fagocitose (PEVIANI et al., 2007). Portanto, as análises deste estudo foram similares e não permitiram constatar a influência do laser no padrão de regeneração muscular. Entretanto, a morfometria da lesão permitiu evidenciar as diferenças no padrão regenerativo. Os resultados mostraram que os grupos criolesados que utilizaram as fluências mais altas (L8J e L16J, respectivamente) foram mais eficazes, inferindo uma ação eficaz da radiação sobre a proliferação e/ou diferenciação das células satélites recrutadas durante a fase inicial da regeneração (BEN-DOV et al., 1999).

Na regeneração muscular, o processo inflamatório é mediado por múltiplos mecanismos moleculares. Os dois que mais se destacam é a produção de óxido nítrico mediado pela isoforma iNOS e a formação de prostaglandina pela COX-2 (KIM et al., 2005; VASSILAKOPOULOS & HUSSAIN, 2007). A mensuração do óxido nítrico plasmático neste estudo, foi realizada por meio da determinação da concentração de seus derivados, ou seja, nitrito e nitrato (NO_x^-), pois a demonstração da produção de NO é ainda difícil devido sua evanescência, sendo feita na maioria das vezes de maneira indireta. O aumento dos níveis plasmáticos de NO_x^- nos grupos submetidos à lesão muscular (CL, L4J, L8J e L16J) verificado neste estudo, coincide com o que normalmente ocorre durante o processo inflamatório. O NO em concentrações elevadas produz danos celular devido sua interação com o superóxido formando peroxinitrito (ONOO^-), um potente agente oxidante (AIKENS & DIX, 1991; ZHANG et al., 2003),

diminuindo a força muscular e alterando a capacidade funcional das mitocôndrias musculares (BOCZKOWSKI, 1999; CALLAHAN LA, 2001). Isso sugere que as dosagem sistêmicas dos níveis plasmáticos de NO_x^- realizadas, possam indicar um aumento na inflamação local, visto que será necessário dosagens destes subprodutos no tecido para uma comprovação mais eficaz. Situações semelhantes de altas concentrações de NO são produzidas em músculos com processos patológicos como hipóxia (CLANTON, 2007), distrofia muscular (TIDBALL, 2007) e atrofia muscular (POWERS et al., 2007).

Por outro lado, no presente estudo quando se aplicou laser nos músculos lesados, houve uma diminuição dos níveis plasmáticos de NO_x^- no grupo tratado com a fluência mais alta (L16J). Estes achados inferem que o laser de $\lambda= 830\text{nm}$, na fluência de $16\text{J}/\text{cm}^2$ possa ter proporcionado um efeito sistêmico e ativado enzimas anti-oxidantes modulando a resposta inflamatória local (FUJIMAKI et al., 2003; STADLE et al., 2000; KIM et al., 2000; YAAKOB et al., 2001) e as possíveis alterações causadas pelo excesso de espécies de reativas no músculo esquelético. Efeitos similares foram observados com o laser He-Ne que reativou as enzimas catalase e superóxido desmutase (SOD) em processos de cicatrização de feridas (VLADIMIROV et al., 2004). Na literatura também é encontrado que o laser reduziu o estresse oxidativo em diferentes situações, tais como: cicatrização de tendão em modelos animais (FILLIPIN et al., 2005), após cirurgia abdominal (POTAPOV et al., 1995), in vitro em neutrófilos humanos isolados (FUJIMAKI et al., 2003; VLADMIROV et al., 1988) e na membrana do lipossomo (BERKI et al., 1991).

Com relação à atividade de COX-2, verificamos que o laser foi eficaz em diminuir a atividade de COX-2, verificado pela anulação da S- nitrosilação em fluências mais altas (L8J e L16J). Isso faz refletir que em existe um sinergismo entre iNOS e COX-2, visto que ambos são sistetizados em tempos similares em situações inflamatórias

e que o laser aplicado em doses maiores, poderia ter modulado esta via de interação, agindo neste caso como uma nova alternativa de tratamento para modular doenças inflamatórias. Nenhum trabalho foi encontrado da literatura que mostre a ação do laser na nitrosilação de proteínas. Porém, o estudo de Sakurai et al. (2001) evidenciou que o mesmo laser utilizado no presente estudo reduziu significativamente os níveis de COX-2 mRNA e de prostaglandinas E2 (PGE2) em fibroblastos gengivais humanos. Outros trabalhos realizados em diferentes modelos inflamatórios evidenciaram uma diminuição de COX-2 no tecido subplantar de ratos após indução da inflamação por carragenina (ALBERTINI et al. 2007) e em lesão de tendão de Aquiles (FILLIPIN et al 2005).

