



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



PG-BGA

INFLUÊNCIA DA LASERTERAPIA DE BAIXA INTENSIDADE NO PROCESSO REGENERATIVO DO MÚSCULO TIBIAL ANTERIOR EM RATOS

CARLOS EDUARDO ASSUMPÇÃO DE FREITAS

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do
título de Doutor no Programa de Pós-Graduação
em Biologia Geral e Aplicada, Área de
concentração em Biologia Celular e Estrutural.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maeli Dal Pai

BOTUCATU – SP

2015

Programa de Pós-graduação em Biologia Geral e Aplicada
Distrito de Rubião Júnior s/n CEP 18618-000 Cx Postal 510 Botucatu-SP Brasil
Tel (14) 3811-6148 Fax (14) 3811-6148 posgraduacao@ibb.unesp.br



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



PG-BGA

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

INFLUÊNCIA DA LASERTERAPIA DE BAIXA INTENSIDADE NO
PROCESSO REGENERATIVO DO MÚSCULO TIBIAL ANTERIOR EM
RATOS

CARLOS EDUARDO ASSUMPÇÃO DE FREITAS

MAELI DAL PAI SILVA

FRANCIS LOPES PACAGNELLI

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do
título de Doutor no Programa de Pós-Graduação
em Biologia Geral e Aplicada, Área de
concentração em Biologia Celular e Estrutural.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maeli Dal Pai

BOTUCATU – SP

2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Freitas, Carlos Eduardo Assunção de.

Influência da laserterapia de baixa intensidade no
processo regenerativo do músculo tibial anterior em ratos
/ Carlos Eduardo Assunção de Freitas. - Botucatu, 2015

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de
Botucatu

Orientador: Maeli Dal Pai

Coorientador: Francis Lopes Pacagnelli

Capes: 20603002

1. Terapia a laser de baixa intensidade. 2. Sistema
musculoesquelético. 3. Músculos - Regeneração. 4. Músculos
- Ferimentos e lesões.

Palavras-chave: Laserterapia; Lesão muscular; músculo
esquelético; regeneração muscular.

Dedicatória

Dedico este trabalho...

A minha esposa Selma, aos meus filhos Rafael e Estephânia, por estarem sempre ao meu lado me incentivando para vencer mais essa etapa da minha vida.

Aos meus pais, João (*in memorian*) e Maria de Lourdes, por não medirem esforços para a minha educação e formação profissional.

.

Agradecimentos

A minha orientadora, Prof.^a Dra. Maeli Dal Pai, pela confiança, paciência, dedicação e orientação sem a qual não seria possível a realização deste trabalho.

A minha co-orientadora Prof.^a Dr.^a Francis Lopes Pacagnelli, pela colaboração, dedicação e incentivo.

Ao Prof.^o Dr^o José Eduardo Creste, Pró Reitor Acadêmico da Universidade do Oeste Paulista, pelo incentivo e apoio.

À minha esposa Selma de Bastos Zambelli Freitas e meus filhos Rafael e Estephânia, pelo apoio e paciência nos momentos mais difíceis.

A Prof.^a Dr^a Gisele Alborghetti Nai pela colaboração no trabalho.

Aos meus amigos do Laboratório de Biologia do Músculo Esquelético: Raquel, Ivan, Edson, Rondi e Tassiana pela colaboração no trabalho, pois com certeza vocês foram fundamentais para a concretização do trabalho.

A todos do laboratório do Departamento de Morfologia pelo excelente convívio.

