


Programa de Pós Graduação em Fisioterapia



**EFEITOS DA TERAPIA A LASER ASSOCIADA OU NÃO AO
PLASMA RICO EM PLAQUETAS NA REPARAÇÃO DO TECIDO
MUSCULAR DE RATOS**

Guilherme Akio Tamura Ozaki

Presidente Prudente

2015

Guilherme Akio Tamura Ozaki

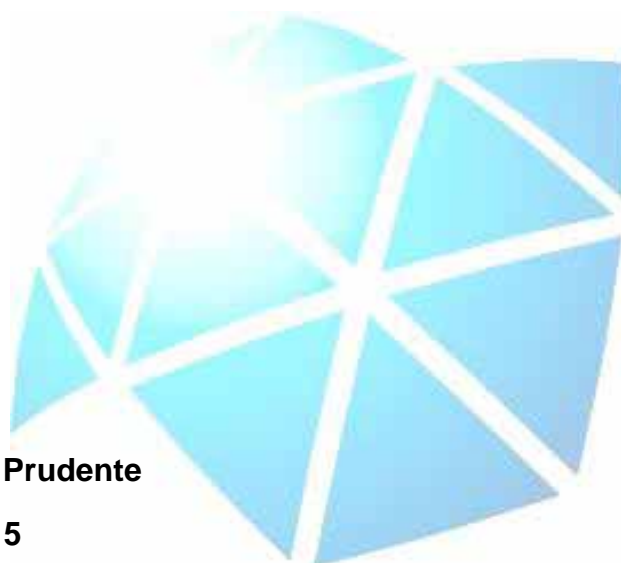
Efeitos da terapia a laser associada ou não ao plasma rico em plaquetas na reparação do tecido muscular de ratos

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologia - FCT/UNESP, campus de Presidente Prudente, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-graduação Mestrado em Fisioterapia.

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Silva Camargo Filho

Presidente Prudente

2015



FICHA CATALOGRÁFICA

Ozaki, Guilherme Akio Tamura.
O99e Efeitos da terapia a laser associada ou não ao plasma rico em plaquetas na reparação do tecido muscular de ratos / Guilherme Akio Tamura Ozaki. - Presidente Prudente : [s.n], 2015
77 f.

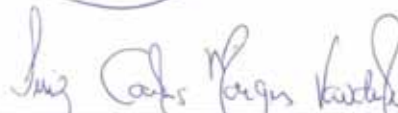
Orientador: José Carlos Silva Camargo Filho
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências e Tecnologia
Inclui bibliografia

1. Lesão Muscular. 2. Terapia a Laser de Baixa Intensidade. 3. Plasma Rico em Plaquetas. 4. Fisioterapia. I. Camargo Filho, José Carlos Silva. II. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências e Tecnologia. III. Efeitos da terapia a laser associada ou não ao plasma rico em plaquetas na reparação do tecido muscular de ratos.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. JOSÉ CARLOS SILVA CAMARGO FILHO
(ORIENTADOR)



Prof. Dr. LUIZ CARLOS MARQUES VANDERLEI
(FCT/UNESP)



Prof. Dr. MÁRIO JEFFERSON QUIRINO LOUZADA
(UNESP/ARAÇATUBA)



GUILHERME AKIO TAMURA OZAKI

PRESIDENTE PRUDENTE/SP, 14 DE JULHO DE 2015.

RESULTADO: Aprovado

*Dedico essa dissertação a minha família, meu pai, minha mãe e
minha irmã, que sempre me apoiaram em todas as minhas
escolhas.*

Primeiramente a Deus que permitiu que tudo acontecesse na minha vida, nem antes nem depois, mas no exato momento em que deveria acontecer.

Ao Professor Doutor José Carlos Silva Camargo Filho, pela confiança depositada no meu trabalho, fica o agradecimento pelo excelente profissional e pelo ser humano incrível, sempre disposto a ajudar o próximo sem exigir nada em troca, um grande exemplo.

Ao Professor Doutor Luiz Carlos Marques Vanderlei, por ter aceitado o convite para compor a banca, tanto de qualificação quanto de defesa. Um professor de rara competência, como professor e como pesquisador, além de ter sempre um olhar de atencioso para com os alunos.

Ao Professor Doutor Mario Jefferson Quirino Louzada, por aceitar compor a banca de defesa, por sempre se dispor a nos auxiliar, sendo um grande parceiro do nosso laboratório.

A Professora Mestre Regina Celi Trindade Camargo, que está sempre disposta a nos ajudar, sempre com um olhar materno, preocupando-se não apenas com nosso lado profissional, mas também com o nosso lado pessoal. Seu apoio fez muita diferença nesses anos de vida acadêmica.

A Professora Doutora Patrícia Monteiro Seraphim, que me ajudou muito na realização dessa pesquisa, muito bom poder contar com sua parceria.

A Tatiana Emy Koike e ao Thiago Alves Garcia, que foram vitais para a realização dessa pesquisa, sempre dispostos e prestativos, além da grande amizade. Muito obrigado, nada disso seria possível sem a preciosa ajuda de vocês.

Ao Robson Chacon Castoldi, pela grande ajuda principalmente nos momentos de sufoco, espero continuar podendo contar com sua parceria por muito tempo.

Aos demais amigos do Laboratório de Histologia e Histoquímica, Alan José Barbosa Magalhães, João Henrique Lyrio Machado, Jacqueline Bexiga Urban, Regiane Rocha Costalonga, Taíse Mendes Biral e ao técnico do laboratório William Sales Ferreira do Carmo, e o técnico do laboratório de Química Sidney Siqueira Leirião, todos vocês fazem parte dessa importante fase da minha vida.

Aos colegas do laboratório do Estresse, nossos vizinhos, Ana Laura Ricci, Anne Kasteliane França da Silva, Thais Roque Giacon, Natalia Turri da Silva, Aline Fernanda Barbosa Bernardo.

A minha família, meu pai Gildo Yukio Ozaki, minha mãe Lídia Mitiko Tamura Ozaki, e minha irmã Luciana Akemi Tamura Ozaki, vocês são parte de mim, tudo que construí e que construirei, não são minhas, mas **nossas** conquistas. Vocês são tudo pra mim.

Por fim, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior–Capes, pela contribuição na presente pesquisa.

“Você não pode mudar o vento, mas pode ajustar as velas do barco para chegar onde quer.”
—**Confúcio**

“Escolhe um trabalho de que gostes, e não terás que trabalhar nem um dia na tua vida.”
—**Confúcio**

Sumário

EFEITOS DA TERAPIA A LASER ASSOCIADA OU NÃO AO PLASMA RICO EM PLAQUETAS NA REPARAÇÃO DO TECIDO MUSCULAR DE RATOS	1
Apresentação	14
Resumo.....	17
Introdução.....	21
Artigo I.....	25
Análise fractal do tecido muscular de ratos submetidos à lesão muscular por estiramento	26
Artigo II.....	39
Análise da terapia a laser associada ou não ao plasma rico em plaquetas na reparação do tecido muscular por espectroscopia de Raman.....	40
Considerações finais.....	56
Referências Bibliográficas	58
Anexo I.....	60
<i>Normas para publicação da Revista International Journal of Morphology:</i>	61
Anexo II.....	63
<i>Carta de aceite do artigo I</i>	64
Anexo III.....	65
<i>Normas para publicação da revista Lasers in Medical Science:</i>	66

Essa dissertação segue o modelo alternativo originado a partir da pesquisa intitulada: **Efeitos da terapia a laser associada ou não ao plasma rico em plaquetas na reparação do tecido muscular de ratos**, desenvolvido no Laboratório de Histologia e Histoquímica do Departamento de Fisioterapia da Faculdade de Ciências e Tecnologia – FCT/UNESP, Campus de Presidente Prudente.

Em consonância com as regras do Programa de Pós-Graduação, Mestrado em Fisioterapia, o presente material está dividido nas seguintes sessões:

- **Resumo;**
- **Abstract;**
- **Introdução:** para contextualização do tema pesquisado;
- **Artigo I:** Guilherme Akio Tamura Ozaki, Regina Celi Trindade Camargo, Tatiana Emy Koike, Thiago Alves Garcia, Robson Chacon Castoldi, José Carlos Silva Camargo Filho. **Análise fractal do tecido muscular esquelético de ratos submetidos à lesão muscular por estiramento.**
- **Artigo II:** Guilherme Akio Tamura Ozaki, Regina Celi Trindade Camargo, Tatiana Emy Koike, Thiago Alves Garcia, Robson Chacon Castoldi, João Domingos Augusto dos Santos Pereira, Carlos José Leopoldo Constantino, José Carlos Silva Camargo Filho. **Análise da terapia a laser associada ou não ao plasma rico em plaquetas na reparação do tecido muscular por espectroscopia de Raman**
- **Conclusões:** obtidas a partir da pesquisa realizada

- **Referências Bibliográficas:** referentes ao texto da introdução.
- **Anexo I:** Normas da revista do Artigo I, *International Journal of Morphology*.
- **Anexo II:** Carta de aceite do Artigo I.
- **Anexo III:** Normas da revista do Artigo II, *Lasers in Medical Science*.

Resumo

O tratamento de lesões musculares geralmente resulta na interrupção da atividade esportiva, por isso estudos que visam antecipar o retorno à atividade, com o adequado reparo tecidual se tornam importantes. Sendo assim, o presente estudo objetivou avaliar o efeito da terapia a laser de baixa intensidade (LLLT) associada ou não ao plasma rico em plaquetas (PRP) no tratamento de lesão muscular. Foram utilizados 42 animais separados em seis grupos (n=7): Controle (C), Controle Lesão Aguda (CLA), Controle Lesão (CL), Lesão LLLT (LLt), Lesão PRP (LP), e Lesão LLLT e PRP (LLtP). A lesão muscular foi induzida por estiramento no músculo gastrocnêmio e, os animais dos grupos LP e LLtP, receberam a aplicação do PRP imediatamente após a lesão, o LLLT foi aplicado diariamente por sete dias. Os animais foram eutanasiados no sétimo dia após a lesão, exceto o grupo CLA, que foi eutanasiados 48 horas após a lesão. Lâminas histológicas do músculo gastrocnêmio foram confeccionadas sem corante para análise por Raman e coradas com Hematoxilina e Eosina (HE) e Picrosirius, que foram analisadas histologicamente, e por meio da dimensão fractal (DF), analisando o infiltrado inflamatório e o colágeno. A análise de NAD e NADH foi realizada por espectroscopia de RAMAN. A análise histológica demonstrou grande destruição tecidual nos grupos lesados, e os tratamentos apresentaram-se efetivos promover o reparo do tecido, além disso, o grupo LLtP apresentou aspecto histológico melhor que os tratamentos isolados, tanto com relação à extensão da lesão, quanto ao processo de regeneração. A análise fractal apresentou valores elevados de DF do processo inflamatório (HE) nos grupos experimentais, CLA e CL, em relação ao C ($p=0,000$). A análise do colágeno, nas lâminas coradas com picrosirius, apresentou maior DF no grupo CLA em relação ao CL ($p=0,0001$), não havendo diferença estatisticamente significativa entre os outros grupos. O índice de NADH/NAD revelou estresse oxidativo nos grupos lesado (CLA e CL). Em síntese, a presente pesquisa demonstrou que a análise fractal foi capaz de identificar alterações provenientes do processo inflamatório no tecido muscular esquelético após lesão, em lâminas coradas com HE, e alterações do colágeno em lâminas coradas com picrosirius. Além disso, os tratamentos foram efetivos em reparar o dano causado pela lesão muscular, sendo que a combinação dos tratamentos apresentou aspecto histológico superior aos tratamentos isolados, e tanto o

LLLt quanto o PRP e a associação de ambos foram capazes de reduzir o estresse oxidativo gerado pela lesão, e modular a produção de colágeno.

Palavras-chave: Lesão do músculo esquelético, Terapia a Laser de Baixa Intensidade, Plasma Rico em Plaquetas, Análise fractal, Espectroscopia de Raman.

Abstract

Treatment of muscle injuries usually results in the interruption of sports practice, so studies aimed at anticipating the return to activity, with proper tissue repair become important. Therefore, this study intended to evaluate the effect of low level laser therapy (LLLT) associated or not with platelet-rich plasma (PRP) in the treatment of muscle injury. Forty two animals were used divided into six groups (n=7), Control (C), Acute Injury Control (CLA), Injury Control (CL), Injury LLLT (LLT), injury PRP (LP), and injury LLLT and PRP (LLtP). Muscle injury were induced by stretching the gastrocnemius muscle and the animals of groups LLtP and LP received the application of PRP immediately after the injury. The LLLT were applied daily for seven days. The animals were euthanized seven days after the injury, except the CLA group, which were euthanized 48 hours after injury. Histological slides of the gastrocnemius muscle were prepared without stained for Raman analyze and stained by Hematoxylin and eosin (HE), and Picrosirius witch are analyzed by fractal dimension (DF), analyzing the inflammatory infiltrated and collagen. Analysis of NADH and NAD were performed by Raman spectroscopy. The histological analyzes showed great destruction of the tissue, and the treatments were effective in promote the repair in the tissue, furthermore the LLtP group demonstrate better histological aspect than the treatments isolated, even in relation to the extension of the lesion as well as the regeneration process. The fractal analyze showed high DF values of the inflammatory process (HE) in the experimental groups, CLA and CL in relation to C ($p = 0.000$). The analysis of collagen in picrosirius stained slides showed high DF in CLA group compared to CL ($p = 0.0001$), with no statistically significant difference between the other groups. The ratio of NADH/NAD showed oxidative stress on injured groups (CLA and CL). In summary, the present study demonstrated that fractal analysis was able to identify changes from the inflammatory process in injured skeletal muscle tissue, by the analysis of slides stained with HE, and changes in the collagen, in slides stained with picrosirius. Furthermore the treatments were effective in repair the damage caused by muscle injury, and both the LLLt as the PRP and the combination of both were able to reduce the oxidative stress caused by injury, and modulate the collagen production.

Keywords: Skeletal muscle injury, Low-Level Laser Therapy , Platelet Rich Plasma, Fractal analysis, Raman spectroscopy.

O tecido muscular esquelético é um dos mais abundantes tecidos do corpo humano, sendo constantemente exposto a vários tipos de lesão. No esporte as lesões musculares abrangem mais de 50% de todas as lesões, sendo que dessas cerca de 90% são do tipo contusão e estiramento. (DAWOOD et al., 2013; SOUZA, J. DE; GOTTFRIED, 2013)

A lesão muscular promove danos na estrutura celular do tecido prejudicando sua função. Quando analisadas lâminas histológicas observadas em microscópio óptico podemos ver elementos de estresse e/ou dano à estrutura da fibra muscular, como presença de infiltrado inflamatório, alteração do posicionamento do núcleo celular, quebra da membrana entre outras características. (CAMARGO FILHO et al., 2011)

Essas alterações na estrutura da célula promovem o processo de inflamação no tecido muscular, que é composto basicamente por três fases: degeneração, reparo e remodelamento. Essas fases apresentam características específicas e fundamentais para a adequada restauração da estrutura e função do tecido muscular lesado (SOUZA, J. DE; GOTTFRIED, 2013).