Com relação à atividade e expressão de MMP-2 verificadas neste estudo, nossos resultados mostraram que a MMP-2 está presente constitutivamente no tecido muscular em níveis baixos, evidenciados nos grupos em que não houve lesão. Entretanto sua expressão e atividade encontram-se aumentadas após a indução da lesão possivelmente para uma maior degradação de componentes da matriz, facilitando o trânsito de componentes inflamatórios e remoção do debris (PAGE-MCCAW et al., 2007; BERNAL et al., 2005; STERNLICHT & WERB , 2006).

Há pouca informação na literatura a respeito do efeito do laser na atividade e/ou expressão da MMP-2. O tratamento com laser no presente estudo foi acompanhado por um importante aumento da expressão da MMP-2, sugerindo que a terapia possa ter atuado na regulação desta via, apesar da atividade desta metaloproteinase não ter sido modificada ao longo de 6 dias no modelo de lesão muscular proposto.

Estudos mostram que após uma lesão muscular, as células satélites, identificadas como células precursoras musculares, expressam MMPs quando ativadas. Uma elevada produção de MMP pode resultar em uma migração celular para a área lesada com subsequente diferenciação e fusão das células satélites em miofibrila (KHERIF et al,

1999). Portanto, o laser pode ter influenciado o aumento da expressão das células satélites (BEN- DOV et al., 1999) e das MMP-2 (GAVISH et al., 2006). Para demonstrar esta possível influência, um estudo *in vitro* demonstrou que a radiação laser no $\lambda=632,8\text{nm}$ foi capaz de elevar a taxa de proliferação de células precursoras miogênicas, atribuindo esses fatores a possível efetividade dessa radiação sobre o processo de regeneração muscular, tendo em vista que seriam responsáveis pela determinação de um contingente maior de células miogênicas que, posteriormente, sofreriam a diferenciação terminal e fusão celular (BEN- DOV et al., 1999). Outro estudo realizado em células musculares lisas de aorta (GAVISH et al., 2006), mostrou que a TLBI modulou o equilíbrio entre as enzimas regulatórias da matriz extracelular (MMPs), sugerindo uma importante relevância terapêutica em situações de alterações da matriz em condições diferenciadas.

A inclusão dos grupos com músculos normais irradiados com laser (4J, 8J e16J) no atual estudo, teve a finalidade de verificar a magnitude ou eficácia do efeito biomodulatório atribuído ao laser de baixa intensidade ao interagir com os tecidos biológicos. O objetivo era observar se o efeito biomodulatório era dependente das condições metabólicas prévias do tecido (BECKERMAN et al.,1992; KARU 1987; KITCHEN E PARTRIDGE.,1991; WILDEN & KARTHEIN, 1998). Portanto, não houve diferenças entre estes grupos e nem destes com relação ao controle (C) em nenhum dos parâmetros analisados. Neste estudo, estes achados confirmam que a resposta tecidual à TLBI tende a ser ótima quando o potencial redox celular se encontra alterado, por exemplo, num quadro de lesão tecidual, cujo ambiente celular apresente condições favoráveis como diminuição do pH e do suprimento energético que favorece a maior interação da radiação com os tecidos, e conseqüentemente, maior resposta biológica em condições fisiológicas.

Analisando conjuntamente os resultados obtidos neste experimento, é possível sugerir que o tratamento a laser de $\lambda = 830\text{nm}$ e as fluências de 8J/cm^2 e 16J/cm^2 exerceram uma influência biomodulatória benéfica sobre a regeneração muscular. Outras análises poderiam complementar mais informações, como por exemplo, marcadores de reparo de lesão, detecção de apoptose, dosagem de colágeno e marcadores de estresse oxidativo.