Aos professores do Departamento de Fisioterapia de Universidade do Oeste Paulista pelo incentivo e apoio.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1. Características Gerais do Músculo Estriado Esquelético	11
1.2. Células Satélites.....	12
1.3. Lesão muscular	16
1.4. Regeneração Muscular	17
1.5. Laserterapia	21
2. OBJETIVOS.....	25
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1. Modelo Animal.....	26
3.2. Grupos Experimentais	26
3.3. Modelo de Lesão	26
3.4. Desenho Experimental.....	27
3.5. Análise Histológica.....	28
3.6. Avaliação quantitativa da expressão gênica por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real após Transcrição Reversa (qPCR).....	29
3.6.1. Expressão de RNA.....	29
3.6.2. Tratamento do RNA.....	30
3.6.3. Reação em cadeia da polimerase em Tempo Real (qPCR).	30
3.7. Análise Estatística.....	31
4. CAPÍTULO 1 - High Final Energy Of Low - Level Gallium Arsenide Laser Therapy Enhances Skeletal Muscle Recovery Without A Positive Effect On Collagen Remodeling *.....	33
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS.....	69
6. ANEXO – Certificado de Comissão de Ética no Uso de Animais.....	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Corte transversal do músculo esquelético.....	11
Figura 2: Esquema demonstrando a localização das células satélites.,	12
Figura 3: Representação esquemática das células satélites no crescimento muscular....	15
Figura 4: Esquema da regeneração muscular.	19
Figura 5: Imagem ilustrativa da criolesão	27
Figura 6: Imagem representativa do tratamento com o Laser.	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Genes que serão utilizados para reação de qPCR.....	31
---	----

RESUMO

Pesquisas recentes na área de fisioterapia buscam elucidar as alterações envolvidas na regeneração do músculo esquelético após a aplicação de recursos terapêuticos. Neste contexto, a aplicação da Laserterapia de Baixa Intensidade tem se mostrado eficaz para melhorar o processo de regeneração muscular, entretanto, o tipo de laser, os parâmetros de radiação, período avaliado e os mecanismos moleculares envolvidos no processo de regeneração demonstram resultados discrepantes. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da Laserterapia de Baixa Intensidade, tipo (AsGa), comprimento de onda de 904 nm, 7 dias após a lesão e verificar se o tipo de laser e a dose escolhida tem influência no processo de regeneração muscular. Foram utilizados nesse estudo trinta ratos Wistar, machos, adultos (três meses de idade), peso corporal médio de 210-340g. Os animais foram randomizados em três grupos: Grupo Controle (C, n= 10), Grupo lesado não tratado (L, n=10) e o Grupo lesado e tratado (LT, n= 10). Após anestesia dos animais, a lesão muscular foi induzida por congelamento (criolesão) na região central do ventre do músculo tibial anterior (TA) de ambos os membros posteriores, por meio de uma haste de ferro previamente imersa em nitrogênio líquido. Como recurso terapêutico foi utilizado o laser de AsGa, comprimento de onda de 904 nanômetros. As aplicações do laser foram iniciadas 24 horas após a lesão, diariamente, com densidade de energia de 69 J/cm², (48 segundos), durante cinco dias, em dois pontos na área da lesão. Aos 7 dias, os animais foram pesados e mortos; o músculo TA de ambos membros posteriores foi retirado e processado para as análises morfológica e molecular. O músculo TA esquerdo foi congelado em nitrogênio líquido e cortes histológicos obtidos em criostato foram submetidos às colorações Hematoxilina e Eosina (para análise morfológica) e Picrosirius (para análise do colágeno). O músculo TA direito foi utilizado para a análise da expressão gênica da MyoD, miogenina, TNF- α , e TGF- β , pela Reação em Cadeia da Polimerase após Transcrição Reversa em Tempo Real (RT-qPCR). Os resultados mostraram que os animais do grupo lesado e tratado (LT) apresentaram maior número de fibras em regeneração, menor número de fibras em degeneração e processo inflamatório menos intenso; não houve diferença entre os grupos na remodelação do colágeno. Não houve alteração na expressão de TGF- β e MyoD entre os grupos. Houve diminuição significativa na expressão do TNF- α e miogenina no grupo LT comparado ao grupo L. Concluímos que o laser de AsGa, comprimento de onda de 904 nm, dose de 69 J/cm² e energia final de 4,8 Joules aplicado 5 dias consecutivos promoveu a recuperação do músculo sem alterar a remodelação do colágeno na matriz extracelular do músculo.

Palavras Chave: Laserterapia, músculo esquelético, regeneração.