O maior desafio da reabilitação das lesões musculares é promover o reparo tecidual adequado com tempo menor de recuperação para que o indivíduo esteja apto a retomar suas atividades esportivas o quanto antes, fato importante tanto para os atletas não perderem desempenho, quanto para os esportistas amadores não se afastarem de seus hábitos saudáveis (SOUZA, J.; GOTTFRIED, 2013; ALVES et al., 2014).

Nesse contexto algumas técnicas têm sido estudadas a fim de promover reparo tecidual de maior qualidade e antecipar o retorno às atividades esportivas, dentre elas, destacam-se a Laser Terapia de Baixa Intensidade (LLLT) e o Plasma Rico em Plaquetas (PRP). A LLLT atua estimulando a miogênese, reduz o estresse oxidativo, além de apresentar efeito inibidor da fibrose cicatricial (LUO et al., 2013; FELISMINO et al., 2014; ALVES et al., 2014). Já o PRP é um concentrado de plaquetas que contém vários fatores de crescimento, que atua estimulando principalmente a miogênese e a angiogênese (SÁNCHEZ-GONZÁLEZ et al., 2012; ANITUA et al., 2012).

Entretanto estudos que analisem a associação de ambas as técnicas, LLLT e PRP, não foram encontrados na literatura científica, fato que motivou o desenvolvimento da presente pesquisa, pois quando estudados separadamente apresentam efeitos benéficos ao reparo tecidual, e não há indícios de que essa associação possa promover efeitos nocivos.

Face às considerações supracitadas, a presente pesquisa, pretende analisar as alterações histológicas promovidas pela lesão muscular por meio da dimensão fractal, além disso, embasada nos conhecimentos dos efeitos fisiológicos gerados pelos tratamentos da LLLT e do PRP, pretendemos associar ambas as técnicas com o pressuposto de que essa associação possibilite a redução no tempo e melhora na qualidade da reparação tecidual, com significativa diminuição dos processos fibróticos comumente encontrados, permitindo assim a criação de um protocolo efetivo de tratamento nas lesões musculares, induzindo a um processo de reabilitação mais rápido e de melhor qualidade.

Diante do exposto, o presente modelo alternativo de dissertação compreende dois artigos elaborados no Laboratório de Histologia e Histoquímica da FCT/UNESP, Campus Presidente Prudente, sendo o primeiro um método de avaliação quantitativa das alterações histológicas; e o segundo a análise dos efeitos do LLLT e do PRP na regeneração do tecido muscular após lesão por estiramento.

Artigo Original**Análise fractal do tecido muscular de ratos submetidos à lesão muscular por estiramento****Fractal analysis of skeletal muscle tissue of rats subjects of stretch injury**

Guilherme Akio Tamura Ozaki¹, Regina Celi Trindade Camargo¹, Tatiana Emy Koike¹,
Thiago Alves Garcia¹, Robson Chacon Castoldi², José Carlos Silva Camargo Filho¹

¹ Faculdade de Ciências e Tecnologia, FCT/UNESP, Campus de Presidente Prudente. Departamento de Fisioterapia.

² Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP. Departamento de Ortopedia e Traumatologia.

Endereço para correspondência

Guilherme Akio Tamura Ozaki
Rua Roberto Simonsen, 305
19060-900 - P. Prudente, SP
Fone: (18) 3229- 5822

Resumo

O objetivo da presente pesquisa foi analisar as alterações no tecido muscular esquelético de ratos após lesão muscular por estiramento, por análise fractal de lâminas histológicas. Foram utilizados 19 ratos, divididos em três grupos, Controle, n=5 (C), Lesão dois dias, n=7 (L2) e Lesão sete dias, n=7 (L7). Os animais foram submetidos à lesão muscular por estiramento, e eutanasiados após dois (L2) e sete dias (L7). Lâminas histológicas do músculo gastrocnêmio dos animais foram confeccionadas e coradas com Hematoxilina e Eosina (HE), para análise do processo inflamatório, e Picrosirius, para demonstração do colágeno, para posterior análise da dimensão fractal (DF). A análise da DF do processo inflamatório (HE) apresentou um aumento nos grupos experimentais, L2 e L7, em relação ao C, $p= 0,000$. Com relação ao colágeno, as lâminas coradas com picrosirius apresentaram maior DF no grupo L2 em relação ao L7, $p= 0,001$, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os outros grupos. Em síntese, a presente pesquisa demonstrou que a análise fractal foi capaz de identificar alterações provenientes do processo inflamatório no tecido muscular esquelético após lesão, por meio de análise de lâminas coradas com HE, e alterações do colágeno em lâminas coradas com picrosirius.

Palavras-chave: Análise Fractal, Lesão no Músculo Esquelético, Colágeno, Patologia.

Abstract

The aim of this research was to analyze the changes in skeletal muscle tissue of rats after muscle stretch injury by the fractal analysis of histological slides. Twenty nine rats was used, divided into three groups, control, $n = 5$ were used (C), lesion two days, $n = 7$ (L2) and Injury seven days, $n = 7$ (L7). The animals were subjected to muscle stretch injury, and euthanized after two (L2) and seven days (L7). Histological slides of the gastrocnemius muscle of animals were prepared and stained with Hematoxylin and Eosin (HE) and Picrosirius for further analysis of the fractal dimension (DF). The analysis of DF sections stained with HE presented an increase in DF experimental groups, L2 and L7 in relation to C ($p = 0.000$). The slides stained with picrosirius showed higher DF in L2 group compared to L7. ($p = 0.001$). In summary, the present study demonstrated that fractal analysis was able to identify changes in skeletal muscle tissue after injury, through analysis of slides stained with HE, and changes in collagen stained with picrosirius.

Keywords: Fractal analysis, skeletal muscle injury, collagen, inflammation, pathology.

Introdução

A lesão muscular promove uma série de alterações no tecido muscular esquelético. Tais alterações são visíveis quando analisadas por meio de lâminas histológicas em microscópio óptico (Alves et al. 2013; Camargo Filho et al. 2011; Luo et al. 2013; de Souza et al. 2011). Entretanto atualmente essas alterações microscópicas são avaliadas qualitativamente, o que dificulta a quantificação das alterações morfológicas. Nesse sentido a análise fractal vem sendo estudada, pois se apresenta como uma ferramenta que possibilita a quantificação dos achados histológicos, além de eliminar as variações entre avaliadores (Lee et al. 2014; Moreira et al. 2011).

Um fractal é um objeto que não apresenta forma geométrica clássica, nele cada parte menor assemelha-se ao todo. Um exemplo de objeto fractal que ilustra bem o conceito é o “flocos de neve de Koch” (figura 1). O flocos de neve de Koch é uma figura complexa, em que não é possível mapear todos os seus pontos, pois cada vez que se melhora a resolução, novas anfractuosidades aparecem onde antes aparentemente só havia um segmento de reta (Mendonça et al. 2007).

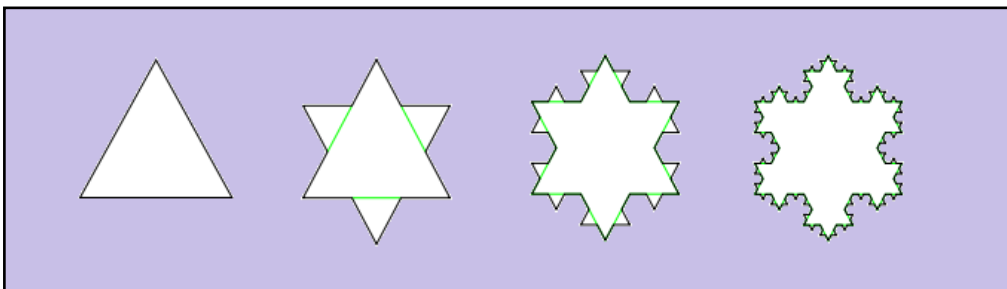


Figura 1: Flocos de neve de Koch

Desta forma a análise dos objetos fractais baseia-se na relação entre a resolução e a escala em que o objeto é avaliado, e o resultado pode ser quantitativamente expresso como a dimensão fractal (DF) do objeto (Karperien et al. 2008), sendo representado pela equação:

$$DF = (\text{Log } Nr / \log r^{-1})$$

Na qual Nr é a quantidade de elementos iguais necessários para sobrepor ou preencher o objeto original, sendo r a régua ou escala aplicada ao objeto e DF a dimensão da referida estrutura ou objeto.

Há diversas técnicas que determinam a dimensão fractal, dentre elas a mais utilizada na área médica é pelo método *box-counting* (Moreira et al. 2011). Nesse método a dimensão fractal é dada pela sobreposição de quadrados (N) de lados (r) progressivamente menores, sendo Nr a quantidade de quadrados de lado r necessários para cobrir a imagem, a cada tamanho escolhido. Nesse caso a DF será a inclinação da linha de regressão dos valores dos dois log (Karperien et al. 2008).

A dimensão fractal já é utilizada como ferramenta diagnóstica em diversos trabalhos, para estudos de neurônios (Ristanović, Stefanović, and Puškaš 2014), vasculatura retínica (Mendonça et al. 2007), estudo da árvore brônquica (Gupta et al. 2014), perfusão sanguínea tecidual (Michallek and Dewey 2014), diagnóstico de carcinoma hepático (Lee et al. 2014), grau de diferenciação de osteoblasto (Park et al. 2014), grau de rejeição de transplantes cardíacos (Moreira et al. 2011), entre outros. Porém apesar de ser uma técnica com boa aplicabilidade para análise histológica, não foram encontrados na literatura específicos estudos que avaliem o tecido muscular esquelético por meio da dimensão fractal. O uso dessa técnica pode abrir caminho para uma mensuração padronizada dos achados histológicos, permitindo a análise mais precisa dos resultados, além de possibilitar a comparação direta dos resultados de outros estudos, pois se trata de uma técnica em que os resultados são independentes do avaliador.

Portanto a presente pesquisa teve como objetivo analisar as alterações no tecido muscular esquelético de ratos após lesão muscular por estiramento, por meio da dimensão fractal.

Materiais e métodos

Foram utilizados 19 ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus Novergicus*) com 150 dias fornecidos pelo biotério central da Universidade Estadual Paulista, campus de Botucatu-SP e mantidos no biotério do Laboratório de Histologia e Histoquímica da Faculdade de Ciências e Tecnologia de Presidente Prudente (FCT/UNESP) em gaiolas coletivas de polipropileno com cinco animais cada, sob condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), umidade ($50 \pm 10\%$) e ciclo claro/escuro de 12 horas (7-19h), com água e ração fornecidos *ad libitum*.

Todos os procedimentos foram aprovados pelo comitê de ética para uso de animais da FCT/UNESP, Campus de Presidente Prudente, protocolo 01/2013.

Grupos Experimentais

Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos: Controle (C, n=5); Lesão dois dias (L2, n=7) e Lesão sete dias (L7, n=7). Os animais do grupo C permaneceram no biotério e foram eutanasiados de forma pareada com o grupo L7. A lesão muscular foi induzida nos grupos L2 e L7, e posteriormente os animais permaneceram no biotério por dois e sete dias respectivamente.

Equipamento Indutor de Lesão por Estiramento

Para a lesão muscular utilizou-se o equipamento indutor de estiramento mecânico não invasivo, elaborado e construído no Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (Pachioni et al. 2009). O equipamento foi associado a um estimulador elétrico de corrente tetanizante, com frequência elétrica de 25 Hz.

Protocolo de Lesão Muscular

Os animais foram anestesiados por meio de administração intraperitoneal da associação de Ketamina (70mg/kg) e Xilasina (15mg/kg). Após confirmação do plano anestésico, foram introduzidos dois eletrodos percutâneos no membro posterior direito dos animais, o primeiro na fossa poplítea e o segundo na região do tendão do calcâneo, regiões correspondentes às inserções do músculo gastrocnêmio. Posteriormente os animais foram posicionados no equipamento indutor de lesão, em decúbito dorsal, com o quadril em leve flexão, joelho em extensão, e tornozelo em flexão plantar, tendo a pata direita fixada ao equipamento com uma fita adesiva (fita crepe) (figura 2). O estímulo elétrico foi realizado com intensidade suficiente para a contração completa do membro posterior, induzindo uma flexão plantar do tornozelo, sendo em seguida acionado o gatilho do equipamento indutor de lesão, que promoveu o movimento de dorsiflexão de forma abrupta, cessando a corrente elétrica logo em seguida. A ação do equipamento realizou de forma brusca o movimento contrário ao movimento gerado pela contração muscular, exigindo a contração excêntrica da musculatura, gerando uma lesão em estiramento. Esse procedimento foi repetido até que se totalizassem 10 séries, com 30 segundos de intervalo. Em cada série foi liberada 2,25J de energia, totalizando 22,5J de energia aplicados na lesão muscular. Esse protocolo foi adaptado de (Pachioni et al. 2009).

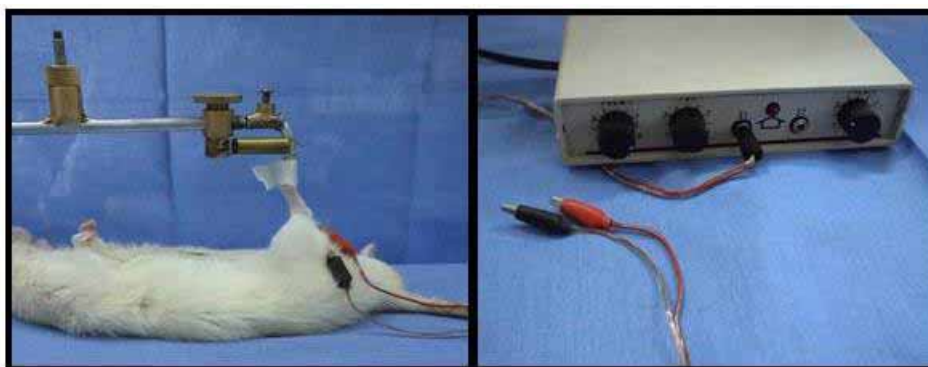


Figura 2: Do lado esquerdo o equipamento indutor de estiramento mecânico não invasivo, e do lado direita o estimulador elétrico.

Coleta e Preparo das Amostras

Após o período experimental os animais foram eutanasiados por meio de *overdose* de anestésico, Xilasina e Ketamina. Em seguida o músculo gastrocnêmio

direito dos animais foi retirado, e submetido ao Método de Congelamento de Tecido Não Fixado (CAMARGO FILHO et al., 2011). Posteriormente os músculos foram armazenados em freezer de ultrabaixa temperatura, a -75°C . As amostras foram seccionadas no criostato, Microm, HM 505 E, a -20°C , com espessura de $5\mu\text{m}$ para confecção das lâminas histológicas, que foram coradas pelos métodos de Hematoxilina e Eosina (HE) e picrosirius. Os cortes histológicos foram realizados no sítio da lesão, para isso, previamente ao preparo das lâminas os corte foram analisados por meio do corante azul de toluidina para verificação da área da lesão.

Análise das Lâminas histológicas

Para aquisição das imagens das lâminas de HE utilizou-se o microscópio óptico, Nikon Eclipse, 50i, com acoplamento de câmera fotográfica *Infinity 1*. As imagens foram obtidas por meio do *software NIS-Elements D3*.

As lâminas coradas com picrosirius foram fotografadas por meio do microscópio de luz polarizada, Leica DM 4000B, acoplado a câmera DFC500, Leica, pertencente à Faculdade de Odontologia da UNESP, campus de Araçatuba. Todas as imagens, de HE e picrosirius, foram obtidas com a objetiva de 10x.