Assim, acredita-se que, em consequência da influência biomodulatória, a radiação possa contribuir para o restabelecimento estrutural e funcional após lesão muscular. A compreensão de parâmetros do laser sobre mecanismos de ação e interação com a célula podem assim melhorar a especificidade da laserterapia e também a elaboração de protocolos com tratamentos mais seguros e eficazes.

PARTE III

3- CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nas observações sobre a morfologia e morfometria da lesão, níveis plasmáticos de NO_x^- , a expressão protéica das MMP-2, e atividade de COX-2, é possível concluir que a TLBI poderia auxiliar na melhora da regeneração muscular, sendo uma importante estratégia terapêutica dentro do tempo de lesão e de tratamento analisado neste estudo. É necessário levar em consideração a importância e a necessidade de mais pesquisas sobre os efeitos da TLBI nestas variáveis responsáveis pelo processo de reparação tecidual, objetivando uma definição mais clara sobre a parametrização e protocolos de irradiação que sejam mais efetivos na recuperação da lesão muscular em diferentes tempos.

3.1 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS V, NEHRHOFF B, SPATE U, LINKE A, SCHULZE PC, BAUR A, GIELEN S, HAMBRECHT R, SCHULER G. Induction of iNOS expression in skeletal muscle by IL-1b and NFkB activation: An in vitro and in vivo study. **Cardiovasc Res.**, v.54, p.95–104, 2002.

AIKENS, J.; DIX, T.A. Perohydroxyl radical (HOO) initiated lipid peroxidation. The role of fatty acid hydroperoxides. **J. Biol. Chem.**, v. 266, n. 23, p. 15091-8, 1991.

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

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

BASFORD, J. R.; MALANGA, G. A.; KRAUSE, D. A.; HARMSSEN, W. S. A Randomized controlled evaluation of low-intensity *laser* therapy: plantar fasciitis. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, v.79, p. 249-255, 1998.

BASSAGLIA, Y.; GAUTRON, J. Fast and slow rat muscles degenerate and regenerate differently after whole crush injury. **J Muscle Res Cell Motil.**, v. 16, n. 4, p. 420-429, 1995.

BAXTER D. Therapeutic lasers: Theory and practice. Edinburgh: Churchill Livingstone, p 1–259, 1994.

BECKMAN, B. S., KOPPENOL, W. H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. **Am. J. Pysiol.**, v. 271, p. C1424-C1437, 1996.

- BEN-DOV N, SHEFER G, IRINITCHEV A, WERNIG A, ORON U, HALEVY O.
BERKI T, NEMETH P, POTO L, NEMETH A. Effects of photosensitization and low-power helium-neon laser irradiation on liposomes and cell membranes. **Scanning Microsc.**, v.5, p. 1157–64, 1991.
- BERNAL F, HARTUNG HP, KIESSEIER, BC. Tissue mRNA expression in rat of newly described matrix metalloproteinases. **Biol Res.**, v.38, p. 267–271, 2005.
- BEST TM, HUNTER KD. Muscle injury and repair. **Phys Med Rehabil Clin Norht Am.**, v. 11, p.251–66, 2000.
- BIBIKOVA A, BELKIN V, ORON U. Enhancement of angiogenesis in regenerating gastrocnemius muscle of the toad (*Bufo viridis*) by low-energy laser irradiation. **Anat Embryol.**, v. 190, p.597–602, 1994.
- BIBIKOVA A, ORON U. Attenuation of the process of muscle regeneration in the toad gastrocnemius muscle by low energy laser irradiation. **Lasers Surg Med.**, v.14, p.355–361, 1994.
- BIBIKOVA A, ORON U. Promotion of muscle regeneration in the toad (*Bufo viridis*) gastrocnemius muscle by lowenergy laser irradiation. **Anat Rec.**, v.235, p.374–380, 1993.
- BOCZKOWSKI J, LISDERO CL, LANONE S, SAMB A, CARRERAS MC, BOVERIS A, AUBIER M, PODEROSO JJ. Endogenous peroxynitrite mediates mitochondrial dysfunction in rat diaphragm during endotoxemia. **FASEB J**, v.13, p.1637–1646, 1999.
- BODINE-FOWLER, S. Skeletal muscle regeneration after injury: an overview. **J Voice**. v. 8, n. 1, p. 53-62, 1994.
- BULYAKOVA, N.V. Effect of He-Ne laser irradiation on regeneration of skeletal muscle in newdirm and aged rats. **Dokl Biol Sci.**, v. 336, p. 287-290, 1994.