ABSTRACT

Recent research in the field of physiotherapy has aimed to elucidate the main changes involved in skeletal muscle regeneration after application of therapeutic resources. In this context, the application of Low Level Laser Therapy has proven to be effective at improving the muscle regeneration process. However, the type of laser, irradiation parameters, evaluation period and molecular mechanisms involved in the regeneration process present conflicting results. The aim of this study was to evaluate the effects of Low Level Laser Therapy, type GaAs at 904 nm, during the muscle regeneration process, for seven days after the lesion, and verify whether both the GaAs laser and chosen dose influence the muscle regeneration process. Thirty Wistar male adult rats (three-month old), mean body weight 210 – 340 g were used in this study. The animals were randomized into three groups: Control Group (C, n=10), Untreated Lesion Group (L, n=10) and Treated Lesion group (TL, n=10). After anesthetizing the animals, muscle lesion was induced by freezing (cryoinjury) in the middle belly portion of the tibialis anterior muscle (TA) of both hind limbs, using an iron rod previously immersed in liquid nitrogen. A GaAs laser, with a wavelength of 904 nm was used as a therapeutic resource. Daily laser applications were initiated 24 hours after lesion, with an energy density of 69 J/cm^2 , (48 seconds), for five consecutive days, at two points in the lesion area. On the seventh day, the animals were euthanized and weighed; the TA muscles from both hindlimbs were removed and processed for morphological and molecular analysis. The left TA muscle was frozen in liquid nitrogen and histological sections obtained in a cryostat were submitted to Hematoxylin and Eosin (for morphological analysis) and Picrosirius (for collagen analysis) staining. The right TA muscle was used for the analysis of gene expression of MyoD, myogenin, TNF- α and TGF- β by using the Polymerase Chain Reaction after Reverse Transcription in Real time (RT-qPCR). The results demonstrated that the animals in the TL group presented an increased number of regenerating fibers and fewer degenerating fibers and a less intense inflammatory process; there was no difference between groups regarding collagen remodeling. There was no alteration in TGF- β or MyoD expression. There was a significant decrease in TNF- α and myogenin expression in the LT compared to the L group. We concluded that the GaAs laser, wavelength 904 nm, 69 J/cm^2 dose and final energy of 4.8 Joules, applied for 5 consecutive days, promoted muscle recovery without altering the remodeling of the muscle extracellular matrix.

Keywords: Low level laser therapy, skeletal muscle, regeneration.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Características Gerais do Músculo Estriado Esquelético

O músculo estriado esquelético é um tecido complexo, heterogêneo, altamente diferenciado, com elevada capacidade de adaptação morfológica e funcional, e exerce múltiplas funções no organismo tais como: locomoção, manutenção da postura, respiração e movimentos dos membros; aproximadamente 40% da massa corporal é constituída de tecido muscular esquelético (Smith et al., 2005; Nakano et al., 2009; Tajbakhsh, 2009).

É constituído por células especializadas, as fibras musculares, multinucleadas e os núcleos estão localizados na periferia da fibra, abaixo da membrana plasmática, com diâmetro que varia entre 10 a 100 μm . As fibras musculares estão organizadas em feixes revestidos por uma camada de tecido conjuntivo que reveste todo o músculo, denominada de epimísio. A partir do epimísio, septos de tecido conjuntivo se dirigem para o interior do músculo, dividindo-o em feixes, o perimísio. Cada fibra muscular é revestida pelo endomísio, constituído de tecido conjuntivo frouxo (Figura 1) (Kjaer, 2004; Dal Pai e Carvalho, 2007).

