



ROBERTA DE MATOS BRUNELLI

***“OS EFEITOS DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA NO
PROCESSO DE REPARO MUSCULAR APÓS
CRIOLESÃO EM RATOS”***

CAMPINAS
2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÊDICAS

ROBERTA DE MATOS BRUNELLI

***“OS EFEITOS DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA NO
PROCESSO DE REPARO MUSCULAR APÓS
CRIOLESÃO EM RATOS”***

Orientadora: Dra. Daniela Cristina Carvalho de Abreu

Co-orientador: Dr. Alberto Cliquet Junior

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-
Graduação em Ciências da Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas - UNICAMP para obtenção do Título de Mestra em Ciências.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA
DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA ROBERTA DE
MATOS BRUNELLI E ORIENTADA PELA PROFA. DRA.
DANIELA CRISTINA CARVALHO DE ABREU

ASSINATURA DO ORIENTADOR

CAMPINAS

2013

iii

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

B835e Brunelli, Roberta de Matos, 1985-
Os efeitos do laser de baixa potência no processo de
reparo muscular após criolesão em ratos / Roberta de
Matos Brunelli. -- Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador : Daniela Cristina Carvalho de Abreu.
Coorientador : Alberto Cliquet Junior.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Lasers. 2. Proteína MyoD . 3. Miogenina. I. Abreu,
Daniela Cristina Carvalho de. II. Cliquet Junior, Alberto,
1957-. III. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: The effects of low-level laser therapy on muscle healing process after cryolesion.

Palavras-chave em inglês:

Lasers

Proteína MyoD

Myogenin

Keyword

Keyword

Área de concentração: Fisiopatologia Cirúrgica

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Daniela Cristina Carvalho de Abreu [Orientador]

Simone Appenzeller

Rinaldo Roberto de Jesus Guirro

Data da defesa: 18-02-2013

Programa de Pós-Graduação: Ciências da Cirurgia

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

ROBERTA DE MATOS BRUNELLI

Orientador (a) PROF(A). DR(A). DANIELA CRISTINA CARVALHO DE ABREU

MEMBROS:

1. PROF(A). DR(A). DANIELA CRISTINA CARVALHO DE ABREU *Daniela Carvalho*
2. PROF(A). DR(A). SIMONE APPENZELLER *Simone Appenzeller*
3. PROF(A). DR(A). RINALDO ROBERTO DE JESUS GUIRRO *Rinaldo R. de Jesus*

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Data: 18 de fevereiro de 2013

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Antonio e Beatriz.

As minhas irmãs Daniela e Bruna.

Ao meu namorado Rafael.

AGRADECIMENTOS

A Deus... por tudo!

Aos meus pais pelo amor, apoio e incentivo em todas as etapas da minha vida. Vocês são meu exemplo, minha força, meu porto seguro. Amo vocês!

A minha orientadora Dra. Daniela Abreu por abrir as portas para realização deste sonho, pela confiança em mim depositada, pela paciência, pelas correções, pelo exemplo de professora, orientadora, amiga, aprendi muito. Foi muito bom poder contar com você!

Ao meu co-orientador Dr. Cliquet pela oportunidade da realização deste sonho.

A Dra. Ana Claudia Renno e Natália Rodrigues por me aceitarem no projeto, pelos ensinamentos e prática com experimentos animais, pela paciência e correções. Sem vocês esse trabalho não aconteceria.

As colegas do laboratório da UNIFESP, Livia, Ângela e Kelly e ao Dr. Daniel Ribeiro, pela grande ajuda nas análises de imunohistoquímica.

Aos colegas do laboratório da UFSCAR.

Aos colegas do laboratório da USP.

A Dra. Rogéria Lara e ao Dr. Nelson por abrir as portas do laboratório para realização das análises.

As minhas irmãs, por sempre estar ao meu lado, pelo amor, amizade, carinho.

Aos meus cunhados Leandro e Rodrigo pela amizade e ao meu afilhado Eduardo pelos momentos de alegria e descontração.

Ao meu namorado Rafael, pela grande ajuda na parte gráfica deste trabalho, pela companhia, paciência, por estar sempre presente.

Aos meus primos e amigos pelo companheirismo e amizade.

A Maria Carmen (Tata), ao meu amigo Dom Anselmo aos meus padrinhos e madrinhas Maria, Antonio, Nilcéia e Luverci pelo amor e incentivo sempre. Aos amigos do santuário das 7 capelas pelas orações.

A CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi verificar os efeitos da laserterapia de baixa potência no comprimento de onda $\lambda=780\text{nm}$ entre diferentes períodos de tratamento 7, 14 e 21 dias e verificar a dose ($10\text{J}/\text{cm}^2$ ou $50\text{J}/\text{cm}^2$) que promove melhor reparo muscular através das análises histopatológicas e imunohistoquímicas. Foram utilizados 54 ratos machos divididos em 3 grupos: GC: grupo controle (criolesão, sem tratamento); G10: criolesão do músculo tibial anterior (TA) e tratados com laser dose $10\text{J}/\text{cm}^2$ e G50: criolesão do músculo TA e tratados com laser dose $50\text{J}/\text{cm}^2$ que foram subdivididos em 3 subgrupos ($n=6$): 7, 14 e 21 dias de tratamento. Os achados histopatológicos revelaram maior organização das fibras musculares dos grupos tratados com laser $10\text{J}/\text{cm}^2$ e $50\text{J}/\text{cm}^2$ durante os períodos 7 e 14 dias em relação ao grupo controle; no período 21 dias os grupos apresentaram semelhanças na reparação tecidual. Em relação a área da lesão os grupos tratados com laser $10\text{J}/\text{cm}^2$ e $50\text{J}/\text{cm}^2$ durante 7 dias obtiveram diminuição significativa ($p < 0.05$) da área da lesão em relação ao grupo controle, sendo que os grupos 14 e 21 dias não apresentaram diferenças significativas entre eles. Na contagem dos vasos o grupo tratado com laser $10\text{J}/\text{cm}^2$ no 14º dia apresentou aumento dos vasos em relação ao grupo tratado com dose $50\text{J}/\text{cm}^2$, mas não em relação ao grupo controle. Nos tempos de 7 e 21 dias os grupos não apresentaram diferença significativa entre si. Com relação as análises imunohistoquímicas da myoD no período de 7 dias os grupos tratados com laser $10\text{J}/\text{cm}^2$ e $50\text{J}/\text{cm}^2$ apresentaram maior imunomarcagem comparada com o grupo controle, no período 14 e 21 dias a imunomarcagem estava ausente. A imunomarcagem da miogenina estava presente de forma semelhante nos períodos 7 e 14 dias para os três grupos analisados e no período 21 dias a imunomarcagem da miogenina estava ausente em todos grupos experimentais. Os resultados mostraram que o laser possui efeitos positivos no reparo muscular.

Palavras chave: recurso físico, análise histológica qualitativa, contagem dos vasos, área da lesão, MyoD, miogenina.

ABSTRACT

The objective of this study was to assess the effects of 780nm low-level laser therapy at different periods of 7, 14 and 21 days after cryolesion, including the dose (10 or 50J/cm²) to promote a better muscle repair evidenced by histopathological and immunohistochemical analyses. Fifty-four male rats were divided into three groups: injured control group (CG) – injured animals without any treatment; injured 780nm laser treated group, at 10 J/cm² (G10) and injured 780nm laser treated group, at 50 J/cm² (G50). Each group was divided into 3 subgroups (n=6): 7, 14 and 21 days post-injury. Histopathological findings revealed better-organised muscle fibres in the G10 and G50 during the periods of 7 and 14 days compared to CG. The G10 and G50 during 7 days showed a significant reduction ($p < 0.05$) of lesion area compared to CG, without differences between groups treated for 14 and 21 days. The G10 showed an increase of the amount of vessels after 14 days compared to the G50, but not in relation to controls. With regard to the immunohistochemical analyses of the MyoD factor, The G10 and G50 during 7 days showed higher concentrations of immunomarkers than controls. Myogenin immunomarkers were similarly observed at days 7 and 14 in all three groups analysed, whereas immunomarkers were found in none of the groups after 21 days of laser therapy. The results showed that laser has positive effects on muscle repair.

Keywords: physical resource, qualitative histological analysis, vessel counting, lesion area, MyoD, myogenin.

LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

Figura I - Foto ilustrativa da fibra muscular.....	16
Figura II - Foto ilustrativa da lesão muscular.....	19
Figura III - Foto ilustrativa da criolesão no ventre no TA.....	28
Figura IV - Foto ilustrativa da análise da área da lesão.....	30
Figura V - Foto ilustrativa da contagem dos vasos.....	31
Figura 1 - Fotos histológicas dos grupos experimentais.....	41
Figura 2 - Tabela da área da lesão.....	42
Figura 3 - Tabela da contagem dos vasos.....	43
Figura 4 - Fotos Myod dos grupos experimentais.....	44
Figura 5 - Fotos miogenina dos grupos experimentais.....	45

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C - graus Celsius

CG - Grupo de animais que foram submetidos à criolesão, mas não receberam nenhum tratamento

cm - centímetro

cm² - centímetros quadrado

FRM - fatores regulatórios miogênicos

g - gramas

GaAs - arseneto de gálio

Ga-Al-As - Arseneto de Gálio e Alumínio

G10 - Grupo de animais que foram submetidos à criolesão e tratados com laser λ 780nm e dose de 10J/cm²

G50 - Grupo de animais que foram submetidos à criolesão e tratados com laser λ 780nm e dose de 50J/cm²

h - hora

HE - hematoxilina e eosina

HeNe - Hélio neônio

HGF - fator de crescimento de hepatócitos

IgG - imunoglobulina

J - Joule

J/cm² - Joules por centímetros quadrado

KCL - cloreto de potássio

mg/kg - miligramas por kilogramas

mm² - milímetros quadrado

mL - mililitros

mW - miliwatt

n - número descritivo do tamanho da amostra

nm - nanômetro

PBS - Solução-tampão Salina

pH - Potencial hidrogeniônico

SP - São Paulo

TA - Tibial Anterior

UFSCar - Universidade Federal de São Carlos

VEGF - fator de crescimento endotelial vascular

X - vezes

W - Watt

um - Micrômetro

< - menor

% - por cento

λ - comprimento de onda

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 TECIDO MUSCULAR	15
1.2 LESÃO E REGENERAÇÃO MUSCULAR.....	16
1.3 LASER.....	21
II. OBJETIVO.....	25
III. MÉTODO.....	26
IV. ARTIGO.....	33
V. DISCUSSÃO.....	52
V. CONCLUSÃO.....	55
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
VII. ANEXO.....	58

I. INTRODUÇÃO

1.1 TECIDO MUSCULAR

O músculo esquelético representa uma grande massa de tecido no corpo humano, constituindo cerca de 40% a 50% do seu peso total. É uma estrutura composta de células musculares, e uma rede organizada por nervos, vasos sanguíneos, e uma matriz extracelular. Isto é necessário tanto para a produção de movimento articular, locomoção e para ajudar o processo de regeneração que ocorre após a lesão (HUARD et al., 2002).

O elemento básico do músculo são as fibras musculares. As fibras musculares são formadas pela fusão de vários mioblastos (células precursoras das fibras musculares), que se fundem para formar miotubos que são longos, cilíndricos e multinucleados e exibem núcleos centralizados. Quando o núcleo se move da posição central para a região subsarcolemal é denominado fibra muscular. O sarcolema é a membrana plasmática da fibra muscular. A lâmina basal é a camada externa do tecido conjuntivo e entre o sarcolema e a lâmina basal ficam as células satélites que são fontes de núcleos para a formação de novas miofibras (HUARD et al., 2002). As células satélites são células indiferenciadas, mononucleadas e permanecem em estado de quiescência (repouso) até receberem algum estímulo como crescimento, remodelação ou trauma, onde são ativadas, proliferam-se e expressam marcadores da linhagem miogênica, como por exemplo os fatores regulatórios miogênicos (FRM) (FOSCHINI et al., 2004).