CALLAHAN LA, STOFAN DA, SZWEDA LI, NETHERY DE, SUPINSKI GS. Free radicals alter maximal diaphragmatic mitochondrial oxygen consumption in endotoxin-induced sepsis. **Free Radic Biol Med.**, v.30, p. 129–138, 2001.

CARLSON BM, FAULKNER JA. The regeneration of skeletal muscle fiber following injury. A review. **Med Sci Sports Exerc**, v.15, p.187–198, 1983.

CARMELI, E; MOAS M; REZNICK AZ;COLEMAN R.. Matrix metalloproteinases and skeletal muscle: a brief review. **Muscle Nerve**, v. 29, p.191-7, 2004.

CHAMBERS, RL & McDERMOTH, J.C. Molecular basis of skeletal muscle regeneration. **Can J Appl Physiol.**, v.21, p.155-184, 1996.

CLANTON TL. Hypoxia-induced reactive oxygen species formation inskeletal muscle. **J Appl Physiol**, v. 10, p. 2379–2388, 2007.

CUZZOCREA S, THIEMERMANN C, SALVEMINI D. Potential therapeutic effect of antioxidant therapy in shock and inflammation. **Curr Med Chem.**, v.11, p.1147–1162, 2004.

DE BIE, R.A.; DE VET, H.; LENSSEN, T.F.; WILDENBERG, F.; KOOTSTRA, G. Low-level *laser* therapy in ankle sprains: a randomized clinical trial. **Arch. Phys. Med. Rehabil.**, v. 79, p. 1415-20, 1998.

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

DRÖGE W. Free radicals in physiological of cell function. **Physiol Rev.**, v. 82, p. 47-95, 2002.

FEIST, I. S.; De MICHEL, G.; CARNEIRO, S. R. S.; EDUARDO, C. P.; MIYAGI, S.; MARQUES, M. M.Adhesion and growth of cultured human gingival fibroblasts on

periodontally involved root surfaces treated by Er:YAG Laser. **J Periodontol.** (74): 1368-1375, 2003.

FILLIPIN LI, MAURIZ JL, VEDOVELLI K, MOREIRA AJ, ZETTLER CG, LECH O, MARRONI NP, GONZALEZ-GALLEGO J. Low-level laser therapy (LLLT) prevents oxidative stress and reduces fibrosis in rat traumatized Achilles tendon. **Lasers Surg Med.**, v.37, p.293–300, 2005.

FISHER BD, RENNIE S, WARREN S, MAGEE D, KOH J. The effects of low power laser therapy on muscle healing following acute blunt trauma. **J Phys Ther Sci.**, v. 12, p. 49–55, 2000.

FUJIMAKI Y, SHIMOYAMA T, LIU Q, UMEDA T, NAKAJI S, SUGAWARA K. Low-level laser irradiation attenuates production of reactive oxygen species by human neutrophils. **Laser Med Surg.**, v,21, p.165–170, 2003.

GARRRETT WE: Muscle strain injuries. **Am J Sports Med.**, p.24- 29, 1996.

GAVISH L, PEREZ L, GERTZ S. Low-Level Laser Irradiation Modulates Matrix Metalloproteinase Activity and Gene Expression in Porcine Aortic Smooth Muscle Cells. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.8, p.1-8, 2006.

GIGO-BENATO D, GEUNA S, ROCHKIND S. Phototherapy for enhancing Peripheral Nerve repair: a Reviw of the literature. **Muscle Nerve**, v. 31, p. 694-701, 2005.

GILAD E, WONG HR, ZINGARELLI B, VIRAG L, O'CONNOR M, SALZMAN AL, SZABO C. Melatonin inhibits expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase in murine macrophages: Role of inhibition of NFkappaB activation. **FASEB J.**, v.12, p. 685–93, 1998.