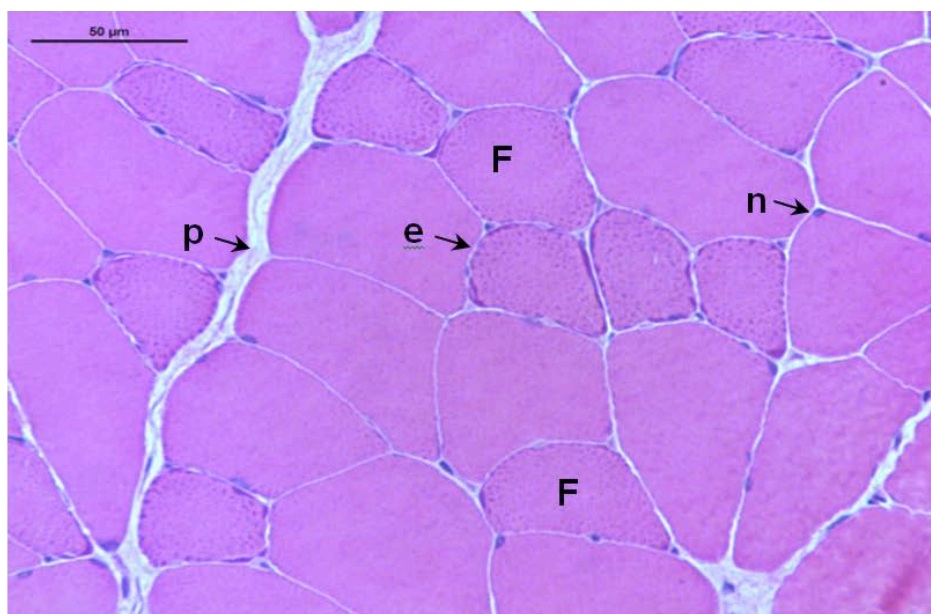


Figura 1: Corte transversal do músculo estriado esquelético. Fibras musculares (F); Perimísio (p); Endomísio (e) e Mionúcleos (n). Coloração HE (40 x). Fonte: o autor.

1.2. Células Satélites

Durante a miogênese embrionária, que ocorre através da diferenciação de células precursoras miogênicas dos somitos a partir do mesoderma, formando as fibras musculares, uma população de células precursoras miogênicas não se diferencia e permanece quiescente, sendo responsável pelo crescimento pós-natal, pela adaptação muscular e pelos processos de regeneração após danos musculares (Shi e Garry, 2006; Bentzinger et al., 2012). Essas células foram identificadas pela primeira vez por Mauro (1961) e foram denominadas de células satélites.

As células satélites são mononucleadas, localizadas em um nicho específico entre o sarcolema e a lâmina basal da fibra muscular. Encontram-se distribuídas ao longo da fibra muscular, principalmente nas proximidades de capilares, sendo 20% maior na região das junções neuromusculares (Mauro, 1961; Buckingham, 2007; Christov et al., 2007; White et al., 2010).

O número de células satélites nos músculos é dependente da espécie, da idade e do tipo de fibra considerado e atinge o pico máximo no estágio neonatal, perfazendo cerca de 30 a 35% dos núcleos totais das fibras musculares e diminui para 2 a 7% na fase adulta (Allbrook et al., 1971; Schmalbruch e Hellhammer, 1976; Sajko et al., 2004; Lindstrom e Thornell, 2009; Bareja e Billin, 2013). Essas células apresentam um aspecto fusiforme e, no estado quiescente, o citoplasma é escasso com poucas organelas, contudo quando ativadas apresentam um citoplasma mais desenvolvido com organelas mais desenvolvidas (Yin et al., 2013) (Figura 2).

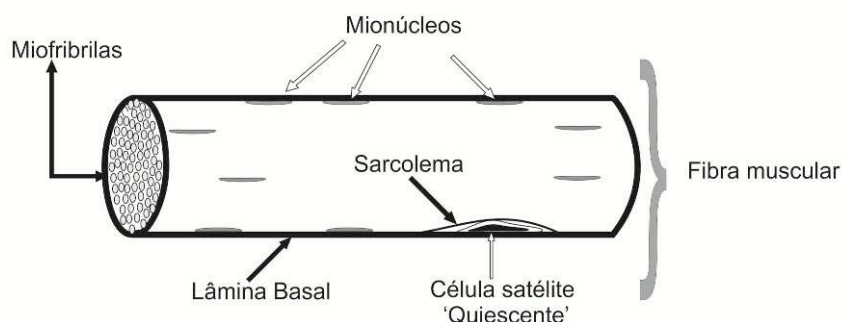


Figura 2: Esquema demonstrando a localização das células satélites, entre o sarcolema e a lâmina basal da fibra muscular. Fonte: o autor, baseado em Mauro, 1961.

O nicho das células satélites pode ser definido como o microambiente que mantém a célula no seu estado indiferenciado enquanto esta não for ativada por um estímulo específico (Bentzinger et al., 2010).