Para análise fractal as imagens, tanto de HE quanto de picrosirius, passaram pelo processo de binarização, tornando-as preto e branco. As imagens de HE apresentaram o núcleo celular branco com o restante da célula preta, e, para que fosse realizada a análise fractal, foi aplicada a inversão das cores, tornado o núcleo preto e o restante da célula preta (figura 3). Esse procedimento foi necessário, pois a análise fractal mensura a área em preto da imagem. As imagens do picrosirius apresentaram o colágeno, originalmente vermelho, verde e amarelo, em preto, e o restante da célula em branco (figura 4), nesse caso não foi necessário aplicar a inversão de cores.

Posteriormente a análise da dimensão fractal foi realizada pelo método *box-counting*. Todos os procedimentos foram realizados no *software ImageJ*, com a adição do *plugin Fractal Dimension and Lacunarity*, ambos disponíveis gratuitamente na internet (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Os tamanhos das caixas utilizado na análise foram as medidas que vem como padrão no software (2,3,4,6,8,12,16,32,64).

Análise Estatística

Foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk para verificação da distribuição Gaussiana. Confirmada a normalidade dos dados, utilizou-se o teste de Anova *one-way*, e pós-teste de Tukey para verificação das diferenças entre os grupos. Para todas as análises foi adotado o nível de significância de 5%.

Resultados

A imagem de HE após o processo de binarização apresentou os núcleos celulares em preto, e todo o restante das células, citoplasma, membrana plasmática, e outros elementos, em branco (figura 3).

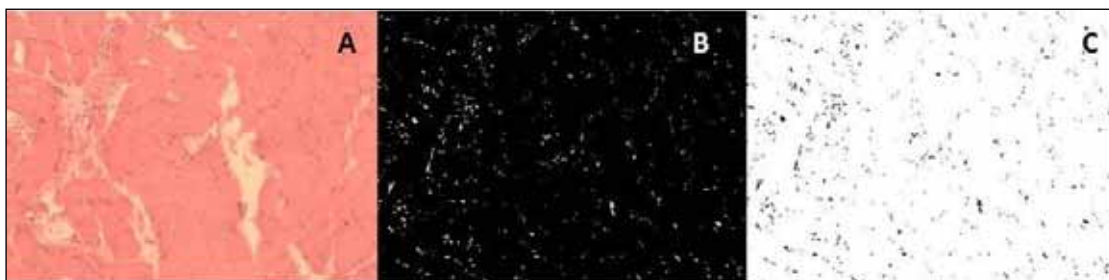


Figura 3: Imagem do músculo de um animal do grupo L7 corado com HE, demonstrando passo-a-passo como foi processada a imagem para permitir a análise da dimensão fractal. **A:** Foto original, aumento de 200x, coloração de HE; **B:** A mesma imagem, após o processo de binarização; **C:** Inversão das cores, núcleos em preto e o restante da célula em branco, imagem pronta para a análise fractal.

As imagens das lâminas coradas com picosirius foram obtidas por meio de microscópio de luz polarizada, e após o processo de binarização o colágeno ficou preto e o restante da célula branco (figura 4).

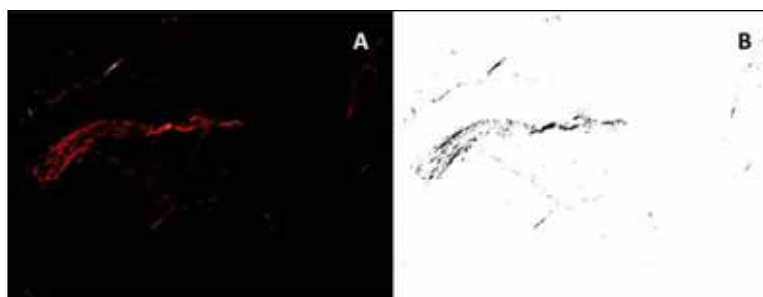


Figura 4: Imagem do músculo de um animal do grupo L7 corado com picosirius. O colágeno, originalmente em vermelho, é revertido em preto para a realização da mensuração da dimensão fractal. **A:** Imagem original, aumento de 200x, coloração de picosirius; **B:** Resultado da binarização, imagem pronta para a análise fractal.

A análise da DF nas lâminas coradas com HE apresentou um aumento significativo da DF nos grupos L2 e L7 em relação ao C (figura 5), entretanto não houve diferença significante entre os grupos experimentais, L2 e L7.

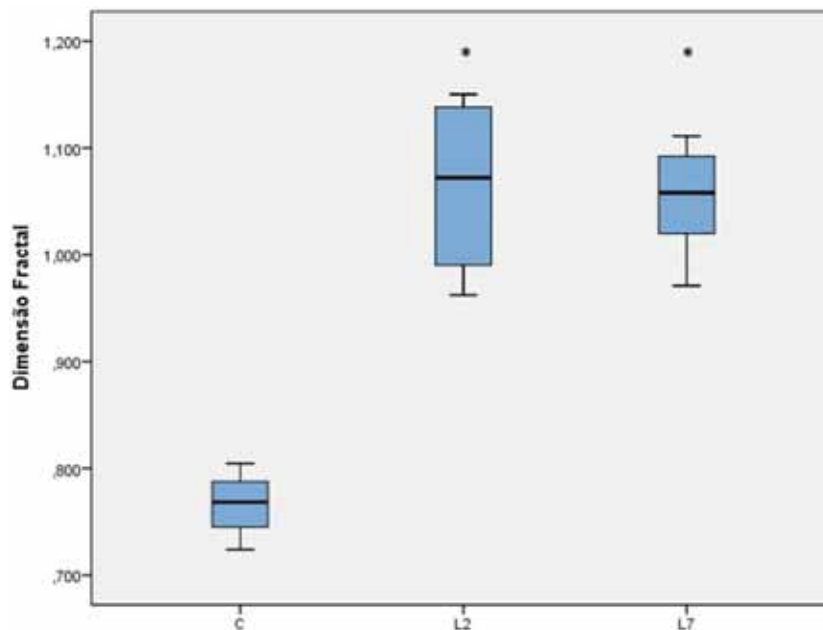


Figura 5: Box-plot com valores da dimensão fractal das lâminas coradas com HE. * Diferença estatística em relação ao grupo C ($p=0,000$)

A análise do colágeno, realizada por meio das imagens coradas com picrosirius, não apresentou alteração significativa entre os grupos C e L2, e entre os grupos C e L7. Porém o grupo L7 apresentou menor área de colágeno quando comparado com o grupo L2 (figura 6).

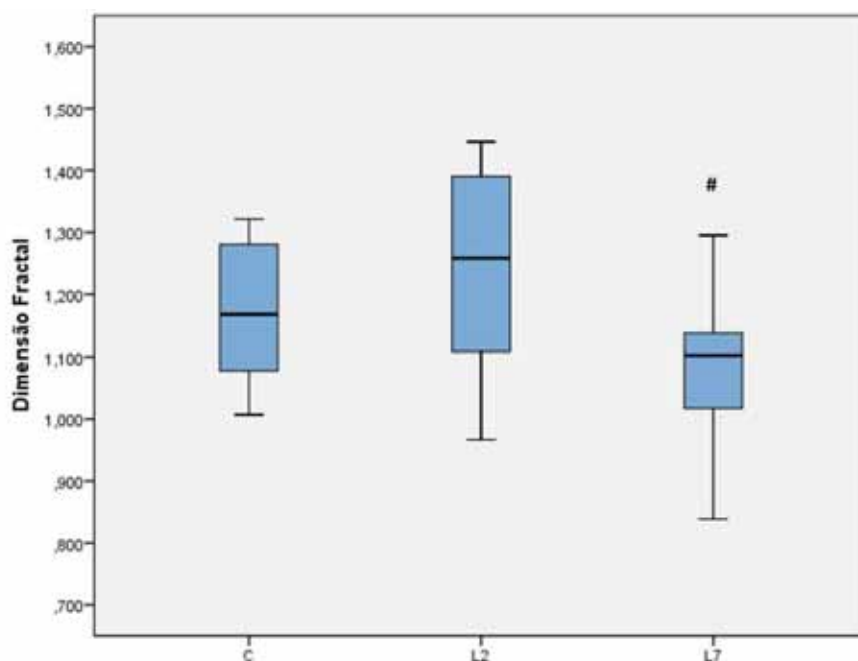


Figura 6: Valores de média e desvio padrão da dimensão fractal de lâminas coradas com picrosirius. # Diferença estatística em relação ao grupo L2 ($p=0,001$).

Discussão

O presente estudo demonstrou, por meio de análise fractal, que a lesão muscular promoveu aumento da dimensão fractal no sítio da lesão, sendo que tal alteração não foi revertida ao período de sete dias pós-lesão. Quando analisada a quantidade de colágeno, não houve alteração dois dias após a lesão, entretanto ao período de sete dias a quantidade de colágeno foi significativamente menor.

No presente estudo a técnica foi aplicada com o objetivo de avaliar o processo inflamatório, por meio da mensuração do tamanho do infiltrado inflamatório no sítio da lesão. O infiltrado inflamatório é identificado como um infiltrado celular com distribuição difusa entre as células musculares, sendo decorrente do influxo de linfócitos ao sítio da lesão (Camargo Filho et al. 2011). Quando submetidos ao processo de binarização, lâminas coradas com HE têm os núcleos destacados do restante das células, sendo possível mensurar o tamanho do infiltrado pela análise da dimensão fractal.

Atualmente a análise histológica do tecido muscular é realizada de forma qualitativa, por meio de características do tecido a partir da morfologia das células, tamanho, posição de núcleo, presença de infiltrado inflamatório, entre outras características (Camargo Filho et al. 2011). Todavia esse tipo de análise é dependente do analisador, podendo apresentar variação intra e interobservador (Moreira et al. 2011). Nesse contexto a análise por meio da dimensão fractal além de quantificar as alterações histológicas, apresenta a vantagem de ser independente do avaliador, pois se trata de uma análise automática realizada pelo *software*.

O acúmulo de células nos primeiros três dias após a lesão muscular, observado na presente pesquisa, também foi encontrado por outros autores, seja a lesão induzida por contusão (Luo et al. 2013), criolesão (Alves et al. 2013), esmagamento (Shono et al. 2013) ou estiramento (Song, Nakazato, and Nakajima 2004), sendo analisados por meio de lâminas de tecido muscular coradas com HE e observados ao microscópio óptico, avaliadas qualitativamente.

A lesão muscular desencadeia o processo inflamatório que pode ser dividido em três fases: degeneração, reparo e remodelamento. A primeira fase inicia-se no momento da lesão, nela ocorre grande acúmulo de células de defesa, principalmente neutrófilos e macrófagos, que atuam na degradação das estruturas lesadas, entretanto elas liberam no meio extracelular citotoxinas que acabam por danificar também células saudáveis, exacerbando o processo inflamatório (Souza and Gottfried 2013).

Sete dias após a lesão ainda foi constatada elevado valor de dimensão fractal, quando comparado o L7 com o C. Outros estudos realizados com HE também relataram grande quantidade de células nucleadas sete dias após a lesão muscular (Luo et al. 2013; Myburgh, Kruger, and Smith 2012; Shu et al. 2012). Nesse período o processo inflamatório continua sua ação, agora na fase de reparo. O acúmulo de células nucleadas continua sendo perceptível no sítio da lesão, porém nesse período células satélites são atraídas para o sítio da lesão, por citocinas liberadas pelos macrófagos. Essas células são

células tronco que se diferenciam em mioblastos e miofibrilas, de acordo com os fatores de crescimento presente no sítio da lesão, promovendo a miogênese (Järvinen, Järvinen, and Kalimo 2013; Souza and Gottfried 2013). A formação de novas fibras é iniciada, porém o amadurecimento dessas células e a total recuperação do muscular lesado em geral ocorrem entre 14 e 21 dias após a lesão, dependendo da intensidade da lesão.

Na presente pesquisa o colágeno apresentou alteração apenas no grupo L7 quando comparado com o grupo C, apresentando menor valor de dimensão fractal. Estudos que utilizam da técnica de coloração com picrossirius, quando analisado por microscopia de luz polarizada, analisam o colágeno por meio da birrefringência, em que o colágeno tipo I fica evidente na cor de amarelo a vermelha, enquanto fibras colágenas tipo III apresentam-se esverdeado, e o restante da célula fica apresenta-se preta. (França et al. 2013; Junqueira, Montes, and Sanchez 1982; Rodrigues et al. 2014)

A análise fractal do colágeno é capaz de mensurar não apenas as áreas em vermelho, correspondente aos colágenos I e II, mas também aos demais que se apresentam em amarelo e verde, como o colágeno tipo III. Dessa forma essa técnica demonstrou ser sensível a alterações no presente estudo, visto que houve diferenças entre os grupos.

Estudo que realizou análise de colágeno por *immunolabeling* para demonstração de colágeno tipo I e III em lesão muscular, encontrou maior quantidade de colágeno tipo I com sete e 14 dias após a lesão, quando comparado ao grupo sem lesão. Entretanto o colágeno tipo III apresentou redução aos sete dias em comparação ao controle, aumentando em seguida com 14 dias após a lesão (de Souza et al. 2011). Como o presente estudo não diferenciou os tipos de colágeno, a redução do colágeno pode ser devido à redução do colágeno tipo III, que não foi suprida pelo aumento do colágeno tipo I. O colágeno é um importante componente da musculatura esquelética, pois é responsável pela estrutura, organizando o tecido muscular em vários níveis, desde fáscia e epimísio, ao perimísio e endomísio, sendo composto principalmente por colágeno tipo I, e tipo III. (Calvi et al. 2012)

A presente pesquisa visou demonstrar um novo tipo de análise de lesão muscular em lâminas histológicas, entretanto algumas limitações devem ser pontuadas: o protocolo de lesão apesar de apresentar a vantagem de não ser invasivo, permite uma pequena variação na extensão da lesão, devido a diferenças entre animais, como o comprimento do membro posterior, por exemplo; A análise fractal do colágeno pelo método de picrossirius não é capaz de diferenciar os tipos de colágeno, mesmo apresentando coloração diferente nas lâminas histológicas, pois o processo de binarização destacou todas as diferentes cores dos colágenos em preto; O tempo de recuperação não foi suficiente para análise do tecido cicatricial, i.e. fibrose, para tal análise sugerimos o tempo de recuperação maior que 7 dias.