GOMEZ-CABRERA MC, BORRAS C, PALLARDO FV, SASTRE J, JI LL, VINA J. Decreasing xanthine oxidase-mediated oxidative stress prevents useful cellular adaptations to exercise in rats. **J Physiol.**, v.15, p.113–120, 2005.

GROUNDS, M.D. Towards understanding skeletal muscle regeneration. **Path Res Prat.**, v. 187, p. 1-22, 1991.

HARRIDGE, S. D. R. Ageing and local growth factors in muscle. **Scand J Med Sci Sports.** v. 13, p. 34-39, 2003.

HENSLEY K, ROBINSON KA, GABBITA SP, SALSMAN S, FLOYD RA. Reactive oxygen species, signaling and cell injury. **Free Radic Biol Med.**, v.10, p.1456–62, 2000.

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

HUARD J, LI Y, FU FH. Muscle injuries and repair: Current trends in research. **J Bone Joint Surg Am.**, v.84, p. 822– 32, 2002.

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

JAKUBIEC-PUKA, A. Et al. Contents of myosin heavy chains in denervated slow and fast rat leg muscles. **Comp Biochem Physiol.** v. 122B, p. 355-362, 1999.

JÄRVIEN M, LEHTO MUK: The effect of early mobilization and immobilization on the healing process following muscle injuries. **Sports Med**, v.15, p.78–89, 1993.

JARVINEN, T.A.H. Et al. Muscle strain injuries. **Curr Op Rheumatol**, v.12, p. 155-161, 2000.

KARU, T. I. Photobiological fundamentals of low-power laser therapy. **Journal of Quantum Electronics**, v. 23, p. 1703-17, 1987.

KHERIF S, LAFUMA C, DEHAUPAS M, LACHKAR S, FOURNIER JG, VERDIERE-SAHUQUE M, FARDEAU M, ALAMEDDINE HS. Expression of matrix

metalloproteinases 2 and 9 in regenerating skeletal muscle: a study in experimentally injured and mdx muscles. **Dev Biol.**, v.205, p. 158–170, 1999.

KIM F.S; HIRI D.A.; SNYDER S.H. Inducible Nitric Oxide Synthase Binds, S-Nitrosylates, and Activates Cyclooxygenase-2. **Science**, v. 319, p.1966- 1970, 2005.

KIM Y.G., PAK S.C., LEE S.R. Hairless mouse epidermal antioxidants and lipid peroxidation assessed by He-Ne *laser*. **Laser in Surgery and Medicine**, v.27; p.420-426, 2000.

KIRKENDALL DT, GARRETT JR WEJ. Clinical perspectives regarding eccentric muscle injury. **Clin Orthop.**, v.403, p. 81-92, 2002.

KITCHEN, S.S.; PARTRIDGE, C.J. A review of low level laser therapy. **Physiotherapy**, v. 77, n. 3, p. 161-8, 1991.

KOSKINEN SOA, WANG W, AHTIKOSKI AM, KJÆR M, HAN XY, KOMULAINEN J, KOVANEN V, TAKALA TES. Acute exercise induced changes in rat skeletal muscle mRNAs and proteins regulating type IV collagen content. **Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol**, v. 280, p. 1292–1300, 2001.

LAPOINTE, B.M.; FRÉMONT, P.; CÔTÉ, C.H. Influence of nonsteroidal anti-inflammatory drug treatment duration and time of onset on recovery from exercise-induced muscle damage in rats. **Arch Phys Med Rehabil.**, v. 84, p. 651-655, 2003.

LECARPENTIER Y, BLANC FX, QUILLARD J, HEBERT JL, KROKIDIS X, COIRAULT C. Statistical mechanics of myosin molecular motors in skeletal muscles. **J Theor Biol.**, v. 235, p. 381–392, 2005.

LEFAUCHEUR, J.P.; SÉBILLE, A. The cellular events of injured muscle regeneration depend on the nature of the injury. **Neuromuscul Disord.**, v. 5, n. 6, p. 501-509, 1995.

MAEGAWA, Y.; ITOH, T.; HOSOKAWA, T.; YAEGASHI, K.; NISHI, M. Effects of Near-Infrared low-level laser irradiation on microcirculation. **Laser in Surgery and Medicine.** (27): 427-437, 2000.