A capacidade das células satélites em se manterem no estado de quiescência é importante para a manutenção da população das mesmas (Bjornson et al., 2012; Mourikis et al., 2012). Esse processo é regulado pela ação conjunta de vários genes que evitam a sua ativação precoce, como o *Cdkn1b* e *Cdkn1c* (do inglês *cyclin-dependent kinase inhibitors 1B e 1C*); o *Rb* ou *Rb1* (do inglês *retinoblastoma tumor suppressor protein*), *Rgs2*, *Rgs5* (do inglês *regulator of G-protein signalling 2 e 5*), *Pmp22* (do inglês *peripheral myelin protein 22*), e o Fator de Crescimento de Fibroblasto (FGF) (do inglês *fibroblast growth factor*) (Hosoyama et al., 2011; Liu et al., 2013; Chakkalakal et al., 2014).

As células satélites, em estado quiescente, expressam vários marcadores nucleares e de superfície. Entre os marcadores nucleares destacam-se o emerin (EMD), lamin A/C (LMNA) e a P57 ou *Cdkn1c* (do inglês *Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C*); como marcadores de superfície destacam-se a $\alpha 7$ -integrina, calveolin 1 (CAV1), M – cadherin; receptor de calcitonina (CALCR), molécula de adesão celular neural (NCAM1), Syndecan - 3/4 e molécula de adesão vascular 1 (VCAM1) (Dumont et al., 2015).

O controle e ativação das células satélites podem ser influenciados por vários fatores de crescimento, que atuam como reguladores positivos, como os hormônios: hormônio do crescimento (GH), insulina, e testosterona, os fatores de crescimento: fator de crescimento semelhante à insulina - 1 (IGF-I) (do inglês *insulin-like growth factor-1*); o fator de crescimento de hepatócitos (HGF) (do inglês *hepatocyte growth factor*); fator de crescimento de fibroblasto (FGF) (do inglês *fibroblast growth factor*) e as interleucinas – 6 e 15 (IL-6 e IL-15) e os reguladores negativos como o fator transformante de crescimento-beta (TGF- β) (do inglês *transforming growth factor-beta*) e a miostatina (Chargé e Rudnick, 2004). Além disso, as células satélites tanto no estado quiescente como no estado ativado, expressam marcadores miogênicos (Hawke e Garry, 2001), que controlam as fases de ativação, proliferação e diferenciação durante o processo de crescimento ou reparo muscular (Seale e Rudnick, 2000). Vários marcadores para células satélites foram identificados, entre eles o *Pax7*, o *Sox8*, o *c-*

Met, a proteína *CD34* (Cornelison et al. 2000; Michal et al. 2002; Schmidt et al. 2003; Chargé e Rudnick, 2004) e os fatores de regulação miogênica (MRFs) (*do inglês myogenic regulatory factors*) (Seale e Rudnick, 2000).

Os MRFs são fatores transcricionais expressos no músculo esquelético durante a miogênese e crescimento muscular, nos processos de reparação, sendo importantes também para a manutenção do fenótipo do músculo. Fazem parte dos MRFs a MyoD, Miogenina, Myf5 e MRF4. Essas proteínas nucleares contêm um domínio altamente conservado, conhecido como “basic helix-loop-helix” (bHLH). Os MRFs reconhecem, através de seu domínio básico (“basic”), uma sequência consenso no DNA conhecida como E-box (5'-CANNTG-3'), presente na região promotora da maioria dos genes músculo-específicos. A região “helix-loop-helix” do MRF constitui o domínio de ligação dessa molécula com proteínas E, como E12 e E47. A ligação do heterodímero MRF-proteína E à sequência E-box ativa a transcrição dos genes músculo-específicos, levando à sua expressão (Rudnick e Jaenisch 1995; Molkentin e Olson, 1996; Sabourin e Rudnick, 2000). Além disso, essa interação pode iniciar a transcrição dos genes dos próprios MRFs durante o crescimento muscular (Murre et al. 1989).

A MyoD e o Myf5 são conhecidos como fatores primários, sendo expressos em mioblastos na fase de proliferação, que antecede a fase de diferenciação, enquanto que a miogenina e o MRF4 são expressos em células na fase de fusão e diferenciação em fibras musculares imaturas (Megeney e Rudnick 1995) (Figura 3). A miogenina e a MyoD também podem estar envolvidas na manutenção do fenótipo da fibra muscular adulta, como rápido ou lento. A miogenina é expressa em níveis superiores aos da MyoD em músculos lentos, enquanto que o oposto é verdadeiro para músculos rápidos (Hughes et al. 1993; Voytik et al. 1993).