Os resultados da presente pesquisa demonstraram que a análise fractal foi capaz de identificar e quantificar alterações no tecido muscular esquelético após lesão, por

meio de análise de lâminas coradas com HE, e alterações do colágeno em lâminas coradas com picosirius. Essa técnica pode auxiliar a avaliação dos achados histológicos em tecido muscular histológico, tanto para a pesquisa científica quanto para a prática clínica, permitindo uma mensuração padronizada dos achados, e uma avaliação quantitativa das alterações teciduais,

Referências

- Alves, A. N. et al. 2013. “Modulating Effect of Low Level-Laser Therapy on Fibrosis in the Repair Process of the Tibialis Anterior Muscle in Rats.” *Lasers in medical science* 1–9. Retrieved January 31, 2014 (<http://dx.doi.org/10.1007/s10103-013-1428-9>).
- Calvi, Eliziane Nitz de Carvalho et al. 2012. “An Experimental Model for the Study of Collagen Fibers in Skeletal Muscle.” *Acta Cirurgica Brasileira* 27(10):681–86. Retrieved October 7, 2014 (http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-86502012001000003&script=sci_arttext).
- Camargo Filho, José Carlos Silva et al. 2011. “Efeitos Do Exercício Aeróbio No Músculo Esquelético de Ratos Expostos À Fumaça de Cigarro.” *Revista Brasileira de Medicina do Esporte* 17(6):416–19. Retrieved October 22, 2013 (http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-86922011000600010&lng=pt&nrm=iso&tlng=en).
- França, Cristiane Miranda et al. 2013. “Effect of Laser Therapy on Skeletal Muscle Repair Process in Diabetic Rats.” *Lasers in medical science* 28(5):1331–38. Retrieved September 8, 2014 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23262549>).
- Gupta, Sumit et al. 2014. “Quantitative Computed Tomography-Derived Clusters: Redefining Airway Remodeling in Asthmatic Patients.” *The Journal of allergy and clinical immunology* 133(3):729–38.e18. Retrieved October 14, 2014 (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3969578&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Järvinen, TAH, M. Järvinen, and Hannu Kalimo. 2013. “Regeneration of Injured Skeletal Muscle after the Injury.” *Muscles, ligaments and ...* 3(4):337–45. Retrieved June 24, 2014 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3940509/>).
- Junqueira, LCU, GS Montes, and EM Sanchez. 1982. “The Influence of Tissue Section Thickness on the Study of Collagen by the Picosirius-Polarization Method.” *Histochemistry* 153–56. Retrieved September 8, 2014 (<http://link.springer.com/article/10.1007/BF00495061>).
- Karperien, Audrey et al. 2008. “Automated Detection of Proliferative Retinopathy in Clinical Practice.” *Clinical Ophthalmology* 2(1):109. Retrieved September 15, 2014

(<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2698675&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).

- Lee, Lik Hang et al. 2014. “Digital Differentiation of Non-Small Cell Carcinomas of the Lung by the Fractal Dimension of Their Epithelial Architecture.” *Micron (Oxford, England : 1993)* 67:125–31. Retrieved October 14, 2014 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25151215>).
- Luo, Li et al. 2013. “Effects of Low-Level Laser Therapy on ROS Homeostasis and Expression of IGF-1 and TGF- β 1 in Skeletal Muscle during the Repair Process.” *Lasers in medical science* 28(3):725–34. Retrieved October 15, 2013 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22714676>).
- Mendonça, Marcelo Bezerra de Melo de et al. 2007. “Análise Fractal Da Vasculatura Retínica: Métodos de Segmentação E de Cálculo Dimensional.” *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia* 70(3):413–22. Retrieved September 11, 2014 (http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-27492007000300006&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt).
- Michallek, Florian, and Marc Dewey. 2014. “Fractal Analysis in Radiological and Nuclear Medicine Perfusion Imaging: A Systematic Review.” *European radiology* 24(1):60–69. Retrieved August 28, 2014 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23974703>).
- Moreira, Roberto Douglas, Antonio Roberto Moriel, Luiz Otávio Murta Junior, Leandro Alves Neves, and Moacir Fernandes de Godoy. 2011. “Dimensão Fractal Na Quantificação Do Grau de Rejeição Celular Miocárdica Pós-Transplante Cardíaco.” *Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular* 26(2):155–63. Retrieved September 10, 2014 (http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-76382011000200004&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt).
- Myburgh, Kathryn H., Maria J. Kruger, and Carine Smith. 2012. “Accelerated Skeletal Muscle Recovery after in Vivo Polyphenol Administration.” *The Journal of nutritional biochemistry* 23(9):1072–79. Retrieved October 17, 2013 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22079208>).
- Pachioni, Célia Aparecida Stellutti et al. 2009. “Stretch Injuries of Skeletal Muscles: Experimental Study in Rats’ Soleus Muscle.” *International Journal of Morphology* 27(4). Retrieved January 13, 2014 (http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-95022009000400029&lng=en&nrm=iso&tlng=en).
- Park, So Hee et al. 2014. “Texture Analyses Show Synergetic Effects of Biomechanical and Biochemical Stimulation on Mesenchymal Stem Cell Differentiation into Early Phase Osteoblasts.” *Microscopy and microanalysis : the official journal of Microscopy Society of America, Microbeam Analysis Society, Microscopical Society of Canada* 20(1):219–27. Retrieved October 11, 2014 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24279928>).

- Ristanović, Dušan, Bratislav D. Stefanović, and Nela Puškaš. 2014. "Fractal Analysis of Dendrite Morphology Using Modified Box-Counting Method." *Neuroscience research* 84:64–67. Retrieved October 14, 2014 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24800643>).
- Rodrigues, Natalia C. et al. 2014. "Morphological Aspects and Cox-2 Expression after Exposure to 780-Nm Laser Therapy in Injured Skeletal Muscle: An in Vivo Study." *Brazilian Journal of Physical Therapy* 00(ahead):00–00. Retrieved September 29, 2014 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25185029>).
- Shono, Jun-Ichi et al. 2013. "Preliminary Time-Course Study of Antiinflammatory Macrophage Infiltration in Crush-Injured Skeletal Muscle." *Animal science journal = Nihon chikusan Gakkaiho*. Retrieved October 14, 2013 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23980916>).
- Shu, Bin, Zhijin Yang, Xiangping Li, and Li-qun Zhang. 2012. "Effect of Different Intensity Pulsed Ultrasound on the Restoration of Rat Skeletal Muscle Contusion." *Cell biochemistry and biophysics* 62(2):329–36. Retrieved October 14, 2013 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22068832>).
- Song, Hongsun, Koichi Nakazato, and Hiroyuki Nakajima. 2004. "Effect of Increased Excursion of the Ankle on the Severity of Acute Eccentric Contraction-Induced Strain Injury in the Gastrocnemius: An in Vivo Rat Study." *The American journal of sports medicine* 32(5):1263–69. Retrieved September 4, 2014 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15262652>).
- Souza, Jaqueline de, and Carmem Gottfried. 2013. "Muscle Injury: Review of Experimental Models." *Journal of Electromyography and Kinesiology* 23(6):1253–60. Retrieved October 14, 2013 (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050641113001788>).
- De Souza, Thais Oricchio Fedri et al. 2011. "Phototherapy with Low-Level Laser Affects the Remodeling of Types I and III Collagen in Skeletal Muscle Repair." *Lasers in medical science* 26(6):803–14. Retrieved October 15, 2013 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21761120>).

Artigo Original**Análise da terapia a laser associada ou não ao plasma rico em plaquetas na reparação do tecido muscular por espectroscopia de Raman**

Analysis of laser therapy associated or not to platelet rich plasma on repair of muscle tissue by Raman spectroscopy

Guilherme Akio Tamura Ozaki¹, Regina Celi Trindade Camargo¹, Tatiana Emy Koike¹, Thiago Alves Garcia¹, Robson Chacon Castoldi², João Domingos Augusto dos Santos Pereira³, Carlos José Leopoldo Constantino³, José Carlos Silva Camargo Filho¹

¹ Faculdade de Ciências e Tecnologia, FCT/UNESP, Campus de Presidente Prudente. Departamento de Fisioterapia.

² Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP. Departamento de Ortopedia e Traumatologia.

³ Faculdade de Ciências e Tecnologia, FCT/UNESP, Campus de Presidente Prudente. Departamento de Física, Química e Biologia

Endereço para correspondência

Guilherme Akio Tamura Ozaki
Rua Roberto Simonsen, 305
19060-900 - P. Prudente, SP
Fone: (18) 3229- 5822

Resumo

O tratamento de lesões musculares geralmente resulta na interrupção da atividade esportiva, por isso estudos que visam antecipar o retorno à atividade, com o adequado reparo tecidual se tornam importantes. Sendo assim, o presente estudo objetivou avaliar o efeito da terapia a laser de baixa intensidade (LLLT) associada ou não ao plasma rico em plaquetas (PRP) no tratamento de lesão muscular. Foram utilizados 35 animais divididos em cinco grupos (n=7): Controle (C), Controle Lesão (CL), Lesão LLLT (LLt), Lesão PRP (LP), e Lesão LLLT e PRP (LLtP). A lesão muscular foi induzida por estiramento no músculo gastrocnêmio e, os animais dos grupos LP e LLtP, receberam a aplicação do PRP imediatamente após a lesão. O LLLT foi aplicado diariamente por sete dias. Os animais foram eutanasiados no sétimo dia após a lesão. Foram realizadas análise de NAD, NADH e colágeno por espectroscopia de RAMAN, além da análise histológica, todas no músculo gastrocnêmio. O grupo LLtP apresentou menor área de lesão, células em regeneração e aspecto sadio das fibras musculares. A análise do Raman demonstrou redução na relação NADH/NAD no grupo CL, evidenciando estresse oxidativo, e o colágeno apresentou-se reduzido nos grupos CL e LLt, em relação ao C. Conclui-se que apesar dos tratamentos serem efetivos em reparar o dano causado pela lesão muscular, a associação das técnicas demonstrou melhor aspecto histológico. Além disso, tanto o LLLT quanto o PRP e a associação de ambos foram capazes de reduzir o estresse oxidativo gerado pela lesão, e modular a produção de colágeno nesse tecido.

Palavras-Chave: Músculo Esquelético, Lesão, Terapia a Laser de Baixa Intensidade, Plasma Rico em Plaquetas, Espectroscopia de Raman.

Abstract

Treatment of muscle injuries usually results in the interruption of sports practice, so studies aimed at anticipating the return to activity, with proper tissue repair become important. Therefore, this study intended to evaluate the effect of low level laser therapy (LLLT) associated or not with platelet-rich plasma (PRP) in the treatment of muscle injury. Thirty five animals were used divided into five groups (n=7), Control (C), Injury Control (CL), Injury LLLT (LLT), Injury PRP (LP), and Injury LLLT and PRP (LLtP). Muscle injury were induced by stretching on gastrocnemius muscle and the animals of groups LLtP and LP received the application of PRP immediately after the injury. The LLLT were applied daily for seven days. The animals were euthanized seven days after the injury. Analysis of NADH, NAD and collagen were performed by Raman spectroscopy, besides histological analysis, of the gastrocnemius muscle. The LLtP group showed reduction of injury area, regenerating cells, and healthy appearance of muscle fibers. The analyses of Raman showed reduction on NADH/NAD ratio in CL group, revealed oxidative stress, and the collagen showed reduction on groups CL, LLt, when compared with C. Conclude that besides both treatments being effective in repair the damage caused by muscle injury, the association of both showed better histological aspect. Furthermore, either LLt or the PRP, and the association of both were able to reduce the oxidative stress promoted by injury and modulate the collagen production in it.

Keywords: Skeletal Muscle, Injury, Low-Level Laser Therapy, Platelet Rich Plasma, Raman spectroscopy.

Introdução

Lesões musculares são comuns na prática esportiva, prejudicando tanto atletas profissionais como amadores [1, 2], resultando na interrupção da atividade esportiva para o tratamento. Nesse sentido o maior desafio da reabilitação é promover o reparo tecidual adequado com um tempo menor de atenção para que o indivíduo esteja apto a retomar suas atividades o quanto antes, fato importante tanto para que atletas não percam desempenho, quanto para os esportistas amadores não se afastarem de seus hábitos saudáveis [3, 4].

A fim de promover o reparo tecidual adequado e prevenir possíveis complicações, como lesões recidivas e o processo fibrótico, além de habilitar o retorno precoce às atividades desportivas, a terapia a laser de baixa intensidade (LLLT) e o Plasma Rico em Plaquetas (PRP) têm sido estudados e apresentados bons resultados na literatura científica. [5–8]

A LLLT é uma técnica muito utilizada em clínicas de reabilitação no tratamento de lesões musculares. Estudos evidenciam que o LLLT estimula o processo de regeneração muscular, acelerando a formação de novas fibras por meio da ativação das células satélites latentes, que promovem a regeneração das fibras musculares lesadas [8–10]. Além disso, o LLLT atua na resposta ao estresse oxidativo ocasionado pelo processo inflamatório, aumentando a atividade antioxidante, com conseqüente diminuição do estresse oxidativo, aumento da atividade respiratória mitocondrial, síntese de ATP; e prevenção da fibrose resultante do processo de cicatrização da musculatura por meio da inibição da expressão de TGF- β . [8, 10]

Com relação ao PRP, este é uma técnica que atualmente é muito utilizado em tratamento de lesões musculares, ósseas e tendinosas [11]. É composto por concentrado de plaquetas que possui propriedades regenerativas e altas concentrações de citocinas, como os fatores de crescimento VEGF, que estimula a angiogênese, o IGF-1, que promove a miogênese, o TGF- β , entre outros [12, 13]. Esses elementos apresentam capacidade de acelerar o processo de regeneração do tecido muscular, principalmente nas primeiras semanas pós-lesão. [5, 14]

A lesão muscular promove uma série de alterações no tecido muscular esquelético cujas alterações estruturais são visíveis quando analisadas por meio de lâminas histológicas em microscópio óptico. Nesse sentido a espectroscopia de Raman vem sendo estudada, pois se trata de uma ferramenta analítica, de aplicação rápida e confiável, que fornece a estrutura molecular de componentes químicos em amostra heterogênea. [15]

Estudos que analisem a associação de ambas as técnicas, LLLT e PRP, não foram encontrados na literatura científica, fato que motivou o desenvolvimento da presente pesquisa, pois ambas promovem melhora no reparo por mecanismos distintos, e não há indícios de que essa associação possa promover efeitos nocivos.

Face às considerações supracitadas, a presente pesquisa, embasada nos conhecimentos dos efeitos fisiológicos gerados por cada técnica, pretende associar o LLLT ao PRP com o pressuposto de que a associação da LLLT com o PRP possibilite redução no tempo e melhora na qualidade da reparação tecidual, com significativa diminuição dos processos fibróticos comumente encontrados, permitindo assim a criação de um protocolo efetivo de tratamento nas lesões musculares, induzindo a um processo de reabilitação mais rápido e de melhor qualidade.

Portanto o objetivo do estudo foi analisar os efeitos da terapia a laser de baixa intensidade, do plasma rico em plaquetas, e a associação de ambas, no reparo do tecido muscular de ratos após lesão por estiramento.

Materiais e métodos

Foram utilizados 35 ratos machos da linhagem Wistar (*Rattos Novergicus*) com 150 dias que fornecidos pelo biotério central da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de Botucatu-SP e mantidos no biotério do Laboratório de Histologia e Histoquímica da Faculdade de Ciências e Tecnologia de Presidente Prudente (FCT/UNESP) em gaiolas coletivas com cinco animais cada, sob condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), umidade ($50 \pm 10\%$) e ciclo claro/escuro de 12 horas (7-19h), com água e ração fornecidos *ad libitum*.

Todos os procedimentos foram aprovados pelo comitê de ética para uso de animais da FCT/UNESP, Campus de Presidente Prudente, protocolo 01/2013.

Grupos Experimentais

Os animais foram separados aleatoriamente em cinco grupos de acordo com as variáveis:

- **Grupo Controle (C):** animais que permaneceram no biotério, e não foram submetidos a nenhum procedimento até serem eutanasiados de forma pareada com os grupos experimentais.
- **Grupo Controle Lesão (CL):** animais submetidos ao protocolo de lesão muscular, e eutanasiados após sete.
- **Grupo Lesão Muscular Terapia a Laser de Baixa Intensidade (LLt):** animais submetidos ao protocolo de lesão muscular, e a aplicação de laser no local da lesão.
- **Grupo Lesão Muscular PRP (LP):** animais que foram submetidos ao protocolo de lesão muscular e receberam aplicação de PRP no local da lesão imediatamente após a lesão.
- **Grupo Lesão Muscular LLP e PRP (LLtP):** animais submetidos ao protocolo de lesão muscular e tratados com a combinação das duas técnicas citadas anteriormente, laser e PRP.