As fibras musculares são as unidades básicas contráteis do músculo esquelético, são ricas em tecido conjuntivo e altamente vascularizadas, os quais proporcionam nutrientes essenciais para a função muscular. São inervadas pelo neurônio motor, os

quais são responsáveis pela contração da fibra muscular. Assim, as propriedades funcionais do músculo esquelético dependem da manutenção de uma estrutura complexa de miofibras, neurônios motores, vasos sanguíneos, e da matriz extracelular do tecido conjuntivo (CHARGE et al., 2004). A figura I ilustra a imagem de um músculo com seus componentes: miofibra, sarcolema, célula satélite, mionúcleo, neurônio motor, vaso sanguíneo.

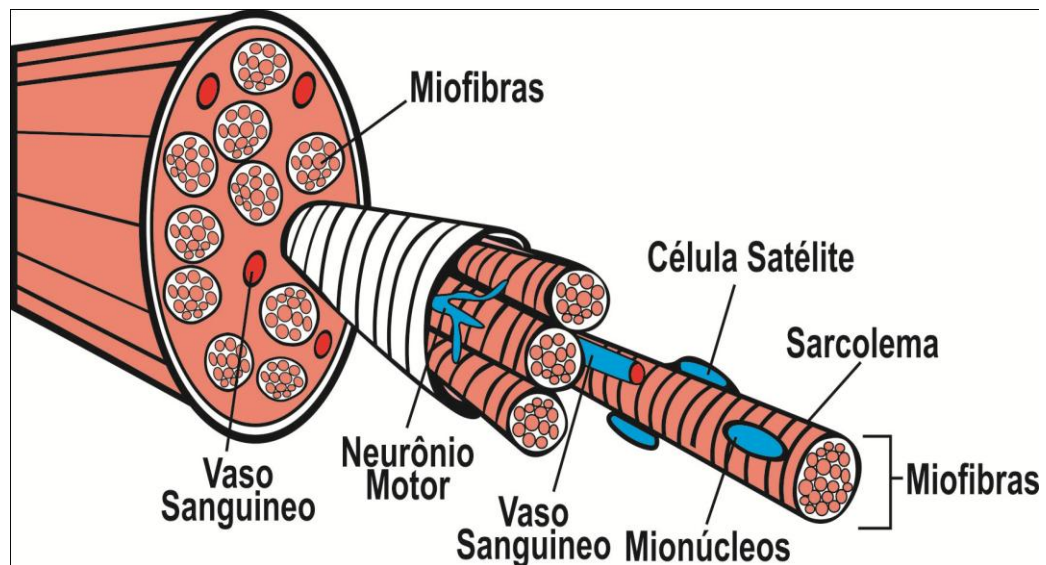


Figura I – Ilustração da fibra muscular e seus componentes: miofibras, célula satélite, mionúcleo, sarcolema, vaso sanguíneo e neurônio motor. Imagem modificada de <http://tomaiolominutestomuscles.blogspot.com.br/2011/01/hipertrofia-e-estimulo-de-celulas.html>

1.2 LESÃO E REGENERAÇÃO MUSCULAR

Quando o músculo esquelético é traumatizado, ocorre uma degeneração no local, seguida pela regeneração (FISHER et al., 2000). A lesão muscular é um trauma comum que pode causar dor e incapacidade, levando a um comprometimento tanto nas atividades ocupacionais quanto nas de lazer (DAWOOD et al., 2012). Podem ser

causadas por diversos mecanismos: trauma direto (tensão, contusão ou laceração), sendo as mais comuns, e trauma indireto (isquemia e disfunções neurológicas) (HUARD et al., 2002).

A manifestação clínica do paciente, indicativa indireta da lesão muscular, dependerá da gravidade e da natureza da lesão, a qual pode ser dividida em 3 fases: a) grau I (leve): com poucas fibras lesadas, pequena dor e edema, e mínima perda de força e movimento; b) grau II (moderada): apresenta um número maior de fibras lesadas com perda de força, edema e desconforto moderados; c) grau III (grave): grande lesão muscular, com perda total da função do músculo (JARVINEN et al., 2007). A inflamação é um processo que ocorre após o tecido ser lesado, mas sua continuidade é sempre indesejável, pois acarreta em atrofia, contraturas, dor e aumento da probabilidade de ter uma recidiva (ALFREDO et al., 2008).

O reparo deste tecido é um processo dinâmico e interativo, que envolve várias mudanças bioquímicas e celulares (SILVEIRA et al., 2009). Segundo Baptista et al. (2010), o músculo esquelético possui boa capacidade de recuperação após lesões.

O processo de reparação muscular apresenta uma sequência de eventos que pode ser dividida em três fases: a) Fase da degeneração ou fase inflamatória: caracterizada pela ruptura e necrose do tecido muscular lesado e a formação de edema e hematoma, onde os neutrófilos invadem rapidamente o local da lesão e promovem inflamação pela liberação de citocinas que podem atrair e ativar células inflamatórias adicionais, além de um aumento no número de macrófagos que invadem a fibra muscular lesada e realizam fagocitose. b) Fase proliferativa ou de reparo: acontece a fagocitose do tecido necrosado, coagulação de fibrina, proliferação de fibroblastos e miofibroblastos, além de crescimento sinovial e capilar, como também o aumento de uma segunda subpopulação de macrófagos que está associado com a regeneração muscular. c) Fase

de maturação e remodelamento: ocorre a maturação das miofibras, diminuição do volume de capilares, as fibras de colágeno tipo I começam a se organizar e finalmente ocorre a restauração da capacidade funcional do músculo reparado (JARVINEN et al., 2007).

Quando o músculo esquelético é lesado vários mecanismos são ativados. Esses mecanismos incluem a ativação das células satélites, expressão de vários fatores de crescimento e a angiogênese. A importância das células satélites tem sido documentada durante o crescimento normal do músculo, hipertrofia, regeneração e recuperação após a atrofia (NAKANO et al., 2009).

As fibras musculares lesadas podem regenerar-se a partir do sarcolema das células musculares e da atividade de células satélites (Figura II). Na lesão muscular as miofibras sofrem necrose, e esta área é invadida por pequenos vasos sanguíneos, células mononucleadas, macrófagos e linfócitos T que liberam as citocinas e os fatores de crescimento que regulam a proliferação e diferenciação de mioblastos. Esta fase está associada com a liberação de células satélites. As células satélites sob influência dos fatores de crescimento, tornam-se ativas, proliferam-se e diferenciam-se em miotubos multinucleados e em seguida em miofibras regeneradas. As células satélites desempenham uma importante função no processo de regeneração muscular, pois contribuem como doadoras de núcleos adicionais para a fibra muscular danificada, aumentando a síntese de proteínas, já que os núcleos das fibras musculares não se dividem. Desta forma, a ativação, a proliferação e a fusão da célula satélite conferem ao tecido muscular uma capacidade de adaptação em condições de regeneração, com uma recuperação muscular após lesão (CHARGE et al., 2004; ZHANG et al., 2010).

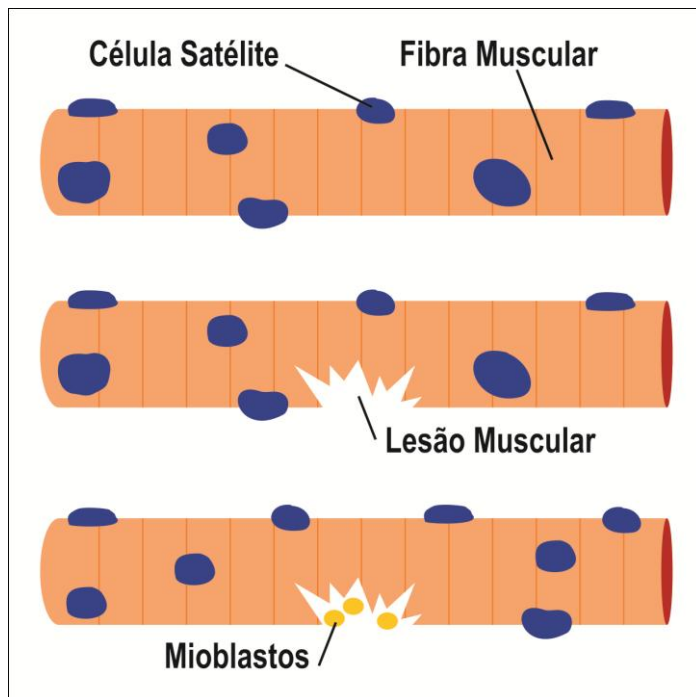


Figura II –Ilustra a localização das células satélites na fibra muscular e a proliferação e transformação destas células em mioblastos (bolas amarelas), os quais são os precursores da fibra muscular, permitindo a regeneração da área lesada. Imagem modificada de <http://professorandersonef.blogspot.com.br/2011/04/normal-0-21-false-false-false.html>

As células satélites quiescentes não apresentam marcadores regulatórios miogênicos (FRM), mas quando o músculo é lesado ou essa célula é ativada a MyoD é induzida em 12 horas.

Os FRM atuam como proteínas reguladoras de transcrição que se ligam a numerosos genes músculos-específicos. Fazem parte dos FRM: a myoD, miogenina, myf5 e mrf4. Está bem estabelecido que a myoD e a miogenina tem um papel importante durante a embriogênese e miogênese neonatal. Recentemente descobriu sua função regulatória no processo de plasticidade, adaptação e regeneração no músculo adulto (DEDKOV et al. 2003; CARVALHO et al. 2006). A myoD é responsável pela

proliferação de mioblastos, enquanto que a miogenina regula a diferenciação terminal das células musculares (MCKAY et al., 2008). Alterações na expressão dos FRM podem modificar a capacidade de regeneração muscular (SOUZA et al., 2010).

Na regeneração muscular ocorre o crescimento de novos vasos sanguíneos (angiogênese). A angiogênese está fortemente relacionada com o crescimento muscular, pois fornecem nutrientes e oxigênio para os tecidos em crescimento. Após a lesão, células endoteliais microvasculares iniciam um processo que consiste na ativação de células endoteliais, degradação local da membrana basal, proliferação celular, formação de estrutura tubular e reconstrução da membrana basal. Citocinas liberadas pelos macrófagos estimulam a angiogênese durante a cicatrização do tecido, assim como o baixo teor de oxigênio (LI et al., 2007). Vários fatores de crescimento também tem papel importante na angiogênese, dentre eles o fator de crescimento endotelial (VEGF), que exerce sua atividade biológica em células endoteliais. O VEGF é o principal regulador da formação de vasos sanguíneos e um potente indutor da neovascularização durante a fase adulta (ARSIC et al., 2004).

Embora a regeneração muscular seja um processo esperado após a lesão do músculo, o seu tratamento conservador por meio da fisioterapia é muito procurado, principalmente em casos de lesões musculares extensas e em situações que ocorre o atraso do reparo muscular, como no caso de idosos.

Vários recursos são utilizados nas clínicas de fisioterapia para tratar a lesão muscular: crioterapia, ultrassom, antiinflamatórios, imobilização e exercício, tendo como objetivo a modulação dos sinais e sintomas do quadro inflamatório e da regeneração muscular. A irradiação laser de baixa potência também é um recurso utilizado na reparação do tecido muscular lesado, pois ele pode ser usado no tratamento

de processos inflamatórios, na bioestimulação celular e alívio da dor (KREISLER et al., 2003; NAKANO et al., 2009; SILVEIRA et al., 2011; SANTOS et al., 2010).

1.3 LASER

O laser é um acrônimo de Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation (Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação). A radiação é constituída por ondas eletromagnéticas, visíveis ou não de acordo com o comprimento de onda das mesmas. A amplificação da luz explica-se pela alta concentração de energia que aporta, consequências do grande número de fótons dos quais é constituída (BUSSULO et al., 2003).