MARQUETI RC, PARIZOTTO NA, CHRIGUER RS, PEREZ SEA, SELISTRE-DE-ARAUJO HS. Androgenic-anabolic steroids associated with mechanical loading inhibit matrix metalloproteinase activity and affect the remodeling of the Achilles tendon in rats. **Am J Sport Med.**, v.34, p. 1274–1280, 2006.

MEDRADO AR, PUGLIESE LS, REIS SR, ANDRADE ZA. Influence of low level laser therapy on wound healing and its biological action upon myofibroblasts. **Lasers Surg Med.**, v.32, p.239–44, 2003.

MINAMOTO VB, BUNHO SR, SALVINI TF. Regenerated rat skeletal muscle after periodic contusions. **Braz J Med Biol Res.**, v.34, n.11, p.1447-52, 2001.

MINAMOTO, V. B.; GRAZZIANO C. R.; SALVINI, T. F. Effect of single and periodic contusion on the rat soleus muscle at different stages of regeneration. **Anat Rec.** v. 254, p. 281-287,1999.

MORRONE G, GUZZARDELLA GA, ORIENTI L, GIAVARESI G, FINI M, ROCCA M, TORRICELLI P, MARTINI L, GIARDINO R. Muscular trauma treated with a Ga-Al-As diode laser: In vivo experimental study. **Lasers Med Sci.**, v.13, p.293–8, 1998.

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

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Guide for the care and use of laboratory animals. Washington, DC, USA: National Academy Press, 1996.

OLIVEIRA N. M. L., RAINERO P. E., SALVINI T. F. Tree Intermittent sessions of cryotherapy reduce the secondary injury in skeletal muscle of rat. **Journal of Sports Science and Medicine**, v. 5, 228-234, 2006.

OLIVEIRA, N.M.L.; PARIZZOTO, N.A.; SALVINI, T.F. GaAs (904-Nm) laser radiation does not affect muscle regeneration in mouse skeletal muscle. **Lasers Surg Med.** v. 25, p. 13-21, 1999.

ORTIZ, M. S C.; MATTIELLO-ROSA, S. M.; SOARES, E. G.; PARIZOTTO, N. A. Influência do *laser* de baixa potência nos níveis das proteínas plasmáticas de coelhos. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v. 7, p. 187-194, 2003.

PAGE-MC CAW A, EWALD AJ, WERB Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, v.8, p.221-233, 2007.

PEVIANI SM, GOMES AR, MOREIRA RF, MORISCOT AS, SALVINI TF. Short bouts of stretching increase myo-D, myostatin and atrogin-1 in rat soleus muscle. **Muscle Nerve**, v.35, p.363-370, 2007.

POTAPOV AF, TREPILETS VE, MEL'NIK OB, SHILO VIU. Effects of intravasal laser irradiation of blood on lipid peroxidation in patients with abdominal surgery. **Anesteziol Reanimatol.**, v.1, p.19-22, 1995.

POWERS SK, KAVAZIS AN, MCCLUNG JM. Oxidative stress and disuse muscle atrophy. **J Appl Physiol.**, v, 102, p. 2389-2397, 2007.

RANTANEN, J. Et al. Effects of therapeutic ultrasound on the regeneration of skeletal myofibers after experimental muscle injury. **Am J Sports Med.** v. 27, n. 1, p. 54-59, 1999.

REID MB, KHAWLI FA, MOODY MR. Reactive oxygen in skeletal muscle. III. Contractility of unfatigued muscle. **J Appl Physiol.**, v. 75, p. 1081-1087, 1993.

REID MB. Redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. **J Appl Physiol.**, v. 90, p.724–731, 2001.

SAKURAI Y, YAMAGUCHI M, ABIKO Y. Inhibitory effect of low-level laser irradiation on LPS-stimulated prostaglandin E2 production and cyclooxygenase-2 in human gingival fibroblasts. **Eur J Oral Sci.**, v.; 34, p.108, 2000.

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

SALVINI, T.F. Et al. The effect of cryotherapy and treadmill exercise on the mouse soleus muscle damage. **Rev. Bras. Fisiot.** v.2, n.2, p.77 - 86, 1997.