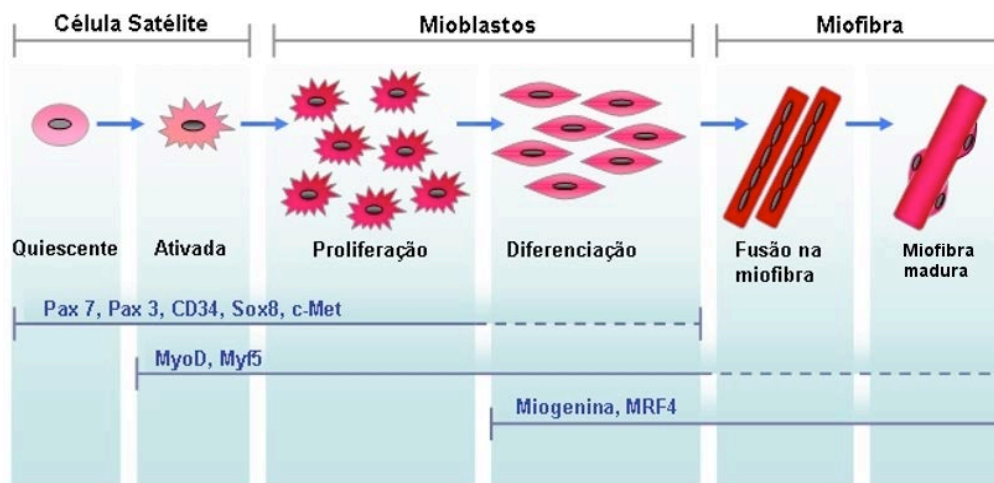


Figura 3. Representação esquemática das células satélites no crescimento muscular. Células satélites quiescentes expressam os marcadores Pax 7, Pax 3, CD 34, Sox 8 e c-Met. Após sua ativação, proliferam e passam a expressar os MRFs MyoD e Myf-5, tornando-se mioblastos. A expressão de miogenina e MRF4 controla a diferenciação dos mioblastos em miotubos, que posteriormente se diferenciam para formar as miofibras maduras (adaptado de Zammit et al. 2006).

As células satélites podem ser ativadas em resposta a miotraumas severos ou adaptativos, que requerem a regeneração muscular. Este mecanismo envolve a proliferação e/ou diferenciação das células (Hawke e Garry 2001; Chargé e Rudnicki 2004), que poderão participar da formação de novas fibras (apenas em situações de necrose seguida de regeneração), originarem novas células satélites ou diferenciar-se em novos mionúcleos para reparar a fibra lesada.

A homeostase do músculo esquelético depende do equilíbrio entre a proliferação/diferenciação e a auto renovação da população de células satélites. A perda da capacidade de auto renovação tem por consequência a diminuição no número de células satélite, reduzindo a capacidade de regeneração do músculo (Motohashi e Asakura, 2014).

A auto renovação das células satélites pode ocorrer através de mecanismos diferentes: de forma assimétrica, processo muito comum de auto-renovação das células estaminais embrionárias, como também de maneira simétrica. Na divisão simétrica, a célula satélite divide-se de forma planar ao longo da membrana basal originando duas células idênticas, o que poderia aumentar o número de células satélites ou originar duas células ativadas que irão se proliferar. Contudo, se a divisão ocorrer na orientação apicobasal (divisão assimétrica), a célula resultante que está distante da membrana basal se diferenciará em mioblasto e a célula próxima à lâmina basal permanecerá como

célula satélite. Se a divisão vai ocorrer de forma simétrica ou assimétrica, depende da necessidade do músculo em regeneração. O predomínio da divisão simétrica tende a aumentar o número de células satélites com capacidade para se diferenciar em mioblastos, enquanto, o predomínio da divisão assimétrica favorece a geração de células progenitoras e manutenção da população de células satélites (Kuang et al., 2007; Le Grand et al., 2009; Wang et al., 2014)

1.3. Lesão muscular

O músculo esquelético apresenta alta plasticidade demonstrada pela sua capacidade de adaptar-se a diferentes estímulos, dentre esses as lesões musculares (Harridge, 2007).