Os feixes de luz monocromática e coerente são propriedades do laser capazes de induzir reações fotobiológicas quando absorvidas por moléculas fotorreceptoras conhecidas como cromóforos (conjunto de moléculas que podem ser enzimas, membranas ou outra substância capaz de absorver a luz) presentes nos tecidos do corpo irradiado. Os fótons contidos no laser tem a capacidade de alterar a estrutura dos cromóforos, levando-os a estados eletronicamente excitados que desencadeiam processos biológicos nas células (SANTOS et al., 2010). Segundo Silveira et al. (2009), o laser pode promover mudanças no estado redox (reações de transferência de elétrons) da célula, tendo um papel importante em manter as atividades celulares. Dawood et al. (2012) apontam que o laser de baixa potência acelera a iniciação de reações na membrana celular pelo efeito foto-físico nos canais de cálcio e essas mudanças na permeabilidade da membrana causam o aumento de macrófagos, fibroblastos e atividade dos linfócitos.

O efeito da laserterapia de baixa potência no tratamento tecidual tem sido muito estudado, pois sua eficácia para estimular a proliferação celular e promover o processo

de regeneração ainda é discutida na literatura (MESQUITA-FERRARI et al., 2011; SILVEIRA et al., 2011; OLIVEIRA et al., 1999; FRIGO et al., 2010; SILVEIRA et al. 2009; FISHER et al. 2000; AMARAL et al., 2001).

Segundo Santos et al. (2010), os efeitos biológicos da terapia laser de baixa potência dependem diretamente dos parâmetros adotados para a sua aplicação. A sua potência óptica útil (energia emitida em um segundo) em Watts ou miliWatts, a área do feixe de saída do laser em centímetros quadrados (cm^2) e o tempo de irradiação em segundos são os parâmetros básicos usados para calcular os parâmetros como: dose aplicada (energia total transmitida por um feixe laser por unidade de área do feixe de saída) descrita em densidade de energia em Joules por área em cm^2 (J/cm^2) e a energia (energia total transmitida por um feixe laser) descrita em Joules.

Em relação ao comprimento de onda do laser (distância percorrida entre dois picos consecutivos da trajetória da luz) em nanômetros (nm), os efeitos anti-inflamatório e estimulante podem ser obtidos entre 630nm e 1064nm. Os lasers infravermelhos (que incluem os comprimentos de ondas entre 780nm e 1064nm) têm maior poder de penetração de modo que uma parte significativa dos seus fótons podem atingir os tecidos mais profundos do corpo. Em contraste, a luz vermelha (que incluem os comprimentos de ondas entre 630nm e abaixo de 780nm) é mais eficiente em camadas superficiais, uma vez que a maioria dos seus fótons é absorvida pelos tecidos localizados nesta profundidade (SANTOS et al., 2010).

O laser de baixa potência atua na diminuição da dor, no processo inflamatório, estimula à produção do colágeno, proliferação dos fibroblastos e a microvascularização local, aumentando assim o metabolismo celular e o potencial regenerativo (SILVEIRA et al., 2011). Segundo Veçoso (1993) o efeito analgésico do laser se explica pela manutenção do potencial de membrana, já que a mensagem elétrica promove uma

despolarização, esse processo de inversão de polaridade seria dificultado e, como consequência, proporcionaria uma menor sensação dolorosa. A eliminação de, por exemplo, substâncias ácidas, ou outras consequentes de fagocitose, que sensibilizam os receptores dolorosos, também favorecem a analgesia local. Segundo Nakano et al. (2009), o laser estimula a proliferação das células satélites, a angiogênese e a expressão dos fatores de crescimento.

Segundo Silva et al. (2011), outro benefício do laser na regeneração muscular é estimular a proliferação das células satélites. Em seu estudo, avaliaram a irradiação laser AsGa (904 nm) nas densidades de energia 1.5J ou 3J na recuperação da fibra muscular durante a regeneração do músculo esquelético previamente lesados por crotoxina, no qual observaram uma diminuição da necrose e da inflamação e um aumento na angiogênese no grupo tratado com laser 3J, acelerando assim a recuperação da fibra muscular. Cressoni et al. (2008), avaliaram os efeitos do laser (785nm) densidade de energia 0.9J por ponto, sendo 2.7J por sessão na regeneração muscular após lesão, observaram que o laser estimulou a proliferação de fibroblastos, diminuiu a fase inflamatória, favorecendo o processo de regeneração.

Rizzi et al. (2010) analisaram os efeitos do laser (AsGa 780nm) dose 20J/cm² no músculo masseter em diferentes tempos de tratamento (3, 6 e 10 dias) e observaram um aumento no metabolismo das fibras musculares. Já Amaral et al. (2001) aplicaram o laser HeNe (632.8nm) com diferentes doses (2.6, 8.4 e 25J/cm²) em músculos lesados durante 5 dias, sendo que apenas o grupo tratado com laser dose 2.6J/cm² apresentaram aumento na densidade das mitocôndrias e das fibras musculares.

Adicionalmente, é possível observar que ainda não há um consenso na literatura sobre os melhores parâmetros a serem utilizados para a terapia de laser de baixa potência. Portanto, devido a ausência de consenso na literatura sobre os melhores

parâmetros de laser de baixa potência, justifica-se a realização deste estudo, o qual buscou auxiliar na determinação dos melhores parâmetros para a regeneração muscular ao comparar doses mais altas com doses mais baixas, informação relevante para a aplicação da terapia a laser com mais segurança durante a prática clínica.

II. OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi verificar os efeitos da laserterapia de baixa potência para regeneração muscular em ratos após a lesão muscular por criolesão, utilizando o comprimento de onda de $\lambda=780\text{nm}$.

Objetivos específicos:

- Verificar a dose (10J/cm^2 ou 50J/cm^2) que promove melhor reparo muscular por meio da análise histopatológica qualitativa, área da lesão e contagem dos vasos.
- Verificar a dose (10J/cm^2 ou 50J/cm^2) que promove melhor expressão dos fatores regulatórios miogênicos MyoD e miogenina, por meio da análise imunohistoquímica.
- Verificar os efeitos do laser em diferentes períodos de tratamento entre 7, 14 e 21 dias.

III. MÉTODO

Animais

A pesquisa foi desenvolvida utilizando, 54 ratos machos da espécie Wistar (peso: 300 ± 20 g). Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas (máximo de três animais por caixa). Todos os animais tiveram livre acesso à água e ração peletizada e foram submetidos a um controle ambiental de luminosidade (ciclo claro/escuro de 12h) e temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$). Todo o estudo foi realizado de acordo com as normas internacionais de bioética para experimento que utiliza modelo animal. Este estudo foi aprovado pelo Comitê da Universidade Federal de São Carlos – 003/2010.

Grupos experimentais e tratamento

Os animais foram divididos aleatoriamente em 3 grupos experimentais: **CG**: Os animais foram submetidos à criolesão, mas não receberam nenhum tratamento; **G10**: Os músculos dos ratos foram submetidos à criolesão e tratados com laser λ 780nm e dose de $10\text{J}/\text{cm}^2$ e **G50**: Os músculos dos ratos foram submetidos à criolesão e tratados com laser λ 780nm e dose de $50\text{J}/\text{cm}^2$. Cada grupo foi subdividido em 3 diferentes subgrupos ($n=6$) e nos dias 7, 14 e 21 pós-lesão os ratos foram sacrificados. Após os diferentes períodos, os músculos foram retirados e os animais foram eutanaziados.

Os tratamentos começaram 48 horas após a cirurgia e foram realizados diariamente por 5, 10 e 15 sessões para os tempos 7, 14 e 21 dias respectivamente. O protocolo de tratamento proposto foi com o intuito de repetir o mesmo padrão de tratamento realizado na clínica, onde os tratamentos são realizados apenas durante os dias úteis, ou seja, de segunda-feira à sexta-feira.

Técnica cirúrgica

Os animais foram inicialmente pesados e posteriormente anestesiados de acordo com o peso corporal por meio de injeção intraperitoneal de solução composta por Cloridrato de Ketamina (40mg/kg) e Cloridrato de Xilazina (20mg/kg). O músculo submetido ao procedimento de criolesão foi o tibial anterior (TA) direito. Em seguida, a pele que recobre o TA direito foi tricotomizada e limpa, sendo então realizada uma incisão longitudinal (de aproximadamente 1cm) na região correspondente ao ventre do músculo. Para a correta exposição do músculo TA direito, foi necessário, ainda, o afastamento da fáscia que o recobre.

A lesão tecidual foi induzida por congelamento (criolesão) na região central do ventre do músculo TA. Para isso, um bastão de ferro com uma ponta de 0.5cm², previamente imerso em nitrogênio líquido, foi pressionado transversalmente contra o ventre do músculo por 10 segundos. Após novo resfriamento do bastão, esse procedimento foi repetido e em seguida a pele foi suturada (Fio Nylon 3-0 – SHALON Ltda) e limpa com álcool iodado. (FiguraIII). Esta metodologia foi previamente testada no laboratório de Neurociências, Unidade de Plasticidade Muscular da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), e foi escolhida como forma de padronizar a lesão muscular.

Nos dias 7, 14 e 21 pós-lesão, os animais foram sacrificados com sedação profunda e overdose de ketamina e Xilazina (0,5 mL cada), a fim de extrair o músculo tibial anterior (TA), que após seccionado os tendões, foi colocado em formalina tamponada.

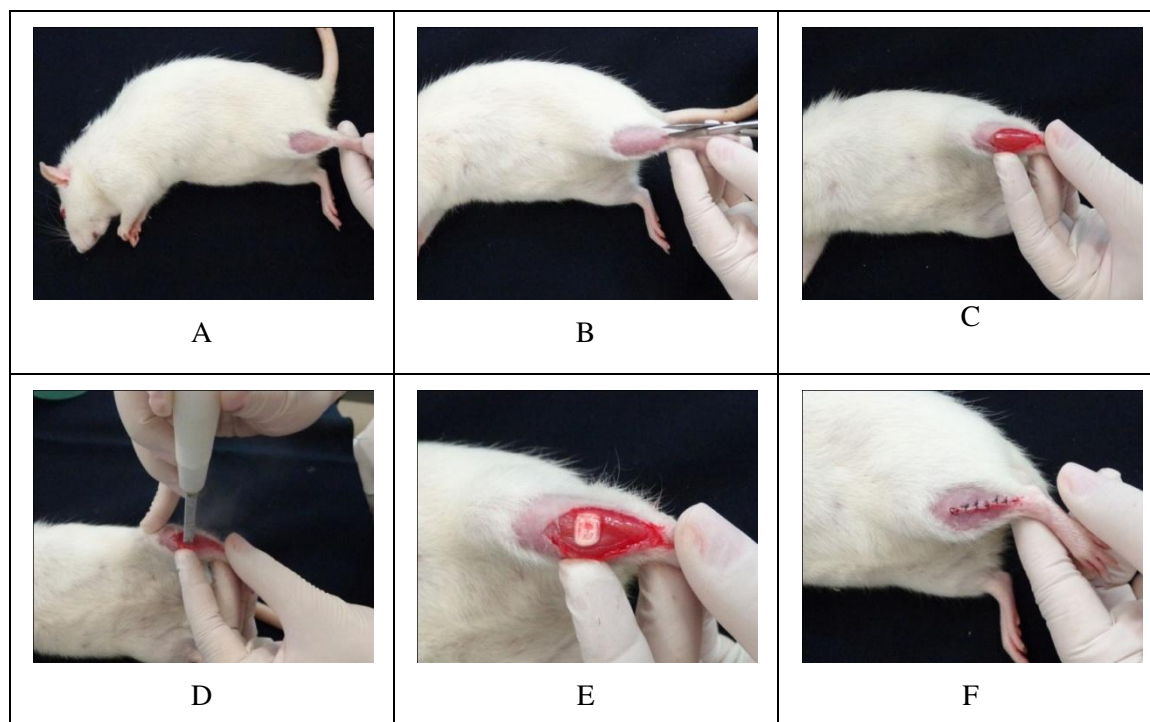


Figura III – Foto ilustrativa da criolesão no ventre do Tibial Anterior (TA). A) Tricotomia do pelo do rato. B) Incisão longitudinal. C) Exposição do músculo TA. D) Criolesão. E) TA lesado. F) Sutura da pele do rato.