Delineamento experimental

Os animais foram inicialmente anestesiados com administração intraperitoneal de ketamina (70 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg) [16]. Em seguida os animais dos grupos LP e LLtP foram submetidos à punção cardíaca, para preparação do PRP, sendo em seguida submetidos ao protocolo de lesão muscular. Os demais grupos foram submetidos ao protocolo de lesão logo após a confirmação da anestesia.

A aplicação do PRP se deu logo após a lesão, com os animais ainda sob efeito da anestesia, e o tratamento com a LLLT também se iniciou logo após a lesão.

Obtenção do PRP

Após os animais serem anestesiados, foi realizada a punção cardíaca utilizando-se seringa descartável contendo 0,2 ml de citrato de sódio a 10%, sendo puncionado 4 ml de sangue. Imediatamente após a punção, foi injetada solução de soro fisiológico no mesmo volume que fora extraído de sangue para restauração da volemia.

Em seguida o sangue coletado foi centrifugado a 200 g por 15 minutos. A amostra foi então fracionada em três componentes: a fração inferior vermelha, composta basicamente por células vermelhas; uma fração amarela-palha (*buffy coat*), com componente sérico e alta concentração de plaquetas e a fração superior, composta basicamente por plasma sanguíneo [17]. Foi pipetada a fração superior, incluindo o *buffy coat*. O conteúdo pipetado novamente centrifugado a 500g por 10 minutos, sendo então pipetados 0,2 ml do conteúdo presente no fundo do tubo [18].

Contagem das plaquetas

As amostras de sangue e PRP foram analisadas no laboratório do Hospital Veterinário da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), por meio do analisador automático de células sanguíneas (pocH 100iy Diff, da marca Sysmex). Foi realizada a contagem das plaquetas em duas amostras sanguíneas, e em três amostras do PRP.

Protocolo de Lesão Muscular

Depois de anestesiados, foram introduzidos dois eletrodos percutâneos no membro posterior direito dos animais, o primeiro na fossa poplítea e o segundo na região do tendão do calcâneo, regiões correspondentes às inserções do músculo gastrocnêmio. Posteriormente os animais foram posicionados no equipamento indutor de lesão, em decúbito dorsal, com o quadril em leve flexão, joelho em extensão, e tornozelo em flexão plantar, tendo a pata direita fixada ao equipamento com uma fita adesiva (fita crepe) (figura 1). O estímulo elétrico foi realizado com intensidade suficiente para a contração completa do membro posterior, induzindo flexão plantar do tornozelo, sendo em seguida acionado o gatilho do equipamento indutor de lesão, que promoveu o movimento de dorsiflexão de forma abrupta, cessando a corrente elétrica logo em seguida. Esse procedimento foi repetido até que se totalizassem 10 séries, com 30 segundos de intervalo. Em cada série foi liberada 2,25J de energia, totalizando 22,5J de energia aplicados na lesão muscular. Esse protocolo foi adaptado de PACHIONI et al. (2009).

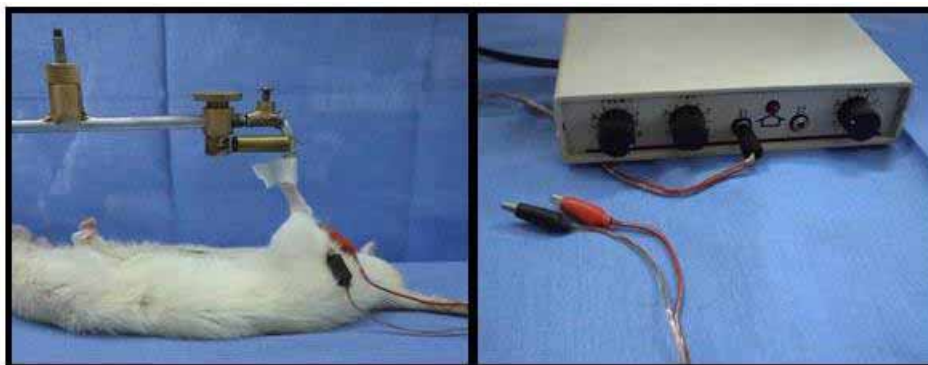


Figura 1: Do lado esquerdo o equipamento indutor de estiramento mecânico não invasivo, e do lado direita o estimulador elétrico.

Aplicação do PRP

Foram injetados 100 μ l de PRP nos animais dos grupos LP e LLtP, por meio de uma seringa descartável, no terço distal da tíbia, a fim de ser aplicado no ventre do músculo gastrocnêmio, imediatamente após o término do protocolo de lesão muscular [6].

Protocolo de Terapia a Laser de Baixa Intensidade

Foi utilizado um equipamento laser diodo, Coherent Cube Laser, previamente calibrado, com comprimento de onda de 637 nm, 25 mW de potência, feixe luminoso de 1mm de diâmetro e emissão contínua por 10 segundos, totalizando dose de 0,25J/cm². O laser foi aplicado em ponto único [20], diariamente, iniciando-se no dia da lesão até que se completaram sete aplicações.

Coleta e Preparo das Amostras

Após o período experimental os animais foram eutanasiados por meio de overdose de anestésico, Xilasina e Ketamina. Em seguida o músculo gastrocnêmio direito dos animais foi retirado, e submetido ao Método de Congelamento de Tecido Não Fixado [21]. Posteriormente os músculos foram armazenados em freezer de ultrabaixa temperatura, Coldlab CL580-80V, a -75°C. As amostras foram seccionadas para confecção de lâminas histológicas, para análise por Raman e histologia, sendo que para a última as lâminas foram coradas pelo método de Hematoxilina e Eosina (HE) [22].

Análise Histológica

A análise histológica foi realizada de forma qualitativa nas lâminas coradas pelo método HE, por meio do microscópio *Nikon 550S*. A análise qualitativa foi baseada na morfologia do tecido muscular, infiltrado inflamatório, e tecido conjuntivo (endomísio e perimísio) [23].

Espectroscopia de espalhamento Raman

As medidas de espectroscopia Raman foram obtidas com um espectrógrafo micro-Raman, modelo in-Via da marca *Renishaw*. O laser utilizado possui o comprimento de onda de 514 nm com potência na amostra da ordem de microwatt (μ W) e a rede de difração foi de 1800 linhas por mm. O tempo de exposição adotado foi de 30 s, a quantidade de acumulações igual a três e a faixa de medição espectral foi de 400 cm⁻¹ a 3400 cm⁻¹. A análise foi realizada em cortes de 50 μ m, sem corante.

Visualização dos dados do espectro de Raman

Foi realizada a projeção dos espectros Raman para análise visual dos dados. Para isso tentou-se preservar as relações de similaridade, projetando os dados de uma espaço multidimensional em 2D. Com isso é possível analisar o aspecto geral de toda a amostra de forma clara, visto que cada espectro é composto por grande quantidade de valores numéricos.[24–26]

Análise estatística

Foi realizado o teste de Shapiro-Wilk para verificação da normalidade dos dados. Quando os dados apresentaram normalidade, prosseguiu-se com o teste de Anova one-way,

seguido pelo pós-teste de Tukey. Quando violada a normalidade dos dados, seguiu-se com o teste de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn. As análises foram realizadas no *software* SPSS v.22, e para todas as análises foi adotado o nível de significância de 5%.

Resultados

A contagem de plaquetas do PRP apresentou média de $4998,676 \times 10^3$ plaquetas/ μL de sangue, número quatro vezes maior que a encontrada no sangue do animal (1068×10^3 plaquetas/ μL de sangue).

A análise histológica demonstrou grande área de lesão no grupo CL (figura 2B), com presença de macrófagos e infiltrado inflamatório entre as células e no perímio, fibras musculares com sinais de estresse, como fibras arredondadas e angulares. Além disso, há desarranjo estrutural do tecido muscular.

O grupo LLt apresenta menor infiltrado inflamatório entre as células, entretanto há poucas células em regeneração, e o tecido ainda encontra-se desorganizado (figura 2C). No grupo LP além de pouco infiltrado inflamatório, há presença de células em regeneração (figura 2D). Já no grupo LLtP, o aspecto histológico demonstrou melhora superior aos tratamentos isolados, pois além de apresentarem células em regeneração e maior presença de vasos sanguíneos, houve menor área de lesão, e fibras musculares com aspecto sadio, sem a presença de indícios de estresse, como as fibras arredondadas presente nos demais grupos (figura 2E).

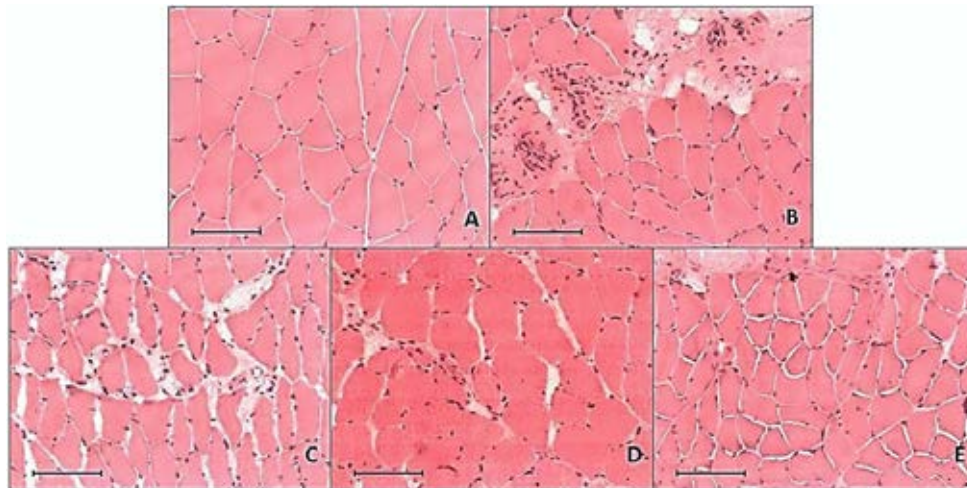


Figura 2: Corte transversal do músculo gastrocnêmio, barra de escala de $100\mu\text{m}$. Aspecto normal do tecido muscular do grupo C (A). Presença de infiltrado inflamatório entre as fibras e no perímio do grupo CL (B). Menor presença de infiltrado inflamatório, e melhor organização tecidual no grupo LLt (C), aspecto semelhante ao visto no LP, porém há presença de células em regeneração (D), e processo mais avançado de recuperação no grupo LLtP, com melhor organização tecidual, e fibras musculares sem sinais de estresse (E).

A análise exploratória visual dos espectros Raman apresenta-se na figura 3. Nela é possível observar o comportamento geral do sinal Raman diante das variáveis do estudo. Nota-se que a lesão promoveu alteração do sinal, e que, os métodos de tratamento aproximaram o

signal Raman para níveis mais próximos do grupo C, inclusive com a intersecção dos grupos, evidenciando que os tratamentos foram efetivos na regeneração do tecido lesado.

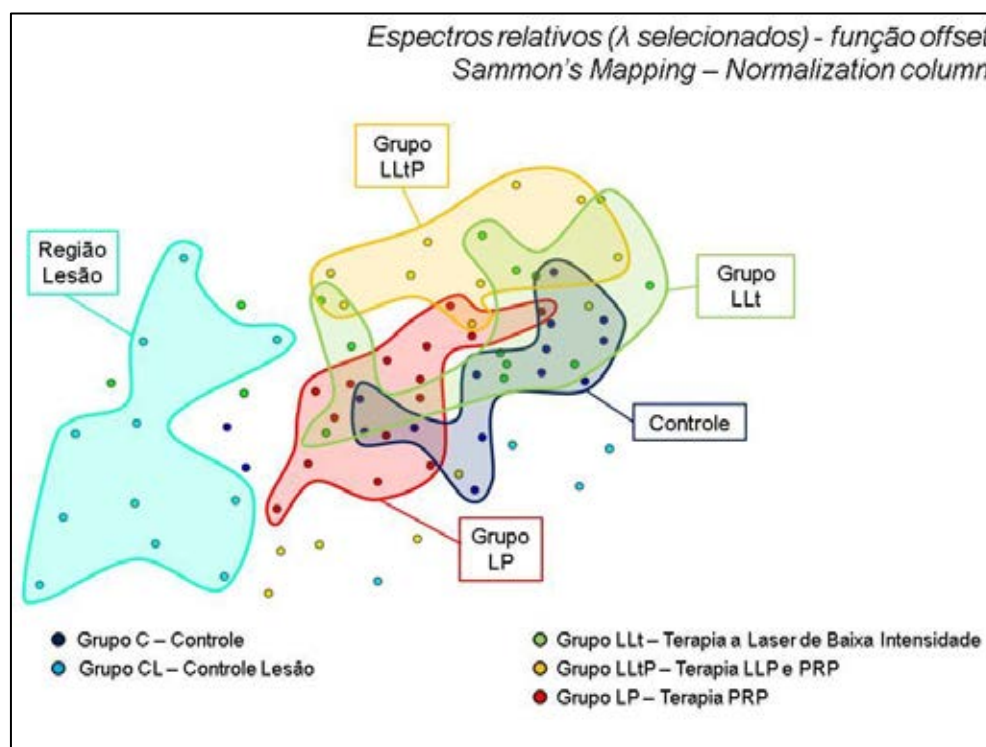


Figura 3: Cada ponto representa um animal. Nota-se o afastamento dos animais dos grupos lesão, CLA e CL; e a aproximação dos grupos LLt, LP e LLtP para perto do grupo C.

Para a análise do estresse oxidativo, foram utilizadas as bandas referentes ao NADH, 1546 cm^{-1} e 1688 cm^{-1} , e ao NAD, 998 cm^{-1} e 1032 cm^{-1} . Com os valores de pico dessas bandas, realizou-se a relação entre NADH/NAD (Tabela 1). Nota-se que a relação entre NADH/NAD apresentou redução nos grupos lesão, evidenciando estresse oxidativo promovido pela lesão muscular.

Tabela 1: Valores de média \pm desvio padrão das relações das bandas de NADH e NAD, em unidade arbitrária.

Grupo	Intensidade			
	1546/998	1546/1032	1688/998	1688/1032
C	1,95 \pm 0,11	1,79 \pm 0,12	1,85 \pm 0,11	1,70 \pm 0,10
CL	1,68 ^a \pm 0,32	1,55 ^b \pm 0,33	1,68 \pm 0,27	1,55 \pm 0,29
LLt	1,81 \pm 0,23	1,67 \pm 0,22	1,76 \pm 0,17	1,62 \pm 0,17
LP	1,83 \pm 0,11	1,69 \pm 0,11	1,83 \pm 0,09	1,68 \pm 0,06
LLtP	1,88 \pm 0,17	1,70 \pm 0,17	1,85 \pm 0,12	1,67 \pm 0,14

^a Diferença estatisticamente significativa com o grupo C, $p=0,01$. ^b Diferença significativa com o grupo C $p=0,03$;

A análise dos espectros referentes ao colágeno foi realizada nas bandas de 1171 cm^{-1} e 1662 cm^{-1} . Na banda de 1171 cm^{-1} , houve diminuição da intensidade no grupo CL em relação ao grupo C, na banda de 1662 cm^{-1} houve redução da intensidade quando comparado o grupo C com os grupos CL e LLt (Tabela 2).