SATO K, LI Y, FOSTER W, FUKUSHIMA K, BADLANI N, ADACHI N, USAS A, FU FH, HUARD J. Improvement of muscle healing through enhancement of muscle regeneration and prevention of fibrosis. **Muscle Nerve**, v. 28, p.365–72, 2003.

SERRÃO, F.V. Et al. Functional changes of human quadriceps muscle injured by eccentric exercise. **Braz J Med Biol Res.** v. 36, n. 6, p. 781-786, 2003.

SHEFER G, BARASH I, ORON U, HALEVY O. Low-energy laser irradiation enhances de novo protein synthesis via its effects on translation-regulatory proteins in skeletal muscle myoblasts. **Biochim Biophys Acta.**, v.1593, p.131–139, 2003.

STADLER I, LANZAFAME RJ, EVANS R, NARAYAN V, DAILEY B, BUEHNER N, NAIM JO. 830-nm irradiation increases the wound tensile strength in a diabetic murine model. **Lasers Surg Med.**, v. 28, p.220–222, 2001.

STAMENKOVIC, I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. **Semin Cancer Biol.**, v.10, p.415-433, 2000.

STAMLER, J. S., MEISSNER, G. Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. **Physiol. Rev.**, v. 81, n. 1, p. 209-237, 2001.

STERNLICHT MD, WERB Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. **Ann Rev Cell Dev Biol.**, v.17. p. 463–516, 2001.

TIDBALL J G, WEHLING-HENRICKS M. The role of free radicals in the pathophysiology of muscular dystrophy. **J Appl Physiol.**, v.102, p.1677–1686, 2007.
TIDBALL J G. Inflammatory processes in muscle injury and repair **Am J Physiol Regul Integr Comp Physio.**, v. 288, p.345–353, 2005.

TURNER & HODE. Laser therapy- Clinical practice and scientific background, **Primas Book**, 2003.

VANE JR, BAKHLE YS, BOTTING RM. Cyclooxygenases 1 and 2. **Ann Rev Pharmacol Toxicol.**, v. 38, p. 97–120, 1998.

VASSILAKOPOULOS T, HUSSAIN SN. Ventilatory muscle activation and inflammation: cytokines, reactive oxygen species, and nitric oxide. **J Appl Physiol.**, v.102, p 1687–1695, 2007.

VENOJARVI, M. Recovery from immobilization responses of fast-twitch muscle fibres to spontaneous and intensive exercise in rat calf muscles. **Pathophys.** v. 11, p. 17-22, 2004.

VERMA RP, HANSCH C. Matrix metalloproteinases (MMPs): Chemical–biological functions and (Q)SARs. **Bioorg Med Chem.**, v.15, p. 2223– 2268, 2006.

VLADIMIROV Y. A, GORBATENKOVA EA, PARAMONOV NV, AZIZOVA OA. Photoreactivation of superoxide dismutase by intensive red (laser) light. **Free Radic Biol Med.**, v.5, p.281-86, 1988.

VLADIMIROV Y. A., OSIPOV A.N. , and KLEBONOV G.I. Photobiological principles of Therapeutic applications of *laser* radiation. **Biochemistry**, v.69, p.81- 90, 2004.

VU, T. H.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. **Gene. Dev.**, v.14, p.2123-2133, 2000.

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

WILDEN, L.; KARTHEIN, R. Import of radiation phenomena of electrons and therapeutic low-level *laser* in regard to the mitochondrial energy transfer. **Journal of Clinical Laser Medicine & Skurgery**, v.16, p. 159-165, 1998.

YAAKOB, SHOSHANY Y., LEVKOVITZ S., RUBIN O., HAIM S.B.A., ORON U. Long – term effects of low energy *laser* irradiation on infarction and reperfusion in the rat heart. **Journal of Applied physiology**, v.90, p. 2411-2419, 2001.

ZHANG, F.; OSWALD, T.; LIN, S.; CAI, Z.; LEI, M.; JONES, M.; ANGEL, M.F.; LINEAWEAVER, W.C. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and the effect of exogenous VEGF on survival of a random flap in the rat. **Br. J. Plast. Surg.**, v. 56, n. 7, p. 653-9, 2003.