Fontes de luz

Foi utilizado o equipamento emissor de luz laser diodo Ga-Al-As (MM Optics, São Carlos, SP, Brasil), comprimento de onda 780 nm, modo contínuo, diâmetro do feixe 4.0 mm², com dose de 10J/cm² (20mW) e 50J/cm² (40mW), com um tempo de irradiação de 20 e 50 segundos, (total de energia por ponto 0.4J e 2J), respectivamente. A irradiação foi realizada diariamente em um ponto, em cima da área da lesão, técnica de contato pontual. Antes das irradiações foram realizadas calibrações do equipamento laser.

Análise histológica

As amostras dos músculos TA, obtidas de todos os grupos experimentais, foram lavadas com solução salina e em seguida fixadas em solução de formalina tamponada

10%. Após fixação, o tecido muscular foi processado e emblocado em parafina. Após isso, o tecido foi seccionado (5µm) com micrótomo (Leica Microsystems SP 1600, Nussloch, Alemanha) e corado com hematoxilina e eosina (HE, Merck). As amostras foram observadas e analisadas através do microscópio de luz (Olympus, Optical Co. Ltd, Tokio, Japão), com aumento de 20X. Através dessa análise foi possível avaliar a área das fibras musculares na região da lesão.

Morfometria da área lesada

Para avaliação da morfometria da área lesada foram realizadas secções histológicas transversais do músculo TA, que foram fotografadas utilizando o software de morfometria (Axiovision 3.0.6 SP4, Carl Zeiss, Jena, Alemanha). As imagens foram usadas para reconstruir a área total do músculo da seção transversal com a utilização do software ptgui, permitindo a identificação e medição de ambas às áreas: lesadas e não lesadas, para isso foi utilizado o software ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/> ou <http://www.baixaki.com.br/site/dwnld74836.htm>). Um procedimento duplo-cego foi utilizado tanto para seleção de imagem muscular transversal lesada e medições de área musculares. (Figura IV).

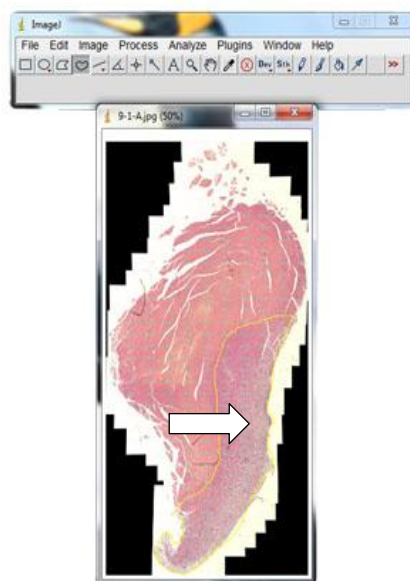


Figura IV – Foto ilustrativa da análise da área da lesão utilizando o software ImageJ. Seta indica a área do músculo lesado.

Contagem dos vasos

Para determinar o número de vasos sanguíneos na área de lesão, 5 imagens de diferentes regiões na área lesada foram obtidas pelo microscópio de luz (Olympus, Optical Co. Ltd, Tóquio, Japão), com um aumento de 40X. O número de vasos sanguíneos foram contados em cada campo através do software ImageJ (Figura V). A contagem dos vasos foi realizada por duas pessoas, sendo que não houve diferença entre elas.

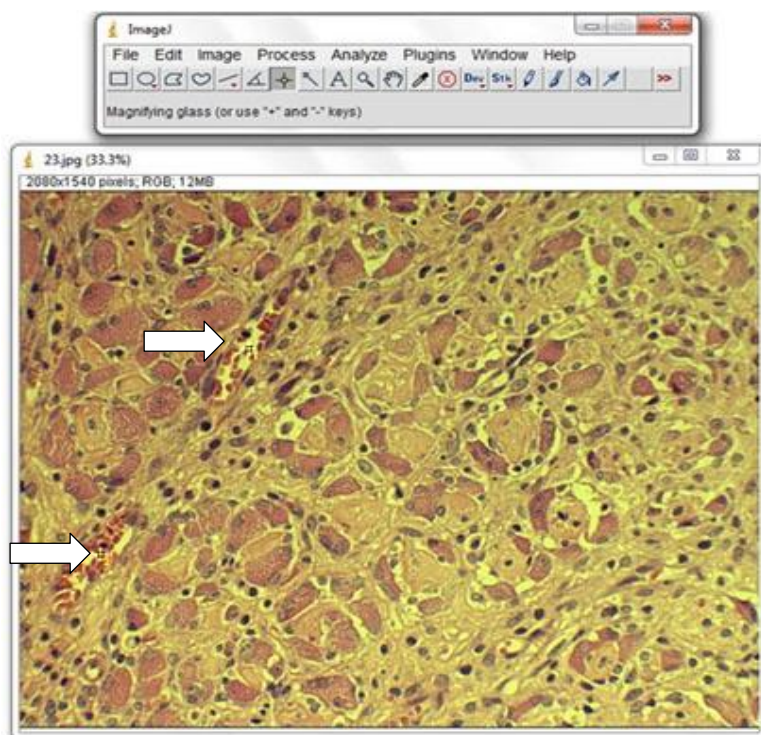


Figura V – Foto ilustrativa da contagem dos vasos utilizando o software ImageJ. Setas indicam os vasos sanguíneos.

Imunohistoquímica

Secções transversais do músculo TA foram desparafinadas em xilol e re-hidratadas em etanol, em seguida, pré-tratadas no microondas (Brastemp, SP, Brasil) com 10 mM de tampão de ácido cítrico (pH = 6), durante 3 ciclos de 5 minutos a 850 W cada um para recuperação do antígeno. O material foi pré-incubado com o peróxido de hidrogênio 0.3% em PBS (Solução-tampão Salina) durante 5 minutos para inativação da peroxidase endógena e, em seguida, bloqueadas com soro de cabra normal de 5% em solução de PBS, durante 10 minutos. Depois as amostras foram incubadas com anticorpos anti-MyoD e anti-miogenina (Santa Cruz Biotechnology, EUA) a uma concentração de 1:400. Para a incubação, as amostras foram deixadas overnight a 4 °C

dentro da geladeira e, seguida por duas lavagens em PBS, durante 10 minutos. As amostras foram incubadas com anticorpo secundário biotilado (anti-IgG de coelho) (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) com uma concentração de 1:200 em PBS durante 1 hora. As secções foram lavadas duas vezes com PBS antes da aplicação do complexo pré-formado avidina biotina conjugada com peroxidase (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) durante 45 minutos. Os complexos ligados foram visualizados através da aplicação de uma solução de 0,05% de diaminobenzidina-3-3' e contrastadas com hematoxilina de Harris. Para os experimentos controle de anticorpos, as lâminas foram tratados com IgG de coelho (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) numa concentração de 1:200 no lugar do anticorpo primário. Além disso, os experimentos controle positivos internos foram realizados em um banho de coloração.

Dados imunohistoquímicos foram avaliados após um treinamento com um patologista experiente, sob análise morfológica subjetiva, conforme estabelecido em estudos anteriores realizados por nosso grupo.

Análise estatística

Foi utilizado para testar a distribuição de normalidade dos dados das análises da área da lesão e contagem dos vasos o teste de Shapiro-Wilk. Na comparação entre os grupos foi utilizada a análise de variância (ANOVA), seguido pelo post-hoc teste de Newman-Keuls. Nível de significância estatística foi definido como $p < 0.05$. A avaliação estatística foi realizada utilizando STATISTICA 7.

IV. ARTIGO

THE EFFECTS OF 780 NM LOW-LEVEL LASER THERAPY ON MUSCLE HEALING PROCESS AFTER CRYOLESION

Roberta M. Brunelli ^a, Natalia C. Rodrigues ^b, Daniel A. Ribeiro ^c, Kelly Fernandes ^c, Angela Magri ^c, Livia Assis ^c, Nivaldo A. Parizotto ^b, Alberto Cliquet Jr ^a, Ana Claudia M. Renno ^c, Daniela C. C. Abreu^{d,*}

^aPost Graduation Program of Surgery, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil.

^b Department of Physiotherapy, Federal University of São Carlos (UFSCar), São Carlos, SP, Brazil.

^c PhD, Department of Biosciences, Federal University of São Paulo (UNIFESP), Santos, SP, Brazil.

^d Biomechanics, Medicine and Rehabilitation of Locomotor System Department, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil.

Running head: LLLT on muscle heating process

To whom correspondence should be addressed: Daniela Cristina Carvalho de Abreu, Physiotherapy Course, Department of Biomechanics, Medicine and Rehabilitation of Locomotor System, University of São Paulo, School of Medicine, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

Address: Avenida Bandeirantes, 3900; Ribeirão Preto, SP, Brasil; CEP: 14049-900

Telefone: (16) 3602-4413 / 3058; e-mail: dabreu@fmrp.usp.br

Abstract

The objective of this study was to assess the effects of 780-nm low-level laser therapy at different periods of 7, 14 and 21 days after cryolesion, including the dose (10 or 50 J/cm²), to promote a better muscle repair evidenced by histopathological and immunohistochemical analyses. Fifty-four male rats were divided into three groups: injured control group (CG) - injured animals without any treatment; injured 780-nm laser-treated group, at 10 J/cm² (G10); and injured 780-nm laser-treated group, at 50 J/cm² (G50). Each group was divided into three subgroups (n=6): 7, 14 and 21 days post-injury. Histopathological findings revealed better organised muscle fibres in the G10 and G50 during the periods of 7 and 14 days compared to the CG. The G10 and G50 during the 7 days showed a significant reduction ($p<0.05$) of lesion area compared to the CG, without differences between groups treated for 14 and 21 days. The G10 showed an increase of the amount of vessels after 14 days compared to the G50, but not in relation to controls. With regard to the immunohistochemical analyses of the MyoD factor, the G10 and G50 during the 7 days showed higher concentrations of immunomarkers than controls. Myogenin immunomarkers were similarly observed at days 7 and 14 in all the three groups analysed, whereas immunomarkers were found in none of the groups after 21 days of laser therapy. These results showed that laser, regardless the applied dose, has positive effects on muscle repair.

Key-words: physical resource, qualitative histological analysis, vessel counting; lesion area; MyoD; myogenin.

Introduction

Muscle lesion is a common trauma which can cause pain and disability, leading to an impairment of both occupational and leisure activities [1]. Several mechanisms may be involved in muscle lesions: direct trauma (strain, contusion or laceration) and indirect trauma (ischemia and neurological dysfunctions), which is the most common event [2].

Studies have demonstrated that low-level laser helps in muscle repair in experimental animals by acting positively on the amount of muscle fibres, angiogenesis and formation of myotubes [3, 4], thus accelerating the process of muscle repair [3–6]. These factors are quite desired in clinical practice for treatment of extensive muscle injuries or in populations with impaired muscle repair (e.g. elderly).

However, the mechanisms by which laser acts on the acceleration of muscle repair are not yet fully clarified. Therefore, it is important to study the effect of laser therapy on histological and immunohistochemical parameters, thus enabling the therapeutic impact on angiogenesis and myogenic regulatory factors (e.g. MyoD and myogenin) to be assessed.