Tabela 2: Valores de média e desvio padrão para intensidades do espectro de Raman referentes ao colágeno, em unidade arbitrária.

Grupo	Intensidade	
	1171 cm^{-1}	1665 cm^{-1}
C	1550,45 ± 256,20	2305,80 ± 365,99
CL	1250,86 ^a ± 354,07	1566,63 ^b ± 532,23
LLt	1260,6 ± 306,86	1818,33 ^c ± 424,25
LP	1248,67 ± 133,12	1873,09 ± 158,61
LLtP	1367,4 ± 346,38	2019,36 ± 501,65

As letras indicam diferença estatisticamente significativa com o grupo C; ^a p=0,02; ^b p=0,00; ^c p=0,03.

Discussão

A presente pesquisa se propôs a analisar os efeitos dos tratamentos de LLT, PRP e a associação de ambos no reparo da lesão muscular por estiramento em ratos. As análises demonstraram que a lesão promoveu alterações na morfologia da célula, perturbação do sinal Raman, além de estresse oxidativo e redução do colágeno. Com relação aos tratamentos, apesar de tanto o LLt quanto o PRP melhorarem a condição de estresse oxidativo, e da perturbação do sinal Raman, a análise histológica evidenciou melhor condição tecidual quando associadas as duas modalidades de tratamento.

A análise histológica demonstrou grande destruição tecidual no grupo lesão (CL). Entretanto, nos grupos tratados o tecido muscular apresentou melhor organização tecidual, e o processo de regeneração atuando na formação das novas fibras musculares. Além disso, a análise da projeção dos espectros Raman demonstrou afastamento do sinal Raman nos grupos lesado, CL, do grupo C.

A lesão muscular desencadeia o processo inflamatório, que pode ser dividido em três fases: degeneração, reparo e remodelamento. Na primeira fase ocorre a degeneração das fibras necróticas, por meio de neutrófilos e macrófagos. Os leucócitos além de realizar a fagocitose, liberam toxinas que facilitam a digestão das células lesadas. Entretanto esse processo acaba lesando algumas fibras adjacentes, por isso há a preocupação em modular o processo inflamatório a fim de evitar danos às estruturas saudáveis [3].

O grupo tratado com LLt apresentou menor área de lesão, com redução importante do infiltrado inflamatório. Estudo revelou que a aplicação de 1J de LLLT apresenta a capacidade de reduzir os níveis de insulinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6, e TNF- α , sendo superior à crioterapia e à aplicação de diclofenato na redução dessas citocinas inflamatórias na lesão muscular aguda [27]. Provavelmente a modulação dessas citocinas promoveu a regulação do processo inflamatório, reduzindo os danos no tecido muscular na presente pesquisa.

Na análise histológica do grupo tratado com PRP, observou-se aspecto parecido com os achados do grupo LLt. Entretanto no grupo LP há maior presença de células musculares em regeneração, sugerindo um estágio mais avançado de recuperação do LP em relação ao LLt. O PRP apresenta inúmeros fatores de crescimento que auxiliam o reparo do tecido muscular lesado. Estudos demonstram que sua aplicação aumenta a expressão de citocinas que auxiliam a regeneração muscular, dentre as quais estão o IGF-1, que estimula a ativação das células satélite em mioblasto, e o VEGF, que estimula a angiogênese [5].

Para que haja adequada resposta celular do tratamento com PRP, é necessária concentração de plaquetas superior a quatro vezes a quantidade encontrada no sangue [28]. Portanto o método descrito na presente pesquisa demonstrou-se eficaz na preparação do PRP, visto que houve 4,68 vezes mais plaquetas na amostra de PRP do que no sangue do animal. Segundo a avaliação do PAW, pela concentração de plaquetas, o PRP utilizado é classificado como P4. [29]

A associação dos tratamentos demonstrou melhor aspecto histológico, que provavelmente foi resultado da modulação do processo inflamatório do LLLT, associado ao grande potencial de regeneração do PRP, com os fatores de crescimento com o IGF-1 e o VEGF, possibilitando reparo tecidual de qualidade, e em menor tempo de recuperação. Essa combinação resultou em menor área de lesão, com presença de células em regeneração, vasos sanguíneos e aspecto sadio das fibras musculares. [5, 27]

A espectroscopia de Raman tem sido muito estudada recentemente, pois possibilita quantificar diversas estruturas, com pouco viés, visto que utiliza a amostra *in natura* sem a necessidade de reagentes, seja para fixação, seja para identificação das estruturas a serem estudadas, permitindo boa fidelidade dos dados. [30–34]

O método utilizado na presente pesquisa para análise do estresse oxidativo, foi baseado em estudos [30, 35] que utilizaram a espectroscopia de Raman para quantificar alterações de NAD e NADH. Essas moléculas estão envolvidas no processo metabólico das células musculares, além de estarem presentes no controle e produção das espécies reativas ao oxigênio (ROS) [30]. Os índices de NADH/NAD apresentaram redução no grupo CL, entretanto não se verificou diferenças significantes nos grupos tratados, seja por LLt, PRP ou na combinação de ambos. Desta forma, evidencia-se que os tratamentos foram eficazes em atenuar o estresse oxidativo gerado pela lesão muscular.

O processo inflamatório desencadeado pela lesão muscular demonstra ter relação com o estresse oxidativo, visto que sua exacerbação é geralmente acompanhada de aumento na produção das espécies reativas ao oxigênio [36]. O rompimento de fibras musculares desencadeia o processo inflamatório no sítio da lesão, que se inicia com a chegada de linfócitos, principalmente macrófagos tipo I e neutrófilos. Entretanto, durante a digestão das fibras necrosadas pelos neutrófilos, ocorre a produção de espécies reativas de oxigênio, devido às

quimiotoxinas liberadas. [37]. Além disso, estudo realizado relacionando o marcador de estresse oxidativo, *Thiobarbituric acid reactive substances* (TBARS), com marcador de lesão, creatina kinase (CK), e com o marcador de viabilidade mitocondrial, *Methyl-tetrazolium* (MTT), verificou que o estresse oxidativo passa por dois momentos: o primeiro relacionado ao dano mitocondrial que ocorre pouco depois da lesão, a partir de 30 minutos; e o segundo devido ao processo inflamatório em si, que apresenta aumento significativo a partir do dia seguinte da lesão [38].

O tratamento por meio da LLt apresenta efeito antioxidante, esse efeito pode ser resultado da melhora na cadeia respiratória da mitocôndria, que aumenta a quantidade de ATP disponível para a célula, melhorando assim o metabolismo celular [39]. Além disso, o LLt apresenta capacidade de modular o processo inflamatório, reduzindo a expressão de TNF- α e TGF- β , que atuam na fase de degradação do tecido muscular lesado. [7, 8, 38, 39]. Desta forma, o LLLt previne o estresse oxidativo agindo na melhora do metabolismo, tanto por meio da mitocôndria, quanto pela modulação do processo inflamatório.

Com relação ao PRP, este age por meio do IGF-1 modulando o processo inflamatório e prolongando o potencial de regeneração das células musculares, acelerando, conseqüentemente, o processo de regeneração [5]. Desta forma, a redução do estresse oxidativo provavelmente ocorreu devido ao menor tempo de exposição às ROS, pela sua capacidade de acelerar a regeneração tecidual [14, 40].

A análise do colágeno realizada pelas bandas referentes ao colágeno tipo I, 1171 cm^{-1} , e ao colágeno não específico, 1665 cm^{-1} , [41] demonstraram que a lesão reduziu a quantidade de colágeno no tecido muscular no grupo CL, e também no grupo LLLt, quando comparados ao grupo C. O colágeno é um importante componente do tecido muscular esquelético, sendo responsável por sua estruturação, além de promover a transmissão da força contrátil gerada pela fibra muscular por toda a musculatura, aumentando sua eficiência [4].

Há uma grande preocupação no reparo de lesões musculares com relação à fibrose cicatricial, pois o acúmulo de tecido conjuntivo prejudica a função muscular, provoca quadro algico, além de tornar o músculo mais susceptível a lesões recidivantes. Várias as pesquisas demonstram aumento do colágeno por volta de sete dias após a lesão [4, 8, 10], fato contrário ao ocorrido na presente pesquisa. O acúmulo de colágeno após a lesão muscular é geralmente prognóstico de fibrose após a recuperação total, entretanto a lesão por estiramento apresenta como característica propagação do dano à estrutura do tecido muscular, podendo apresentar rompimento do epimísio e hemorragia entre a fáscia e o músculo, diferindo da lesão por contusão, por exemplo, em que a lesão ocorre diretamente na miofibrila. [3]

O LLt tem sido utilizado para a prevenção de fibrose após a lesão, pois além de modular o processo inflamatório, reduz a expressão de TGF- β [42], o que provavelmente promoveu a redução do colágeno no grupo LLt. Com relação ao PRP, este apresenta o TGF- β em sua composição, o que poderia promover aumento do colágeno no tecido muscular [14], entretanto não houve diferença significativa na quantidade de colágeno do grupo LP com os demais grupos, o que pode sugerir um efeito positivo, visto que a lesão por estiramento promove rompimento das estruturas colágeno do tecido muscular.

A presente pesquisa apresentou métodos que auxiliam a regeneração muscular, promovendo melhor aspecto morfológico, redução do estresse oxidativo, e modulação do

colágeno. Esses tratamentos apresentaram-se promissores para melhor e mais rápidas recuperação do músculo lesado.

Nas limitações da presente pesquisa podemos citar que o protocolo de lesão utilizado, apesar de mimetizar o mecanismo mais comum de lesão muscular, permite pequenas variações devido a diferenças anatômicas entre os animais, como maior quantidade de tecido adiposo, tamanho do membro posterior. Além disso, a análise do colágeno foi realizada apenas com uma banda de colágeno tipo I, e outra banda de colágeno não específico, e o tempo de recuperação de sete dias não permitiu análise da fibrose cicatricial, pois esta começa a se instalar a partir de 14 dias da lesão.

Sugerimos a aplicação desses métodos em estudos clínicos, a fim de validar esses métodos em seres humanos. Ademais, estudos que quantifiquem a expressão gênica, e proteínas específicas da regeneração muscular, tanto das miofibrilas, quanto do colágeno e vasos sanguíneos, bem como uma avaliação com tempo maior de recuperação, também seriam de grande valia para comprovar a eficácia dos métodos aqui propostos.

Conclusão

Conclui-se que os métodos de tratamento foram efetivos em reparar o dano estrutural do tecido muscular. Além disso, tanto o LLLt quanto o PRP e a associação de ambos foram capazes de reduzir o estresse oxidativo gerado pela lesão, e modular a produção de colágeno nesse tecido, e que a associação de ambos demonstrou-se superior à aplicação dos tratamentos isolados.

Agradecimentos

Agradecemos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado concedida para realização dessa pesquisa.

Referências Bibliográficas

1. Vieira DFF, Guarniero R, Vaz CES, Santana PJ de (2011) Efeito da utilização de um centrifugado de medula óssea no tratamento de lesão muscular: estudo experimental em coelhos. *Rev Bras Ortop* 46:718–725. doi: 10.1590/S0102-36162011000600015
2. Hamilton BH, Best TM (2011) Platelet-enriched plasma and muscle strain injuries: challenges imposed by the burden of proof. *Clin J Sport Med* 21:31–6. doi: 10.1097/JSM.0b013e318205a658
3. Souza J, Gottfried C (2013) Muscle injury: review of experimental models. *J Electromyogr Kinesiol*. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jelekin.2013.07.009>
4. Alves AN, Fernandes KPS, Melo CA V, et al. (2014) Modulating effect of low level-laser therapy on fibrosis in the repair process of the tibial anterior muscle in rats. *Lasers Med Sci* 29:813–821. doi: 10.1007/s10103-013-1428-9

5. Dimauro I, Grasso L, Fittipaldi S, et al. (2014) Platelet-rich plasma and skeletal muscle healing: A molecular analysis of the early phases of the regeneration process in an experimental animal model. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0102993
6. Hammond JW, Hinton RY, Curl LA, et al. (2009) Use of autologous platelet-rich plasma to treat muscle strain injuries. *Am J Sports Med* 37:1135–42. doi: 10.1177/0363546508330974
7. Assis L, Moretti AI, Abrahao TB, et al. (2012) Low-level laser therapy (808 nm) reduces inflammatory response and oxidative stress in rat tibialis anterior muscle after cryolesion. *Lasers Surg Med* 44:726–735. doi: 10.1002/lsm.22077
8. Luo L, Sun Z, Zhang L, et al. (2013) Effects of low-level laser therapy on ROS homeostasis and expression of IGF-1 and TGF- β 1 in skeletal muscle during the repair process. *Lasers Med Sci* 28:725–34. doi: 10.1007/s10103-012-1133-0
9. Ramos L, Leal Junior ECP, Pallotta RC, et al. (2012) Infrared (810 nm) low-level laser therapy in experimental model of strain-induced skeletal muscle injury in rats: effects on functional outcomes. *Photochem Photobiol* 88:154–60. doi: 10.1111/j.1751-1097.2011.01030.x
10. Assis L, Moretti AIS, Abrahão TB, et al. (2013) Low-level laser therapy (808 nm) contributes to muscle regeneration and prevents fibrosis in rat tibialis anterior muscle after cryolesion. *Lasers Med Sci* 28:947–55. doi: 10.1007/s10103-012-1183-3
11. Boswell SG, Cole BJ, Sundman EA, et al. (2012) Platelet-rich plasma: a milieu of bioactive factors. *Arthroscopy* 28:429–39. doi: 10.1016/j.arthro.2011.10.018
12. Sánchez-González DJ, Méndez-Bolaina E, Trejo-Bahena NI (2012) Platelet-rich plasma peptides: key for regeneration. *Int J Pept* 2012:532519. doi: 10.1155/2012/532519
13. Anitua E, Alkhraisat MH, Orive G (2012) Perspectives and challenges in regenerative medicine using plasma rich in growth factors. *J Control Release* 157:29–38. doi: 10.1016/j.jconrel.2011.07.004
14. A Hamid MS, Mohamed Ali MR, Yusof A, et al. (2014) Platelet-rich plasma injections for the treatment of hamstring injuries: a randomized controlled trial. *Am J Sports Med* 42:2410–8. doi: 10.1177/0363546514541540
15. Gautam R, Vanga S, Madan A, et al. (2015) Raman Spectroscopic Studies on Screening of Myopathies. *Anal Chem* 87:2187–2194. doi: 10.1021/ac503647x
16. Ozaki GAT, Koike TE, Castoldi RC, et al. (2014) Efeitos da remobilização por meio de exercício físico sobre a densidade óssea de ratos adultos e idosos. *Motricidade* 10:71–78. doi: 10.6063/motricidade.10(3).2725