Additionally, it is possible to observe that there is still no consensus in the literature regarding the best parameters to be used for low-level laser therapy. Cressoni et al. [3] assessed the effects of AlGaInP laser (785 nm) on muscle regeneration, reporting that during the acute phase, there was a decrease in inflammatory phase, reduction in the amount of leucocytes at the lesion area and acceleration of the connective tissue repair. Rizzi et al. [7] observed the effects of the application of GaAlAs laser at 20 J/cm² on the masseter muscle, reporting an increase in the metabolism of muscle fibres. Weis and Oron [8] assessed the irradiation effects of HeNe

laser (632.8 nm) on the muscle regeneration in rats, and they found that the irradiated group showed a more rapid recovery compared to injured-muscle animals.

Therefore, further studies are still needed to determine the best parameters for muscle regeneration, which will enable laser therapy to be more safely applied during clinical practice. The objective of this study was to assess and compare the effects of low-level laser therapy at wavelength $\lambda=780$ nm for muscle repair in rats after muscle injury by cryolesion during different periods of treatment (7, 14 and 21 days) by means of histopathological and immunohistochemical analyses.

Methods

Animals

Fifty-four Wistar male rats (weighing 300 ± 20 g) were used in the current study. They were maintained under controlled temperature (22 ± 2 °C), light–dark periods of 12h and with free access to water and commercial diet. All animal handling and surgical procedures were strictly conducted according to the Guiding Principles for the Care and Use of Laboratory Animals. This study was approved by the Ethics Committee of the Federal University of São Carlos (068/2009).

Animals were randomly distributed into three groups: injured control group (CG) - injured animals without any treatment; injured 780-nm laser-treated group, at 10 J/cm² (G10); and injured 780-nm laser-treated group, at 50 J/cm² (G50). Each group was divided into three different sub-groups (n=6), and on days 7, 14 and 21 post-injury, rats were sacrificed. Treatments started 48h post-surgery and were performed every 24h during 5, 10 and 15 sessions.

Experimental design

Surgery

Animals were anaesthetised with ketamine (Dopalen, 40 mg/kg, IP; Vetbrands, São Paulo, Brazil) and xylazine (Anasedan, 20 mg/kg, IP; Vetbrands, São Paulo, Brazil) and exposed to cryolesion of the right tibialis anterior (TA) muscle. The cryolesion consisted of two freeze–thaw cycles of the muscle in situ. Freezing involved applying the flat end (0.5 by 0.5 cm) of a piece of iron precooled in liquid nitrogen, was then kept for 10 seconds on the center of the muscle. The procedure was repeated twice consecutively, with a time interval of 30 seconds. Finally, the skin was sutured. The cryolesion procedure causes injury in the satellite cells, basal lamina, blood vessels and nerve fibres, inducing a rapid and extended necrosis of myofibrils, followed by a relatively slow regeneration process [5, 9–11].

LLLT Protocol

A low-energy GaAlAs laser (MM Optics, São Carlos equipment, São Paulo, Brazil), with a 780-nm continuous wavelength, a 4.0-mm² beam diameter, a dose of 10J/cm² (20mW) and 50 J/cm² (40 mW) and an irradiation time of 20 and 50 s (total energy per point 0.4 and 2 J), respectively, was used in this study. The irradiation was performed daily, at one point, above the area of the injury, through the punctual contact technique. On 7, 14 and 21 post-injury days, animals were sacrificed (with profound sedation and overdose of ketamine and xilazine (0.5 mL each) in order to extract their TA muscles. These time points post-injury were selected in order to evaluate the effect of laser on the different phases of muscle regeneration: the inflammatory phase, until 7

days; the repair phase, between 7 and 14 days; and finally the phase of remodelling, between 14 and 21 days [12].

Histopathological analysis

Muscles obtained from all experimental and control groups were washed immediately with saline, and for each specimen, a fixation was carried out in 10 % buffered formalin (Merck, Darmstadt, Germany) for 24 h, followed by dehydration in a graded series of ethanol and embedding in paraffin. Cross-section (5 μ m) of TA muscle were prepared using a microtome (Leica Microsystems SP 1600, Nussloch, Germany). Five sections of each specimen were stained with hematoxylin and eosin (HE stain, Merck). Histopathological evaluation was performed by an experienced pathologist (DAR) (blinded to the treatment) and was carried out under a light microscope (Olympus, Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan), at $\times 20$ magnification. The qualitative analysis considered any changes at the injury site, such as presence of inflammatory process, granulation tissue, necrosis area, focal or diffuse myofibrillary degeneration and/or tissue structure [11].

Morphometry of the injured area

For morphometric evaluation, one histological cross section of each TA muscle located in the central region of muscle injury was chosen to measure the cross-sectional area of both injured and uninjured muscle, using a software for morphometry (Axiovision 3.0.6 SP4, Carl Zeiss, Jena, Germany). Images were used to reconstruct the total muscle cross-sectional area, allowing the identification and measurement of both injured and uninjured areas. A double-blind procedure was used for both muscle cross-sectional image selection and injured and uninjured muscle area measurements.

Number of blood vessels

To determine the number of blood vessels at the area of injury, five pictures from different regions at the injured area were obtained by a light microscope (Olympus, Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan), at a magnification of $\times 40$. The number of blood vessels was counted in each field by the morphometric software (Axiovision 3.0.6 SP4, Carl Zeiss, Jena, Germany).

Immunohistochemistry

Muscle cross sections of 4 μm were deparaffinised in xylene and rehydrated in graded ethanol, then pretreated by microwave (Brastemp, São Paulo, Brazil) with 10mM citric acid buffer (pH=6) for 3 cycles of 5 min each at 850W for antigen retrieval. The material was pre-incubated with 0.3% hydrogen peroxide in phosphate-buffered saline (PBS) for 5 min for inactivation of endogenous peroxidase and then blocked with 5% normal goat serum in PBS solution for 10 min. The specimens were then incubated with anti-MyoD and anti-miogenina antibodies (Santa Cruz Biotechnology, USA) at a concentration of 1:400. Incubation was carried out overnight at 4 °C within a refrigerator and followed by two washes in PBS for 10 min. The sections were then incubated with biotin-conjugated secondary antibody (anti-rabbit IgG) (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) at a concentration of 1:200 in PBS for 1 h. The sections were washed twice with PBS before the application of preformed avidin–biotin complex conjugated to peroxidase (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) for 45 min. The bound complexes were visualised by the application of a 0.05% solution of 3,3'- diaminobenzidine and counterstained with Harris hematoxylin. For control studies of antibodies, the serial sections were treated with rabbit IgG (Vector Laboratories,

Burlingame, CA, USA) at a concentration of 1:200 in place of the primary antibody. Additionally, internal positive controls were performed with each staining bath.

Immunohistochemical data were evaluated by an experienced pathologist (DAR) under subjective morphologic analysis as established in previous studies conducted by our group [11].

Statistical Analysis

The results are given as means and standard deviations. Data from morphometry of the injured area and number of blood vessels analysis were evaluated using two-way ANOVA, followed by the post hoc Student–Newman–Keuls method. Level of statistical significance was defined as $p < 0.05$. Statistical evaluation was carried out using STATISTICA 7.

Results

Histopathological analysis

For histological analysis, it was observed that at 7 days post-injury, the control group (Fig. 1, CG) showed a large amount of inflammatory infiltrate. The group treated with the 10- and 50-J/cm² laser (Fig. 1, G10 and G50, respectively) had a lower amount of inflammatory infiltrate and greater organisation of muscle tissue when compared with the control group.

At 14 days post-injury, the groups treated with 10- and 50-J/cm² laser (Fig. 1, G10 and G50, respectively) showed a more organised tissue when compared with the control group (Fig. 1, CG). At 21 days post-injury, a full tissue repair was noticed in both groups (Fig. 1, CG, G10 and G50).

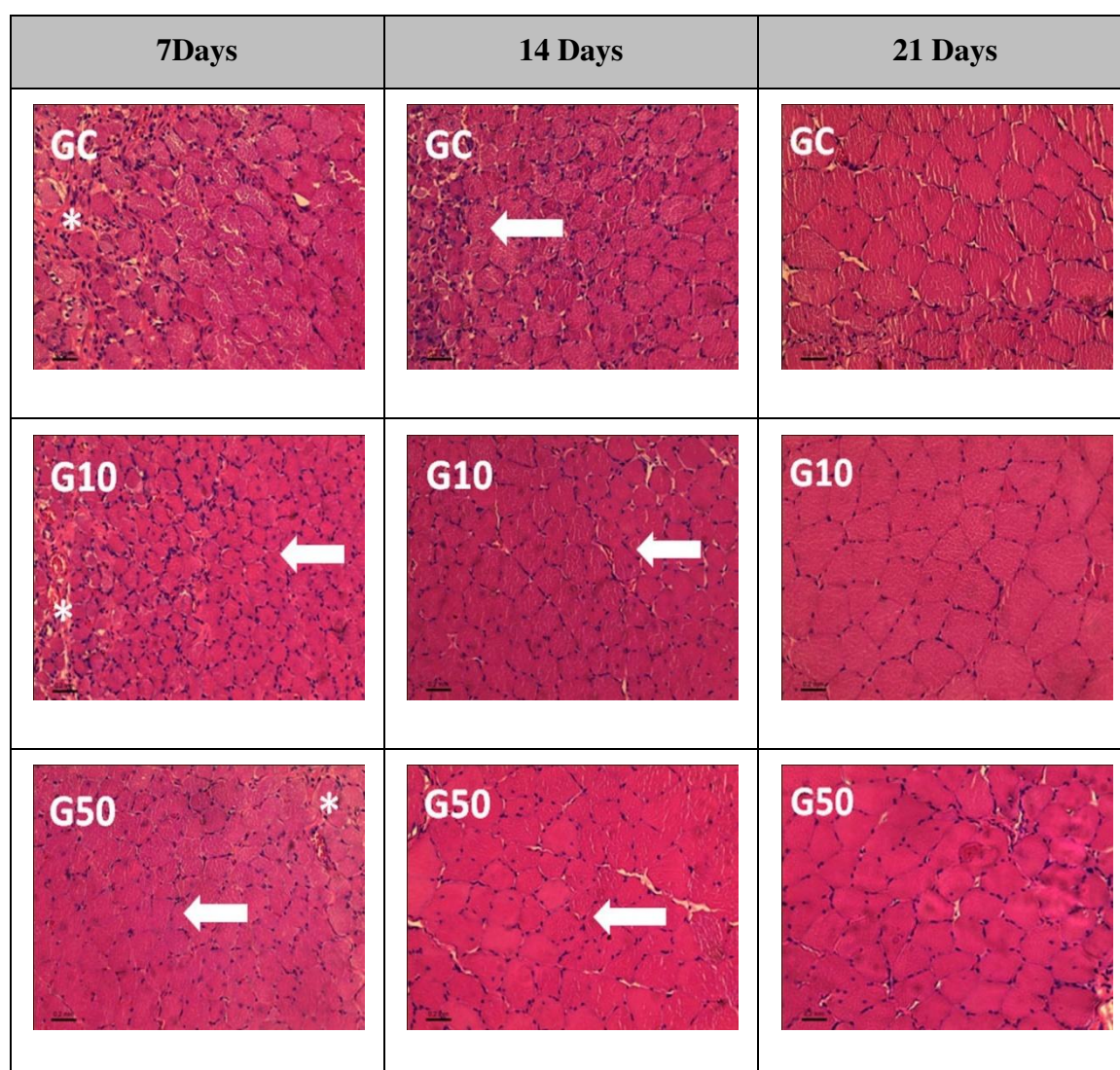


Figure 1. Histological sections of the injured muscle. CG: control group. G10: injured 780nm laser treated group at 10J/cm²; G50: injured 780nm laser group at 50J/cm². At 7, 14 and 21 days after surgery, respectively. Asterisks indicate inflammatory infiltrate. Arrows indicate new fiber muscle. H.E. stain. 20X.

Morphometry of the injured area

Figure 2 shows the morphometry of the injured area in the three different experimental periods. The G10 and G50 during the 7 days showed a significant reduction ($p < 0.05$) of lesion area compared to the CG, without differences between groups treated for 14 and 21 days.

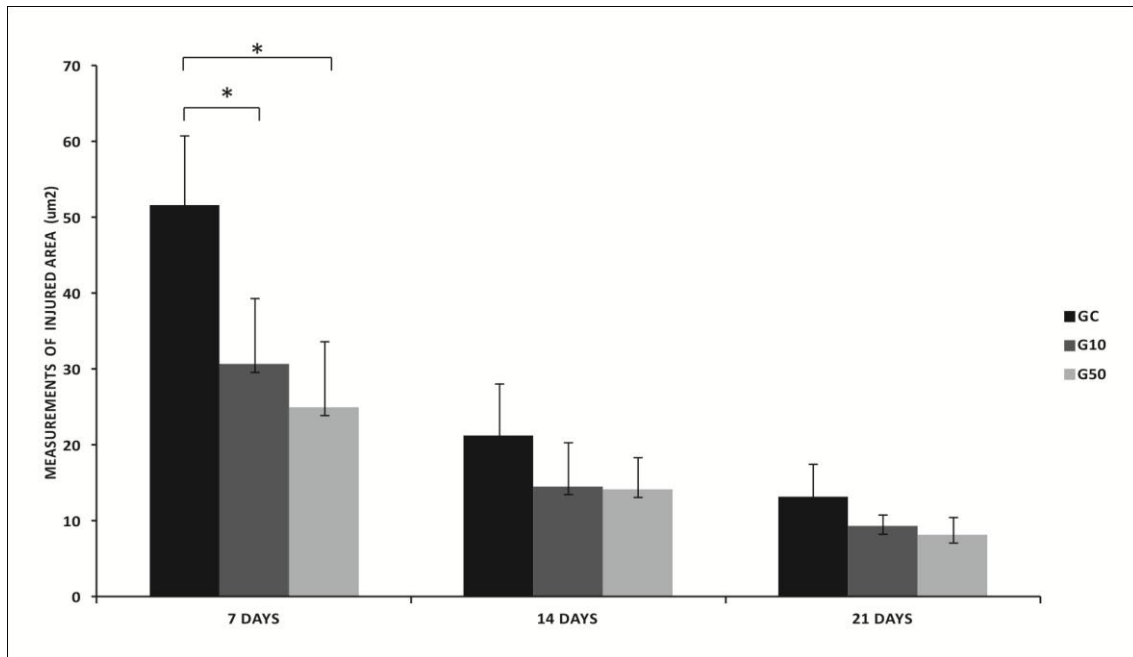


Figure 2. Mean and SD of the measurements of injured muscle area. CG: control group; G10: injured 780nm laser treated group at 10J/cm²; G50: injured 780nm laser group at 50J/cm². *p<0.05 vs. control group, according to Newman-Keuls test.

Number of blood vessels

At 7 and 21 days post-surgery, no statistical difference was found between control and treated groups. At the second experimental period, a statistically higher number of blood vessels were found in the animals irradiated at 10 J/cm² compared to 50 J/cm² (Fig. 3).

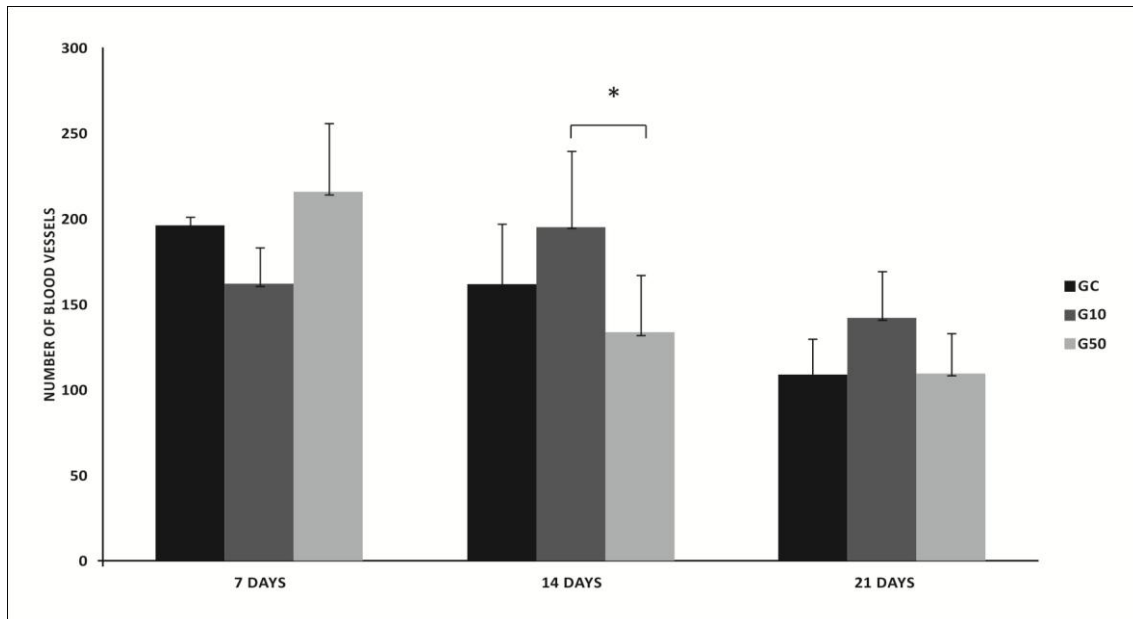


Figure 3. Mean and SD of the blood evaluation. CG: control group; G10: injured 780nm laser treated group at 10J/cm²; G50: injured 780nm laser group at 50J/cm². *p<0.05 vs. G50, according to Newman-Keuls test.

Immunohistochemistry

MyoD expression

At 7 days post-injury, MyoD immunoexpression was observed in the three experimental groups, but in a higher amount in the groups treated with laser at 10 and 50 J/cm² (Fig. 4, CG, G10 and G50). In the period 14 and 21 days post-injury, MyoD immunoexpression was not detected in any experimental group (Fig. 4).

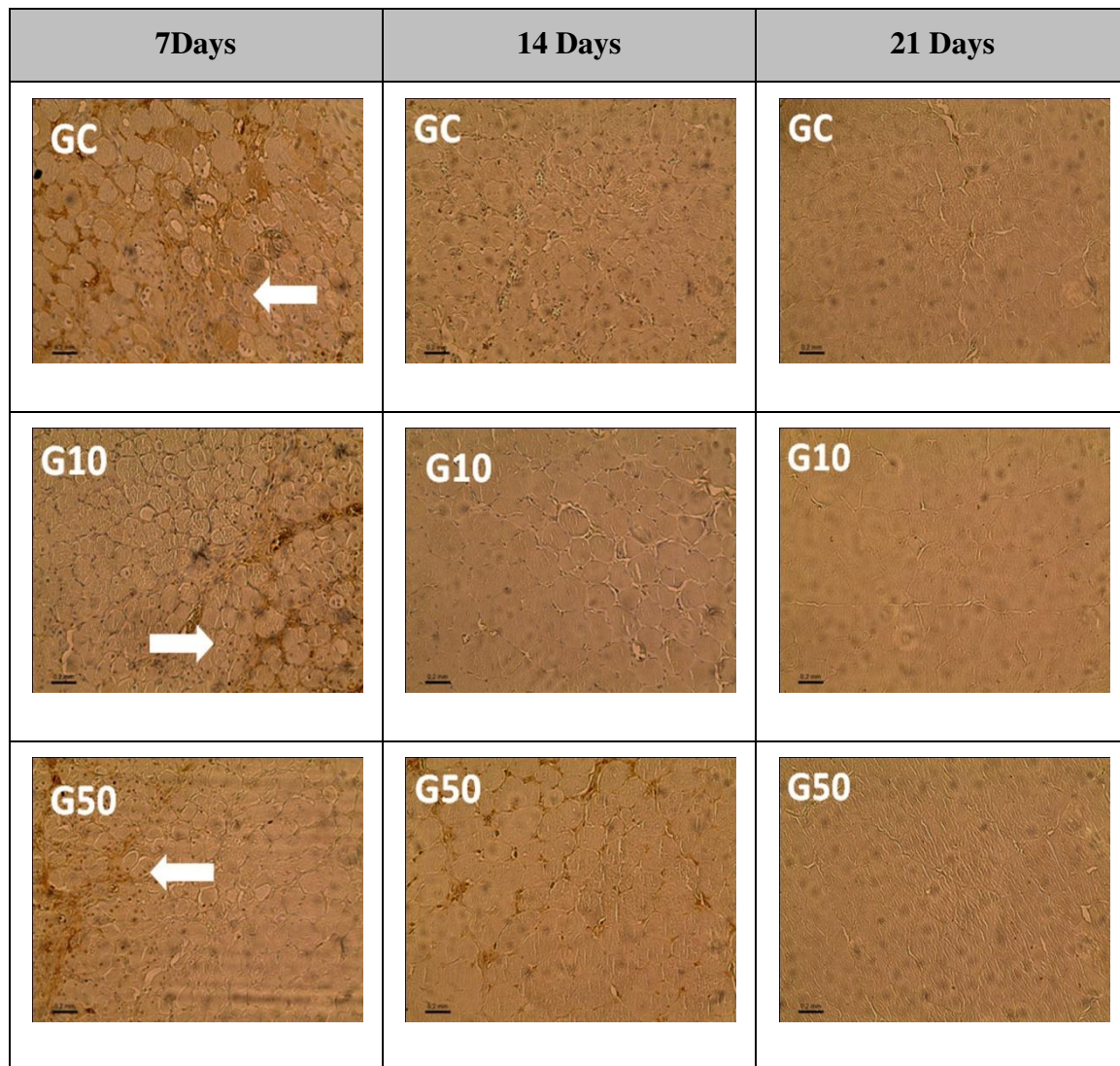


Figure 4. Histological sections of the injured muscle. CG: control group. G10: injured 780nm laser treated group at 10J/cm²; G50: injured 780nm laser group 50J/cm². At 7, 14 and 21 days after surgery, respectively. Arrows indicate MyoD immunoreactivity. 20 X.

Myogenin expression

A positive myogenin immunoreactivity was detected after 7 and 14 days post-injury in the three experimental groups (Fig. 5). Following 21 days, a negative immunoreactivity was detected in the experimental groups (Fig. 5).