17. Messora MR, Nagata MJH, Furlaneto FAC, et al. (2011) A standardized research protocol for platelet-rich plasma (PRP) preparation in rats. *RSBO Rev Sul- ...* 8:299–304.
18. Li W, Enomoto M, Ukegawa M, et al. (2012) Subcutaneous injections of platelet-rich plasma into skin flaps modulate proangiogenic gene expression and improve survival rates. *Plast Reconstr Surg* 129:858–66. doi: 10.1097/PRS.0b013e3182450ac9
19. Pachioni CAS, Mazzer N, Barbieri CH, et al. (2009) Stretch Injuries of Skeletal Muscles: Experimental Study in Rats' Soleus Muscle. *Int J Morphol*. doi: 10.4067/S0717-95022009000400029
20. Iyomasa DM, Garavelo I, Iyomasa MM, et al. (2009) Ultrastructural analysis of the low level laser therapy effects on the lesioned anterior tibial muscle in the gerbil. *Micron* 40:413–8. doi: 10.1016/j.micron.2009.02.002
21. Camargo Filho JCS, Garcia BC, Kodama FY, et al. (2011) Effects of Aerobic Exercise on the Skeletal Muscle of Rats Exposed to Cigarette Smoke. *Rev Bras Med do Esporte* 17:416–419. doi: 10.1590/S1517-86922011000600010
22. Castoldi RC, Camargo RCT, Magalhães AJB, et al. (2013) Concurrent training effect on muscle fibers in Wistar rats. *Mot Rev Educ Física* 19:717–723. doi: 10.1590/S1980-65742013000400008
23. Camargo Filho JCS, Garcia BC, Kodama FY, et al. (2011) Efeitos do exercício aeróbico no músculo esquelético de ratos expostos à fumaça de cigarro. *Rev Bras Med do Esporte* 17:416–419. doi: 10.1590/S1517-86922011000600010
24. Oliveira ON, Pavinatto FJ, Constantino CJL, et al. (2012) Information visualization to enhance sensitivity and selectivity in biosensing. *Biointerphases* 7:1–15. doi: 10.1007/s13758-012-0053-7
25. Sammon JW (1969) A Nonlinear Mapping for Data Structure Analysis. *IEEE Trans Comput C-18*:401–409. doi: 10.1109/t-c.1969.222678
26. Tejada E, Minghim R, Gustavo Nonato L (2003) On improved projection techniques to support visual exploration of multi-dimensional data sets. *Inf Vis* 2:218–231. doi: 10.1057/palgrave.ivs.9500054
27. De Almeida P, Tomazoni SS, Frigo L, et al. (2014) What is the best treatment to decrease pro-inflammatory cytokine release in acute skeletal muscle injury induced by trauma in rats: low-level laser therapy, diclofenac, or cryotherapy? *Lasers Med Sci* 29:653–8. doi: 10.1007/s10103-013-1377-3
28. Marx RE (2004) Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg* 62:489–96. doi: 10.1016/j.joms.2003.12.003

29. Delong JM, Russell RP, Mazzocca AD (2012) Platelet-rich plasma: The PAW classification system. *Arthrosc - J Arthrosc Relat Surg* 28:998–1009. doi: 10.1016/j.arthro.2012.04.148
30. Sriramoju V, Alimova A, Chakraverty R, et al. (2008) Raman spectroscopic study of acute oxidative stress induced changes in mice skeletal muscles. *Biomed Opt Spectrosc* 6853:685315–685315–4. doi: 10.1117/12.761277
31. Pfeffer CP, Olsen BR, Ganikhanov F, Légaré F (2011) Imaging skeletal muscle using second harmonic generation and coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *Biomed Opt Express* 2:1366–76. doi: 10.1364/BOE.2.001366
32. Hikita M, Shinzawa-Itoh K, Moriyama M, et al. (2013) Resonance Raman spectral properties of FMN of bovine heart NADH:ubiquinone oxidoreductase suggesting a mechanism for the prevention of spontaneous production of reactive oxygen species. *Biochemistry* 52:98–104. doi: 10.1021/bi3011972
33. Das RS, Agrawal YK (2011) Raman spectroscopy: Recent advancements, techniques and applications. *Vib Spectrosc* 57:163–176. doi: 10.1016/j.vibspec.2011.08.003
34. Xie W, Su L, Shen A, et al. (2011) Application of surface-enhanced Raman scattering in cell analysis. *J Raman Spectrosc* 42:1248–1254. doi: 10.1002/jrs.2857
35. Yue KT, Martin CL, Chen D, et al. (1986) Raman spectroscopy of oxidized and reduced nicotinamide adenine dinucleotides. *Biochemistry* 25:4941–4947. doi: 10.1021/bi00365a033
36. Carvalho N, Puntel G, Correa P, et al. (2010) Protective effects of therapeutic cold and heat against the oxidative damage induced by a muscle strain injury in rats. *J Sports Sci* 28:923–935. doi: 10.1080/02640414.2010.481722
37. Souza J de, Gottfried C (2013) Muscle injury: review of experimental models. *J Electromyogr Kinesiol* 23:1253–60. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jelekin.2013.07.009>
38. Puntel GO, Carvalho NR, Amaral GP, et al. (2011) Therapeutic cold: An effective kind to modulate the oxidative damage resulting of a skeletal muscle contusion. *Free Radic Res* 45:125–138. doi: 10.3109/10715762.2010.517252
39. Silveira PCL, da Silva LA, Pinho CA, et al. (2013) Effects of low-level laser therapy (GaAs) in an animal model of muscular damage induced by trauma. *Lasers Med Sci* 28:431–6. doi: 10.1007/s10103-012-1075-6
40. Hamid MS a, Yusof A, Mohamed Ali MR (2014) Platelet-rich plasma (PRP) for acute muscle injury: A systematic review. *PLoS One* 9:1–7. doi: 10.1371/journal.pone.0090538

41. Movasaghi Z, Rehman S, Rehman IU (2007) Raman Spectroscopy of Biological Tissues. *Appl Spectrosc Rev* 42:493–541. doi: 10.1080/05704920701551530
42. Gharaibeh B, Chun-Lansinger Y, Hagen T, et al. (2012) Biological approaches to improve skeletal muscle healing after injury and disease. *Birth Defects Res C Embryo Today* 96:82–94. doi: 10.1002/bdrc.21005

Considerações finais

O modelo de avaliação por meio da dimensão fractal foi eficaz em identificar alterações nas lâminas histológicas do tecido muscular lesado, tanto com a coloração de HE, quanto para o picrosirius. Essa técnica pode auxiliar a avaliação dos achados histológicos em tecido muscular histológico, tanto para a pesquisa científica quanto para a prática clínica, permitindo uma mensuração padronizada dos achados, e uma avaliação quantitativa das alterações teciduais.

Os tratamentos tanto do LLLT quanto do PRP foram eficazes em promover melhor reparo tecidual, além de atenuar o estresse oxidativo e modularem a produção de colágeno. Além disso, a associação de ambos demonstrou-se promissor no tratamento da lesão, pois apresentou melhor aspecto histológico, com mais fibras em regeneração e vasos sanguíneos.

Referências Bibliográficas

ALVES, A. N.; FERNANDES, K. P. S.; MELO, C. A. V.; et al. Modulating effect of low level-laser therapy on fibrosis in the repair process of the tibialis anterior muscle in rats. **Lasers in Medical Science**, v. 29, n. 2, p. 813–821, 2014. Springer London. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10103-013-1428-9>>. Acesso em: 31/1/2014.

ANITUA, E.; ALKHRAISAT, M. H.; ORIVE, G. Perspectives and challenges in regenerative medicine using plasma rich in growth factors. **Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society**, v. 157, n. 1, p. 29–38, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21763737>>. Acesso em: 12/10/2013.

CAMARGO FILHO, J. C. S.; GARCIA, B. C.; KODAMA, F. Y.; et al. Efeitos do exercício aeróbio no músculo esquelético de ratos expostos à fumaça de cigarro. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 17, n. 6, p. 416–419, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-86922011000600010&lng=pt&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 22/10/2013.

DAWOOD, M. S.; AL-SALIHI, A. R.; QASIM, A. W. Laser therapy of muscle injuries. **Lasers in medical science**, v. 28, n. 3, p. 735–42, 2013. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s10103-012-1131-2>>. Acesso em: 13/1/2014.

FELISMINO, A. S.; COSTA, E. C.; AOKI, M. S.; et al. Effect of low-level laser therapy (808 nm) on markers of muscle damage: a randomized double-blind placebo-controlled trial. **Lasers in medical science**, v. 29, n. 3, p. 933–8, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24005882>>. Acesso em: 16/10/2014.

LUO, L.; SUN, Z.; ZHANG, L.; et al. Effects of low-level laser therapy on ROS homeostasis and expression of IGF-1 and TGF- β 1 in skeletal muscle during the repair process. **Lasers in medical science**, v. 28, n. 3, p. 725–34, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22714676>>. Acesso em: 15/10/2013.

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, D. J.; MÉNDEZ-BOLAINA, E.; TREJO-BAHENA, N. I. Platelet-rich plasma peptides: key for regeneration. **International journal of peptides**, v. 2012, p. 532519, 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3303558&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 30/10/2013.

SOUZA, J. DE; GOTTFRIED, C. Muscle injury: review of experimental models. **Journal of Electromyography and Kinesiology**, v. 23, n. 6, p. 1253–60, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050641113001788>>. Acesso em: 14/10/2013.

SOUZA, J.; GOTTFRIED, C. Muscle injury: review of experimental models. **Journal of Electromyography and Kinesiology**, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050641113001788>>. Acesso em: 14/10/2013.

Normas para publicação da Revista *International Journal of Morphology*:



ISSN 0717-9502 versão online
ISSN 0717-9367 versão impresa

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Escopo e política

DO CONTEÚDO

International Journal of Morphology (Revista Internacional de Morfología), Impressa ISSN 0717-9367, Eletrônica ISSN 0717-9502, é o Órgão Oficial das Sociedades Chilena, Argentina e Panamericana de Anatomia. É a continuação da *Revista Chilena de Anatomia* (Chilean Anatomical Journal) com publicação de periodicidade trimestral. Tem por finalidade publicar artigos originais relacionados com todas as áreas da Morfologia, Anatomia, Histologia, Embriologia e Biologia do Desenvolvimento, bem como com outros campos das Ciências Morfológicas, incluindo Biologia Celular e Molecular. Também aceita Temas de Revisão e Atualização, Comunicações Breves e Cartas ao Editor.

Submissão eletrônica dos artigos: os manuscritos devem ser enviados por email (Texto e Tabelas em formato Word e Figuras em formato jpg a 300 dpi).

São aceitos artigos inéditos, escritos em espanhol ou inglês.

Na Carta ao Editor, assinada por todos os autores, deverá constar expressamente que o manuscrito foi lido e aprovado por todos os autores, que se cumpriu com os requisitos de autoria e que não foi publicado ou enviado simultaneamente à outra revista.

**Correspondência: Dr. Mariano del Sol, Editor International Journal of Morphology, Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera, Casilla 54-D, Temuco, Chile.
Fax: (56-45) 232-5600 Email: ijmorpho@ufrontera.cl; mariano.delsol@ufrontera.cl**

Os trabalhos serão submetidos à apreciação do Conselho Editorial e do Conselho Científico. A revisão será realizada por dois assessores, membros do Conselho Editorial e/ou Conselho Científico, e assessores «ad hoc» especialistas na área do trabalho. Os especialistas no tema definirão se o trabalho será: a) publicado; b) publicado com modificações ou c) recusado. Cópia dos pareceres serão enviadas ao autor principal.

Forma preparação do manuscrito

DO FORMA

Os trabalhos não devem exceder 12 páginas (incluindo texto e Referências Bibliográficas). Cada trabalho deverá apresentar:

- **Folha de rosto:** título, subtítulo se necessário, com versão em inglês (se for escrito em inglês, com tradução para o castelhano); nome(s) do(s) autor(es), com respectiva afiliação institucional; se foi subvencionado, indicar o patrocínio e o número do processo no rodapé da página.
- **Resumo** (estruturado) em espanhol, não excedendo 300 palavras. Palavras chave.
- **Texto:** Introdução, Material e Método, Resultados e Discussão.
- **Tabelas e ilustrações:** Tabelas deverão ser enumeradas com algarismos romanos e ilustrações com algarismos arábicos, em folhas separadas do texto. As tabelas necessitam de títulos e as ilustrações de legendas, em folhas separadas. Para a reprodução das ilustrações, serão aceitos desenhos somente de boa qualidade. Caso seja necessário, podem ser usadas letras, números ou símbolos transferíveis.
- **Resumo em inglês** - palavras chave em inglês.
- **Agradecimentos.**
- **Referências Bibliográficas.** Máximo de 25 Referências. Devem ser colocadas em ordem alfabética, pelo sobrenome dos autores, obedecendo as Normas Técnicas da Revista. Todos os autores devem constar nas Referências Bibliográficas. No texto, caso haja mais de dois autores coloca-se «*et al.*» depois do nome do primeiro, acompanhado do ano de publicação entre parênteses, somente na primeira citação. Os nomes dos autores deverão estar em letras minúsculas tanto no Texto como nas Referências Bibliográficas. O ano deverá ser repetido em cada citação quando o autor tiver mais de um trabalho mencionado.

Exemplos:

Castrogiovanni, P.; Mazzone, V. & Imbesi, R. Immunolocalization of HB-EGF in human skin by streptavidin-peroxidase (HRP) conjugate method. *Int. J. Morphol.*, 29(4):1162-7, 2011.

Moore K.L.; Dalley A. F. & Agur, A. M. R. *Clinically Oriented Anatomy*. 6th ed. Philadelphia, Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins, 2010.

NOMENCLATURA. A nomenclatura usada conforme a última edição da *Terminologia Anatômica, Terminologia Histológica, Terminologia Embriológica, Nômina Anatômica Veterinária* ou *Nômina Anatômica Avium*. Os termos em latim podem ser traduzidos para o idioma vernáculo (espanhol ou inglês).

CUSTOS DE PUBLICAÇÃO. O custo de publicação é de US \$ 250 dólares (artigos em branco e preto) e de US \$ 300 por cada página em cores. Os artigos, incluindo a tradução do resumo para o espanhol, poderão ser revisados com um custo de US \$ 50.

Carta de aceite do artigo I

IJM 702-14

De: **MARIANO GUILLERMO ARMANDO DEL SOL CALDERON**(mariano.delsol@ufrontera.cl)

Enviada: segunda-feira, 1 de junho de 2015 12:49:09

Para: Guilherme Ozaki (guiozaki@hotmail.com)

Dear Dr. Ozaki

I am very pleased to inform you that the paper: "Fractal analysis of skeletal muscle tissue of rats subjected to stretch injury", has been accepted by the Scientific Board for publication in *International Journal of Morphology*.

Your article will be published in volume 33, issue 3, 2015.

Very truly yours

Dr. Mariano del Sol

Editor

Int. J. Morphol.

Normas para publicação da revista Lasers in Medical Science:

Editor-in-Chief: Keyvan Nouri
ISSN: 0268-8921 (print version)
ISSN: 1435-604X (electronic version)
Journal no. 10103

Instructions for Authors

TYPES OF PAPERS

- Original Article – limited to 4000 words, 45 references, no more than 5 figures
- Review Article – limited to 5000 words, 50 references, no more than 5 figures
- Brief Report - limited to 2000 words, 25 references, no more than 4 figures - Case Reports will not be accepted!
- Letter to the Editor – up to 600 words

MANUSCRIPT SUBMISSION

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

TITLE PAGE

Title Page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

TEXT

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

[LaTeX macro package \(zip, 182 kB\)](#)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

SCIENTIFIC STYLE

Generic names of drugs and pesticides are preferred; if trade names are used, the generic name should be given at first mention.