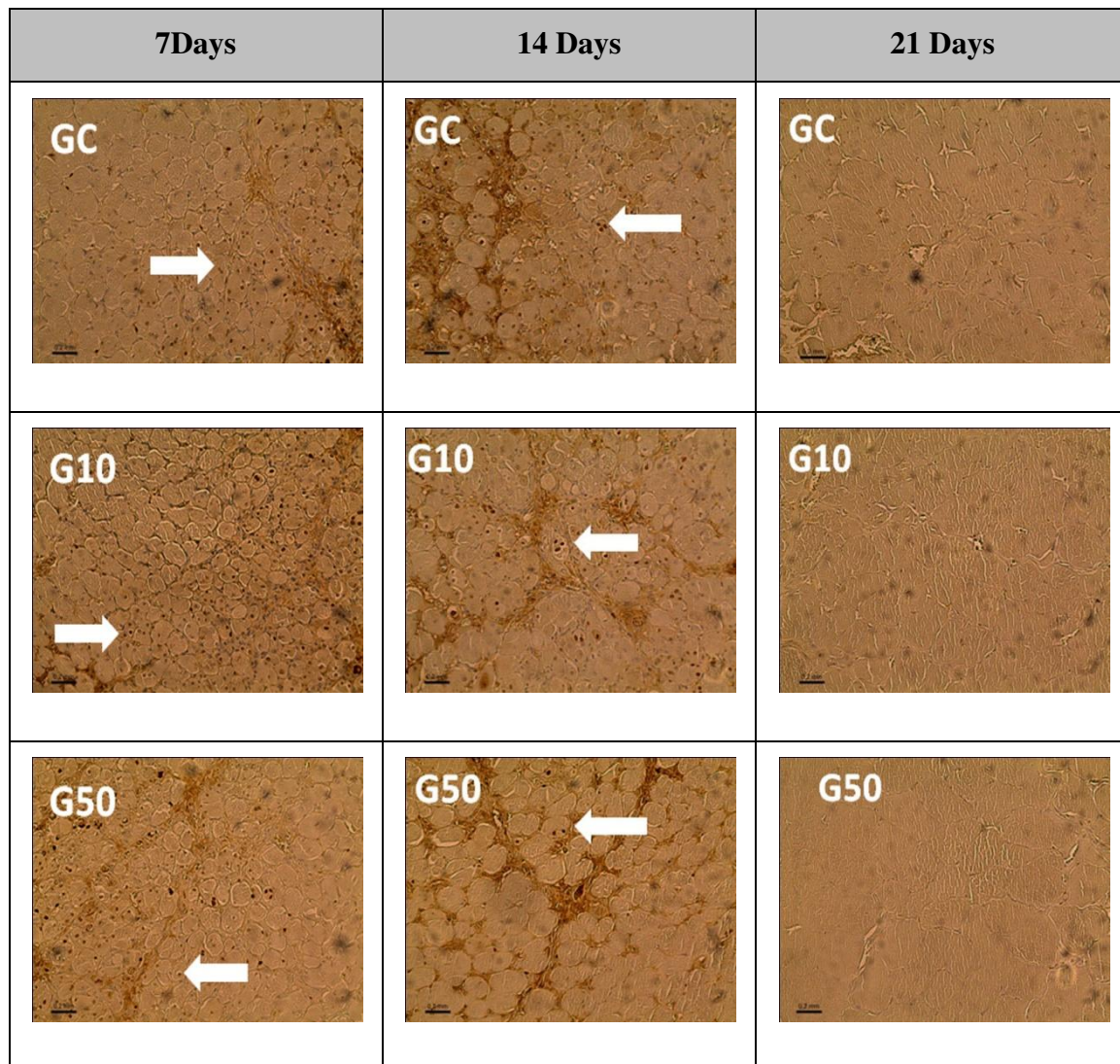


Figure 5. Histological sections of the injured muscle. CG: control group. G10: injured 780nm laser treated group at $10\text{J}/\text{cm}^2$; G50: injured 780nm laser group at $50\text{J}/\text{cm}^2$. At 7, 14 and 21 days after surgery, respectively. Arrows indicate myogenin immunoexpression. 20 X.

Discussion

Several studies have shown that irradiation from low-level laser therapy accelerated the repair process of muscle lesions [6, 11, 13], a finding that is in accordance with our results showing that laser therapy at doses of 10 and $50\text{J}/\text{cm}^2$ resulted in more organised muscle fibres and decreased the inflammatory infiltrate compared to controls after 7 and 14 days. Silva et al. [13] assessed the effects of GaAs

laser at 904 nm and reported that a 5-day application at a dose of 3 J/cm² accelerated the muscle repair process. Iyomasa et al. [6] analysed the effects of HeNe laser (633 nm) at doses of either 5 or 10 J/cm² for seven consecutive days and concluded that such dosages were beneficial for muscle repair. With regard to the lesion area, the results showed that after 7 days, the groups treated with laser at 10 and 50 J/cm² had a decrease lesion area compared to controls, thus demonstrating that laser had accelerated the inflammatory phase and decreased the time needed to advance into the next steps of the tissue regeneration process: muscle repair and remodelling. Other studies have also demonstrated the positive effects in the inflammatory phase of using laser therapy [6, 13, 14].

After 14 days, the amount of vessels in the group treated with laser at 10 J/cm² increased compared to the group treated with laser at 50 J/cm². According to Huard et al. [2], regeneration of muscle fibres and vascular growth occurs 7–10 days after the injury, with the maximum peak in the second week and reduction in the third week. Nakano et al. [15] related the angiogenesis to muscle regeneration when they assessed laser irradiation (830 nm, 69 mW) for repair of atrophied gastronomic muscle in rats, reporting an increase in angiogenesis and proliferation of satellite cells. Angiogenesis plays an important role in the muscle regeneration [15] and is regulated by the hepatocyte growth factor and vascular endothelial growth factor. Some authors reported that laser stimulates growth factors having high myogenic potential and contributes to neo-angiogenesis, with activation and proliferation of satellite cells [12, 15, 16].

Myogenesis is controlled by myogenic regulatory factors (MRFs), among them are MyoD and myogenin. The former is responsible for proliferation of myoblasts and the latter regulates terminal differentiation of muscle cells [17]. Changes in the expression of MRFs can alter the regeneration capacity of the muscle tissue [18].

In the analyses of MyoD, our studies showed that groups treated with laser at 10 and 50 J/cm² after 7 days of cryolesion had immunomarkers of MyoD at greater concentrations compared to controls, whereas after 14 and 21 days, the immunomarkers were virtually absent. Souza et al. [18] concluded that MyoD is involved in the process of proliferation of satellite cells, thus helping the muscle regeneration. The increase in the amount of MyoD in the first days of the muscle repair is probably related to more organised muscle fibres and to the decrease in the lesion area, both observed in groups submitted to laser therapy.

Our results have shown that immunomarkers of myogenin were present in all the three experimental groups after 7 and 14 days of cryolesion, but absent after 21 days. Therefore, low-level laser therapy (wavelength $\lambda=780$ nm, doses of 10 and 50 J/cm²) had no effect on the immunomarkers of myogenin, which is essential during the differentiation and fusion of myoblasts as MyoD is unable to substitute myogenin's function during differentiation [19]. Füchtbauer and Westphal [20] analysed the expression of MyoD and myogenin in the regeneration of skeletal muscle and reported their presence for about 2 weeks, a finding corroborating our results, since both myogenin and MyoD were not expressed after 21 days, probably due to the fact that repair had been already concluded in this phase.

Our results suggest that the LLLT effect only increases muscle repair in the first two periods, probably because during the 21 days, the muscle tissue is already regenerated and the laser did not have positive effects on the tissues regenerated. This demonstrates that the laser used at doses of 10 and 50 J/cm² can accelerate the muscular repair process, an important finding which motivates in the choice of using low-power laser especially in cases that muscle repair acceleration is required.

Conclusion

Our results have shown that low-level laser therapy, regardless of the dose used, has beneficial effects on the regeneration of muscle fibres as an increased concentration of immunomarkers of MyoD, more organised muscle fibres, acceleration of the inflammatory process, and reduction of lesion area were observed.

Acknowledgement: The authors would like to thank the CAPES the support provided. The authors thank Rogéria Inês Rosa Lara for her help during data analysis.

References:

1. Dawood MS, Al-Salihi AR, Qasim AW (2012) Laser therapy of muscle injuries. *Lasers Med Sci*. doi:[10.1007/s10103-012-1131-2](https://doi.org/10.1007/s10103-012-1131-2)
2. Huard J, Li Y, Fu F (2002) Muscle injury and repair: current trends in research. *J Bone Joint Surg Am* 84:822–832
3. Cressoni MD, Dib Giusti HH, Casarotto RA, Anaruma CA (2008) The effects of a 785-nm AlGaInP laser on the regeneration of rat anterior tibialis muscle after surgically-induced injury. *Photomed Laser Surg* 26:461–466
4. Amaral CA, Parizotto NA, Salvini TF (2001) Dose-dependency of low-energy HeNe laser effect in regeneration of skeletal muscle in mice. *Lasers Med Sci* 16:44–51
5. Baptista J, Martins MD, Pavesi VC, Bussadori SK, Fernandes KP, Júnior DD, Ferrari RA (2011) Influence of laser photobiomodulation on collagen IV during

- skeletal muscle tissue remodeling after injury in rats. *Photomed Laser Surg* 29:11–17
6. Iyomasa DM, Garavelo I, Iyomasa MM, Watanabe I, Issa JPM (2009) Ultrastructural analysis of the low level laser therapy effects on the lesioned anterior tibial muscle in gerbil. *Micron* 40:413–418
 7. Rizzi EC, Issa JPM, Dias FJ, Leão JC, Regalo SCH, Siéssere S, Watanabe I, Iyomasa MM (2010) Low-level laser intensity application in masseter muscle for treatment purposes. *Photomed Laser Surg* 28:31–35
 8. Weiss N, Oron U (1992) Enhancement of muscle regeneration in the rat gastrocnemius by low energy laser irradiation. *AnatEmbryol* 186:497–503 367
 9. Miyabara EH, Martin JL, Griffin TM, Moriscot AS, Mestril R (2006) Overexpression of inducible 70-kDa heat shock protein in mouse attenuates skeletal muscle damage induced by cryolesioning. *Am J Physiol Cell Physiol* 290:1128–1138
 10. Mesquita-Ferrari RA, Martins MD, Silva JA Jr, Silva TD, Piovesan RF, Pavesi VCS, Bussadori SK, Fernandes KPS (2011) Effects of low-level laser therapy on expression of TNF- α and TGF- β in skeletal muscle during the repair process. *Lasers Med Sci* 26:335–340 376
 11. Renno AC, Toma RL, Feitosa SM, Fernandes K, Bossini PS, de Oliveira P, Parizotto N, Ribeiro DA (2011) Comparative effects of low-intensity pulsed ultrasound and low-level laser therapy on injured skeletal muscle. *Photomed Laser Surg* 29:5–10
 12. Li J, Chen J, Kirsner R (2007) Pathophysiology of acute wound healing. *ClinDermatol* 25:9–18

13. Silva LH, Silva MT, Gutierrez RM, Conte TC, Toledo CA, Aoki MS, Liebano RE, Miyabara EH (2011) GaAs 904-nm laser irradiation improves myofiber mass recovery during regeneration of skeletal muscle previously damaged by crotoxin. *Lasers Med Sci* 27(5):993–1000. doi:[10.1007/s10103-011-1031](https://doi.org/10.1007/s10103-011-1031)
14. Santos DR, Liebano RE, Baldan CS, Masson IB, Soares RP, Esteves Junior I (2010) The low-level laser therapy on muscle injury recovery: literature review. *J Health SciInst* 28:286–288
15. Nakano J, Kataoka H, Sakamoto J, Origuchi T, Okita M, Yoshimura T (2009) Low-level laser irradiation promotes the recovery of atrophied gastrocnemius skeletal muscle in rats. *ExpPhysiol* 94:1005–1015 394
16. Zhang BT, Yeung SS, Liu Y, Wang HH, Wan YM, Ling SK, Zhang HY, Li YH, Yeung EW (2010) The effects of low frequency electrical stimulation on satellite cell activity in rat skeletal muscle during hindlimb suspension. *BMC Cell Biology* 11:87
17. McKay BR, O'Reilly CE, Phillips SM, Tarnopolsky MA, Parise G (2008) Coexpression of IGF-1 family members with myogenic regulatory factors following acute damaging muscle lengthening contractions in humans. *J Physiol* 586:5549–5560
18. Souza RWA, Gonçalves W, Cavalcante WLG, Pai-Silva MD, Gallacci M (2010) Nandrolone stimulates MyoD expression during muscle regeneration in the condition of myonecrosis induced by *Bothrops jararacussu* venom poisoning. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A: Current Issues* 73(13–14):934–943

19. Mastroiannopoulos NP, Nicolaou P, Anayasa M, Uney JB, Phylactou LA (2012)
Down-regulation of myogenin can reverse terminal muscle cell differentiation.
PLoS One 7:e29896
20. Füchtbauer EM, Westphal H (1992) MyoD and myogenin are coexpressed in
regenerating skeletal muscle of the mouse. DevDyn 193:34–39

V. DISCUSSÃO

Vários estudos mostraram que a irradiação laser de baixa potência acelera o processo de regeneração em lesões musculares (Renno et al., 2011; Iyomasa et al., 2009; Silva et al., 2011) que vão de acordo com nossos resultados que mostraram que a irradiação laser nas doses 10J/cm² e 50J/cm² apresentaram uma maior organização das fibras musculares e uma diminuição do infiltrado inflamatório quando comparado com o grupo controle nos períodos 7 e 14 dias pós lesão. Silva et al. (2011), avaliaram os efeitos do laser GaAs 904nm e observaram que 5 dias de aplicações consecutivas na dose 3J/cm² acelerou o processo de regeneração muscular. Iyomasa et al. (2009) analisaram os efeitos do laser He-Ne (633nm), doses 5J/cm² ou 10J/cm², durante 7 dias consecutivos e concluíram que essas dosagens foram benéficas para o reparo muscular.

Em relação aos resultados da área da lesão no período 7 dias da cirurgia os grupos tratados com laser 10J/cm² e 50J/cm² apresentaram uma diminuição da área da lesão em relação ao grupo controle, isso demonstra que o laser acelerou a fase inflamatória, diminuindo o tempo necessário para avançar para as etapas seguintes do processo de reparo tecidual: as fases de reparo e remodelamento muscular. Outros estudos também demonstraram efeitos positivos na fase inflamatória com o uso do laser (Silva et al., 2011; Iyomasa et al., 2009; Santos et al., 2010).

Na contagem dos vasos no período 14 dias a irradiação laser na dose 10J/cm² demonstrou um aumento na quantidade de vasos em relação ao grupo tratado com laser 50J/cm². Segundo Huard et al. (2002), a regeneração das fibras musculares e o crescimento vascular ocorrem em torno de 7-10 dias após a lesão, com um pico máximo na segunda semana e uma redução na terceira semana. Nakano et al. (2009) associaram a angiogênese com a regeneração muscular, ao avaliarem a irradiação do laser (830nm;

60mW) na recuperação do músculo gastrocnêmio atrofiado em ratos e observaram um aumento na angiogênese e na proliferação das células satélites. A angiogênese tem um papel importante na regeneração muscular (Nakano et al., 2009), sendo reguladas pelo fator de crescimento de hepatócitos (HGF) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Alguns autores observaram que o laser estimula esses fatores de crescimento que possuem alto potencial miogênico e contribuem para a (neoangiogênese), com ativação e proliferação das células satélites (Zhang et al., 2010; Nakano et al., 2009; Li et al., 2007).

A miogênese é controlada pelos fatores regulatórios miogênicos (FRM), dentre eles a myoD e miogenina. A myoD é responsável pela proliferação de mioblastos, enquanto que a miogenina regula a diferenciação terminal das células musculares (Mckay et al., 2009). Alterações na expressão dos FRM podem modificar a capacidade de regeneração muscular (Souza et al., 2010).

Nas análises da myoD, nossos resultados mostraram que no período 7 dias após a cirurgia os grupos tratados com laser 10J/cm² e 50J/cm² mostraram uma maior imunomarcação da myoD do que no grupo controle e nos períodos 14 e 21 dias após a cirurgia, a imunomarcação estava praticamente ausente. Souza et al. (2012) concluíram que a myoD está envolvida no processo de proliferação das células satélites auxiliando assim na regeneração muscular. O aumento da myoD nos primeiros dias do processo de reparo muscular provavelmente está associada com a melhor organização das fibras musculares e diminuição da área da lesão, observadas precocemente nos grupos que foram submetidos a laserterapia.

Nossos resultados mostraram que a imunomarcação da miogenina estava presente nos três grupos experimentais e nos períodos de 7 e 14 dias após a cirurgia e ausente no período 21 dias. Portanto, a laserterapia de baixa potência ($\lambda=780\text{nm}$, doses

de 10J/cm² e 50J/cm²) não apresentou efeito sobre a imunomarcagem de miogenina. A miogenina é essencial durante a diferenciação e fusão dos mioblastos, sendo a myoD incapaz de substituir a função da miogenina durante a diferenciação (Nicolaos et al., 20120). Fuchtbauer et al. (1992) analisaram a expressão da myoD e miogenina na regeneração do músculo esquelético e observaram a presença destes marcadores por cerca de 2 semanas, corroborando com nossos resultados, em que a miogenina e a myoD não foram expressas no período de 21 dias, provavelmente pelo fato de que o reparo nesta fase já estava concluído.

Limitações do estudo

As limitações deste estudo incluem: a não utilização do músculo do membro contralateral para ser o controle não lesado e não ter realizado a aplicação do laser em mais de um ponto de tratamento.

VI. CONCLUSÃO

Nossos resultados mostraram que a terapia laser de baixa potência (780nm) possui efeitos benéficos na regeneração muscular de ratos, com maior organização das fibras musculares, aceleração do processo inflamatório diminuindo a área da lesão, aumento da imunomarcação de myoD, e no grupo tratado com laser 10J/cm² aumentou o número de vasos apenas em relação ao grupo tratado com laser 50J/cm². Em relação ao tempo de tratamento, os resultados mostraram que a duração de 7 dias apresentou melhores respostas em relação a área da lesão e imunomarcação da MyoD; por outro lado a duração de 21 dias parece não ser necessária, visto que o músculo neste período já está reparado.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alfredo PP, Anaruma CA, Pião ACS, João SMA, Casarotto RA. Análise qualitativa dos efeitos da sonoforese com Arnica Montana sobre o processo inflamatório agudo do músculo esquelético de ratos. *Fisioterapia e pesquisa*, 2008; 15: 273-278.

Amaral CA, Parizotto NA, and Salvini TF. Dose dependency of low-energy HeNe laser effect in regeneration of skeletal muscle in mice. *Lasers Med. Sci.* 2001; 16: 44–51.

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

Baptista J, Martins MD, Pavesi VC, Bussadori SK, Fernandes KP, Júnior DD, Ferrari RA. Influence of laser photobiomodulation on collagen IV during skeletal muscle tissue remodeling after injury in rats. *Photomed Laser Surg.* 2010; 29: 11-7.

Bussulo RS, Deus SK. Laser nas úlceras. *Revista fisio&terapia*. 2003; 41: 27-28.

Carvalho RF, Cicogna AC, Campos GER, Lopes FS, Sugizaki MM, Nogueira CR, Pai-Silva MD. Heart failure alters MyoD and MRF4 expressions in rat skeletal muscle. *J. Exp. Path.* 2006; 87, 219-225.

Charge SBP, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev.* 2004; 84: 209-238.

Cressoni MD, Dib Giusti HH, Casarotto RA, Anaruma CA. The Effects of a 785-nm AlGaInP Laser on the Regeneration of Rat Anterior Tibialis Muscle After Surgically-Induced Injury. *Photomed Laser Surg.* 2008; 26:461-66.

Dawood MS, Al-Salihi AR, Qasim AW. Laser therapy of muscle injuries. *Lasers Med Sci.* 2012; doi 10.1007/s10103-012-1131-2.

Dedkov EI, Kostrominova TY, Borisov AB, Carlson BM. MyoD and Myogenin protein expression in skeletal muscle of senile rats. *Cell Tissue Res.* 2003; 311:401-416.

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.* 2000; 12: 49-55.

Foschini RMSA, Ramalho FS, Bicas HEA. Células satélites musculares. *Arq Bras Oftalmol.* 2004; 67(4): 681-7.

Frigo L, Fávero GM, Lima HJC, Maria DA, Bjordal JM, Joensen J, Iversen VV, Marcos RL, Parizotto NA, Lopes-Martins RAB. Low-Level laser irradiation (InGaAlP-660nm) increases fibroblast cell proliferation and reduces cell death in a dose-dependent manner. *Photomedicine and Laser surgery.* 2010; 28: 151-156.

Huard J, Li Y, Fu F. Muscle injury and repair: current trends in research. *J Bone Joint Surg Am.* 2002; 84:822–832.

Jarvinen TAH, Jarvinen TLN, Kaariainen M, Aarimaa V, Vaitinen S, Kalimo M, Jarvinen H. Muscle injuries: optimizing recovery. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2007; 21:317–331.

Kreisler M, Christoffers AB, Willershausen B, D'Hoedt B. Effect of low-level GaAlAs laser irradiation on the proliferation rate of human periodontal ligament fibroblasts: an in vitro study. *Journal of Clinical Periodontology*. 2003; 30:353-358.

Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clinics in Dermatology*. 2007; 25:9-18.

Mesquita-Ferrari RA, Martins MD, Silva Jr. JA, Silva TD, Piovesan RF, Pavesi VCS, Bussadori SK, Fernandes KPS. Effects of low-level laser therapy on expression of TNF- α and TGF- β in skeletal muscle during the repair process. *Lasers Med Sci*. 2011; 26:335-340.

McKay BR, O'Reilly CE, Phillips SM, Tarnopolsky MA, Parise G. Coexpression of IGF-1 family members with myogenic regulatory factors following acute damaging muscle lengthening contractions in humans. *J Physiol*. 2008; 586:5549-5560.

Nakano J, Kataoka H, Sakamoto J, Origuchi T, Okita M, Yoshimura T. Low-level laser irradiation promotes the recovery of atrophied gastrocnemius skeletal muscle in rats. *Exp Physiol*. 2009; 94(9):1005-15.

Oliveira NML, Parizotto NA, Salvini TF. GaAs (904nm) laser radiation does not affect muscle regeneration in mouse skeletal muscle. *Lasers in Surgery and Medicine*. 1999; 25:13-21.

Rizzi EC, Issa JPM, Dias FJ, Leão JC, Regalo SCH, Siéssere S, Watanabe I, Iyomasa MM. Low- Level Laser Intensity Application in Masseter Muscle for Treatment Purposes. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2010; v.28, p. S-31-S-35.

Santos DR, Liebano RE, Baldan CS, Masson IB, Soares RP, Esteves Junior I. The low-level laser therapy on muscle injury recovery: literature review. *J Health Sci Inst*. 2010; v. 28, p. 286-288.

Silva LH, Silva MT, Gutierrez RM, Conte TC, Toledo CA, Aoki MS, Liebano RE, Miyabara EH. GaAs 904-nm laser irradiation improves myofiber mass recovery during regeneration of skeletal muscle previously damaged by crotoxin. *Lasers MedSci*. 2011; Doi 10.1007/s10103-011-1031.

Silveira PC, Silva LA, Fraga DB, Freitas TP, Streck EL, Pinho R. Evaluation of mitochondrial respiratory chain activity in muscle healing by low-level laser therapy. *J. Photochem. Photobiol. B*. 2009; 95; 89-92.

Silveira PCL, Silva LA, Freitas TP, Latini A, Pinho RA. Effects of low-power laser irradiation (LPLI) at different wavelengths and doses on oxidative stress and fibrogenesis parameters in an animal model of wound healing. *Lasers Med Sci*. 2011; 26:125-131.

Souza RWA, Gonçalves W, Cavalcante WLG, Pai-Silva MD and Gallacci M. Nandrolone Stimulates Myod Expression During Muscle Regeneration in the Condition of Myonecrosis Induced by Bothrops jararacussu Venom Poisoning, *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A: Current Issues*. 2010; 73:13-14, 934-943.

Veçoso MC. Laser em fisioterapia. São Paulo: Lovise, 1993.

Zhang BT, Yeung SS, Liu Y, Wang HH, Wan YM, Ling SK, Zhang HY, Li YH, Yeung EW. The effects of low frequency electrical stimulation on satellite cell activity in rat skeletal muscle during hindlimb suspension. *BMC Cell Biology*. 2010; 11:87.

VIII. ANEXO



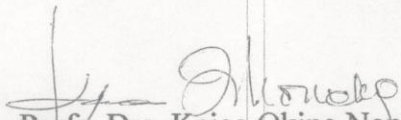
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
Comissão de Ética em Experimentação Animal
Via Washington Luís, km. 235 - Caixa Postal 676
Fones: (016) 3351.8109 / 3351.8110
Fax: (016) 3361.3176
CEP 13560-970 - São Carlos - SP - Brasil
proppg@power.ufscar.br - www.proppg.ufscar.br

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

Protocolo n°. 068/2009

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

São Carlos, 25 de fevereiro de 2010.


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