Units and abbreviations

- Please adhere to internationally agreed standards such as those adopted by the commission of the International Union of Pure and Applied Physics (IUPAP) or defined by the International Organization of

Standardization (ISO). Metric SI units should be used throughout except where non-SI units are more common [e.g. litre (l) for volume].

- Abbreviations (not standardized) should be defined at first mention in the abstract and again in the main body of the text and used consistently thereafter.

Drugs

- When drugs are mentioned, the international (generic) name should be used. The proprietary name, chemical composition, and manufacturer should be stated in full in Materials and methods.

REFERENCES

Citation

Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets. Some examples:

1. Negotiation research spans many disciplines [3].
2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].
3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

The entries in the list should be numbered consecutively.

- **Journal article**
Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8
Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:
Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325–329
- **Article by DOI**
Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086
- **Book**
South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London
- **Book chapter**
Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257
- **Online document**
Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007
- **Dissertation**
Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal’s name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

- [ISSN.org LTWA](#)

If you are unsure, please use the full journal title.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

- [EndNote style \(zip, 2 kB\)](#)

Authors preparing their manuscript in LaTeX can use the bibtex file spbasic.bst which is included in Springer's LaTeX macro package.

TABLES

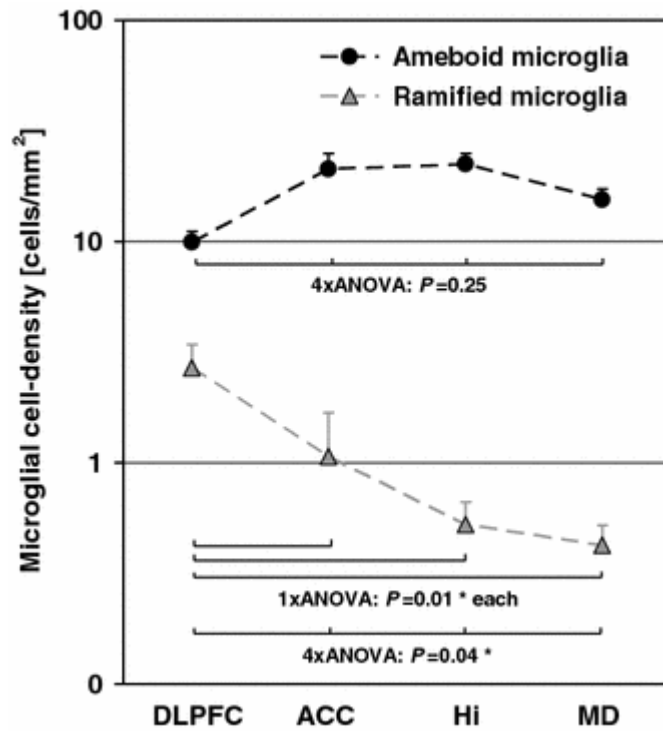
- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

ARTWORK AND ILLUSTRATIONS GUIDELINES

Electronic Figure Submission

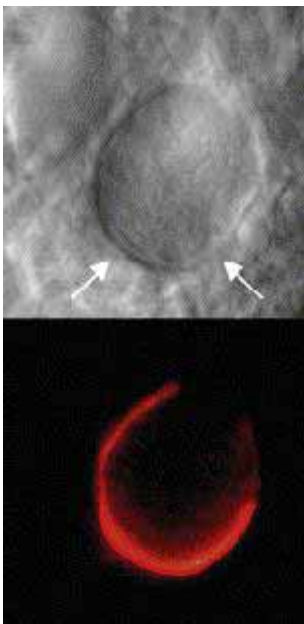
- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art



- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

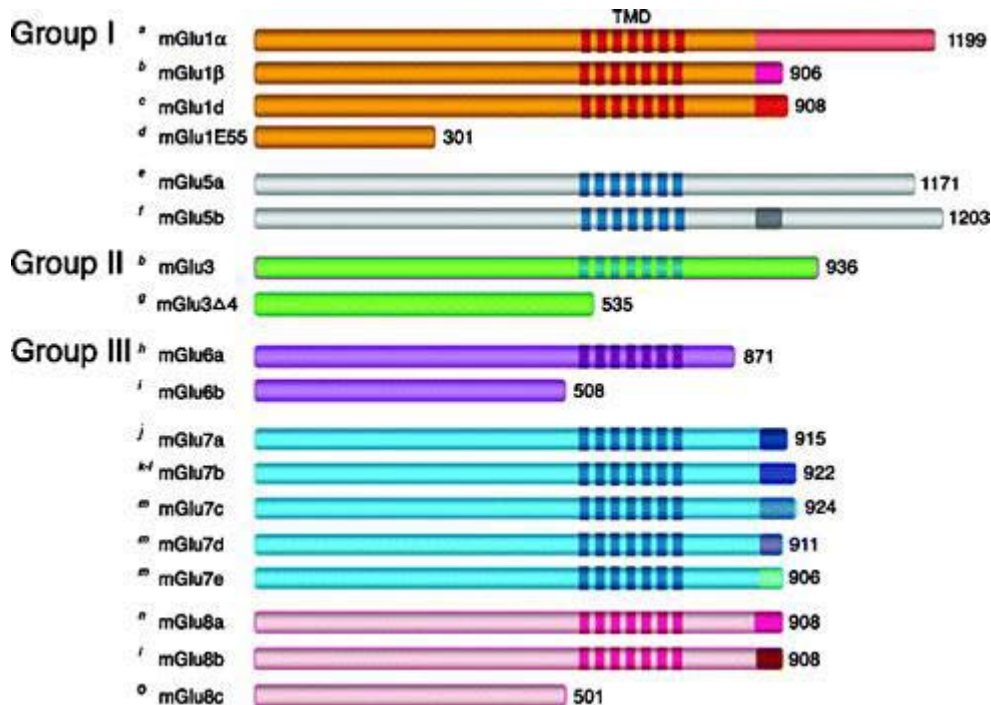
Halftone Art



- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.

- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art



- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

- Color art is free of charge for online publication.
- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.
- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).

- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term **Fig.** in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

- Figures should be submitted separately from the text, if possible.
- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.
- For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Submission

- Supply all supplementary material in standard file formats.
- Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.

- To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

- Resolution: 16:9 or 4:3
- Maximum file size: 25 GB
- Minimum video duration: 1 sec
- Supported file formats: avi, wmv, mp4, mov, m2p, mp2, mpg, mpeg, flv, mxf, mts, m4v, 3gp

Text and Presentations

- Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.
- A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

- Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.
- If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

Specialized Formats

- Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

- It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

- If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.
- Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)", "... additional data are given in Online Resource 4”.
- Name the files consecutively, e.g. “ESM_3.mpg”, “ESM_4.pdf”.

Captions

- For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

- Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

- The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material
- Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

INTEGRITY OF RESEARCH AND REPORTING

Ethical standards

Manuscripts submitted for publication must contain a statement to the effect that all human and animal studies have been approved by the appropriate ethics committee and have therefore been performed in accordance with the ethical standards laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments.

It should also be stated clearly in the text that all persons gave their informed consent prior to their inclusion in the study. Details that might disclose the identity of the subjects under study should be omitted.

These statements should be added in a separate section before the reference list. If these statements are not applicable, authors should state: The manuscript does not contain clinical studies or patient data.

The editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned requirements. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned requirements

Conflict of interest

All benefits in any form from a commercial party related directly or indirectly to the subject of this manuscript or any of the authors must be acknowledged. For each source of funds, both the research funder and the grant number should be given. This note should be added in a separate section before the reference list.

If no conflict exists, authors should state: The authors declare that they have no conflict of interest.

ETHICAL RESPONSIBILITIES OF AUTHORS

This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) the journal will follow the COPE guidelines on how to deal with potential acts of misconduct.

Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the journal, the professionalism of scientific authorship, and ultimately the entire scientific endeavour. Maintaining integrity of the research and its presentation can be achieved by following the rules of good scientific practice, which include:

- The manuscript has not been submitted to more than one journal for simultaneous consideration.
 - The manuscript has not been published previously (partly or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work (please provide transparency on the re-use of material to avoid the hint of text-recycling (“self-plagiarism”).
 - A single study is not split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (e.g. “salami-publishing”).
 - No data have been fabricated or manipulated (including images) to support your conclusions
 - No data, text, or theories by others are presented as if they were the author’s own (“plagiarism”). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation marks are used for verbatim copying of material, and permissions are secured for material that is copyrighted.
- Important note:** the journal may use software to screen for plagiarism.
- Consent to submit has been received explicitly from all co-authors, as well as from the responsible authorities - tacitly or explicitly - at the institute/organization where the work has been carried out, **before** the work is submitted.
 - Authors whose names appear on the submission have contributed sufficiently to the scientific work and therefore share collective responsibility and accountability for the results.

In addition:

- Changes of authorship or in the order of authors are not accepted **after** acceptance of a manuscript.
- Requesting to add or delete authors at revision stage, proof stage, or after publication is a serious matter and may be considered when justifiably warranted. Justification for changes in authorship must be compelling

and may be considered only after receipt of written approval from all authors and a convincing, detailed explanation about the role/deletion of the new/deleted author. In case of changes at revision stage, a letter must accompany the revised manuscript. In case of changes after acceptance or publication, the request and documentation must be sent via the Publisher to the Editor-in-Chief. In all cases, further documentation may be required to support your request. The decision on accepting the change rests with the Editor-in-Chief of the journal and may be turned down. Therefore authors are strongly advised to ensure the correct author group, corresponding author, and order of authors at submission.

- Upon request authors should be prepared to send relevant documentation or data in order to verify the validity of the results. This could be in the form of raw data, samples, records, etc.

If there is a suspicion of misconduct, the journal will carry out an investigation following the COPE guidelines. If, after investigation, the allegation seems to raise valid concerns, the accused author will be contacted and given an opportunity to address the issue. If misconduct has been established beyond reasonable doubt, this may result in the Editor-in-Chief's implementation of the following measures, including, but not limited to:

- If the article is still under consideration, it may be rejected and returned to the author.
- If the article has already been published online, depending on the nature and severity of the infraction, either an erratum will be placed with the article or in severe cases complete retraction of the article will occur. The reason must be given in the published erratum or retraction note.
- The author's institution may be informed.

COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

To ensure objectivity and transparency in research and to ensure that accepted principles of ethical and professional conduct have been followed, authors should include information regarding sources of funding, potential conflicts of interest (financial or non-financial), informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals.

Authors should include the following statements (if applicable) in a separate section entitled "Compliance with Ethical Standards" on the title page when submitting a paper:

- Disclosure of potential conflicts of interest
- Research involving Human Participants and/or Animals
- Informed consent

Please note that standards could vary slightly per journal dependent on their peer review policies (i.e. double blind peer review) as well as per journal subject discipline. Before submitting your article check the Instructions for Authors carefully.

The corresponding author should be prepared to collect documentation of compliance with ethical standards and send if requested during peer review or after publication.

The Editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned guidelines. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned guidelines.

DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

Authors must disclose all relationships or interests that could have direct or potential influence or impart bias on the work. Although an author may not feel there is any conflict, disclosure of relationships and interests provides a more complete and transparent process, leading to an accurate and objective assessment of the work. Awareness of a real or perceived conflicts of interest is a perspective to which the readers are entitled. This is not meant to imply that a financial relationship with an organization that sponsored the research or compensation received for consultancy work is inappropriate. Examples of potential conflicts of interests **that are directly or indirectly related to the research** may include but are not limited to the following:

- Research grants from funding agencies (please give the research funder and the grant number)
- Honoraria for speaking at symposia
- Financial support for attending symposia
- Financial support for educational programs
- Employment or consultation
- Support from a project sponsor
- Position on advisory board or board of directors or other type of management relationships
- Multiple affiliations
- Financial relationships, for example equity ownership or investment interest
- Intellectual property rights (e.g. patents, copyrights and royalties from such rights)
- Holdings of spouse and/or children that may have financial interest in the work

In addition, interests that go beyond financial interests and compensation (non-financial interests) that may be important to readers should be disclosed. These may include but are not limited to personal relationships or competing interests directly or indirectly tied to this research, or professional interests or personal beliefs that may influence your research.

The corresponding author collects the conflict of interest disclosure forms from all authors. In author collaborations where formal agreements for representation allow it, it is sufficient for the corresponding author to sign the disclosure form on behalf of all authors. Examples of forms can be found

- here:
The corresponding author will include a summary statement in the text of the manuscript in a separate section before the reference list, that reflects what is recorded in the potential conflict of interest disclosure form(s).

See below examples of disclosures:

Funding: This study was funded by X (grant number X).

Conflict of Interest: Author A has received research grants from Company A. Author B has received a speaker honorarium from Company X and owns stock in Company Y. Author C is a member of committee Z.

If no conflict exists, the authors should state:

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

RESEARCH INVOLVING HUMAN PARTICIPANTS AND/OR ANIMALS

1) Statement of human rights

When reporting studies that involve human participants, authors should include a statement that the studies have been approved by the appropriate institutional and/or national research ethics committee and have been performed in accordance with the ethical standards as laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments or comparable ethical standards.

If doubt exists whether the research was conducted in accordance with the 1964 Helsinki Declaration or comparable standards, the authors must explain the reasons for their approach, and demonstrate that the independent ethics committee or institutional review board explicitly approved the doubtful aspects of the study.

The following statements should be included in the text before the References section:

Ethical approval: “All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.”

For retrospective studies, please add the following sentence:

“For this type of study formal consent is not required.”

2) Statement on the welfare of animals

The welfare of animals used for research must be respected. When reporting experiments on animals, authors should indicate whether the international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals have been followed, and that the studies have been approved by a research ethics committee at the institution or practice at which the studies were conducted (where such a committee exists).

For studies with animals, the following statement should be included in the text before the References section:

Ethical approval: “All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed.”

If applicable (where such a committee exists): “All procedures performed in studies involving animals were in accordance with the ethical standards of the institution or practice at which the studies were conducted.”

If articles do not contain studies with human participants or animals by any of the authors, please select one of the following statements:

“This article does not contain any studies with human participants performed by any of the authors.”

“This article does not contain any studies with animals performed by any of the authors.”

“This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.”

INFORMED CONSENT

All individuals have individual rights that are not to be infringed. Individual participants in studies have, for example, the right to decide what happens to the (identifiable) personal data gathered, to what they have said during a study or an interview, as well as to any photograph that was taken. Hence it is important that all participants gave their informed consent in writing prior to inclusion in the study. Identifying details (names, dates of birth, identity numbers and other information) of the participants that were studied should not be published in written descriptions, photographs, and genetic profiles unless the information is essential for scientific purposes and the participant (or parent or guardian if the participant is incapable) gave written informed consent for publication. Complete anonymity is difficult to achieve in some cases, and informed consent should be obtained if there is any doubt. For example, masking the eye region in photographs of participants is inadequate protection of anonymity. If identifying characteristics are altered to protect anonymity, such as in genetic profiles, authors should provide assurance that alterations do not distort scientific meaning.

The following statement should be included:

Informed consent: “Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.”

If identifying information about participants is available in the article, the following statement should be included:

“Additional informed consent was obtained from all individual participants for whom identifying information is included in this article.”

AFTER ACCEPTANCE

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer's web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice and offprints.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer now provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink.

- [Springer Open Choice](#)

Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License..

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Publication of color illustrations is free of charge.

Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.