As lesões musculares têm uma alta incidência no esporte, ocorrem com frequência em atletas e praticantes de esportes amadores. Nas diversas modalidades do atletismo e do futebol profissional representam 50% e 30% de todas as lesões, e conforme a gravidade da lesão pode comprometer a função muscular, ocasionando atrofia, contratura, dor e aumento da probabilidade de ocorrer uma nova lesão e com isso ocasionar limitações funcionais, incapacidades e comprometer o desempenho físico do atleta (Huard et al., 2002; Jarvinen et al., 2005; Renno et al., 2011; Alonso et al., 2012; Ahmad et al., 2013; Freckleton e Pizzari, 2013)

Após a lesão muscular, ocorre necrose das fibras lesadas e a interação entre as células inflamatórias como neutrófilos, macrófagos e monócitos que tem por função fagocitar detritos celulares e promover a limpeza do local da lesão (Grounds, 2002; Chazaud et al., 2003; Mourkioti e Rosenthal, 2005; Tibdall, 2005; Galli et al., 2011). No entanto, a resposta inflamatória excessiva e persistente pode retardar a regeneração muscular e até mesmo levar a fibrose muscular. Portanto, atenuar a resposta inflamatória e diminuir o infiltrado de células inflamatórias é importante, a fim de assegurar a coordenação entre o processo inflamatório e a regeneração, resultando em melhor recuperação funcional do tecido muscular após uma lesão (Liu et al., 2015).

Os macrófagos participam ativamente do processo de regeneração. Nas primeiras 24 horas após a lesão, estão presentes os macrófagos caracterizados pela expressão do marcador de superfície CD68 (*do inglês Cluster of Differentiation 68*),

cuja função é fagocitar detritos celulares e estimular a liberação de citocinas pró-inflamatórias tais como fator de necrose tumoral α (TNF α) e interleucina-1 beta (IL-1 β). O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória que tem influência sobre várias células, na degradação de proteínas e recrutamento de células polimorfonucleares e outras células do sistema imunológico, contribuindo para a reparação tecidual (Albertini et al., 2008; Pereira et al., 2010). Além disso, Langen et al., 2006, observaram que o aumento na expressão do TNF- α induz atrofia muscular, e resultou na inibição da diferenciação e fusão de mioblastos.

Posteriormente, a população desses macrófagos diminui e predominam os macrófagos que expressam o marcador de superfície CD163 (*do inglês Cluster of Differentiation 163*), que estimulam a liberação de interleucina -10 (IL-10) (Cicilliot e Schiaffino, 2010). Essas citocinas, em baixas concentrações, além de controlar a inflamação também promovem a ativação, proliferação e diferenciação das células satélites contribuindo para a regeneração muscular (Gibbs et al., 2001; Cantini et al., 2002; Tibdall, 2005; Sonnet et al., 2006; Chen et al., 2007; Serrano et al., 2008; Duchesne et al., 2011).

1.4. Regeneração Muscular

O músculo esquelético adulto, em condições normais, é um tecido estável. Contudo, em resposta a uma lesão, como em uma atividade física ou em algumas doenças musculares, apresenta uma extraordinária capacidade de regeneração (Zanou e Gailly, 2013). A capacidade regenerativa do músculo esquelético requer a ativação, proliferação e diferenciação das células satélites (Wang e Rudnicki, 2012).

O processo de ativação, proliferação e diferenciação das células satélites na regeneração muscular é semelhante ao processo que ocorre durante o desenvolvimento muscular no período pós-natal (Parker et al., 2003; Seale et al., 2003). Nesse processo as células satélite são estimuladas a entrar no ciclo celular e a se diferenciar (Abou-Khalil e Brack, 2010). Em resposta a um miotrauma severo, que sobrevenha a necrose da fibra (por ex: ação de toxinas ou distrofia muscular), ou miotrauma adaptativo (por ex: exercício resistido), estas células são estimuladas a se diferenciar e proliferar para formar uma nova população de mioblastos (Hawke e Garry, 2001).

O processo de regeneração muscular é um processo complexo e sincronizado que ocorre em várias etapas distintas. É coordenado pelos MRFs, sendo que a MyoD e o Myf5, estão mais relacionados com a proliferação das células satélites e a Miogenina e o MRF4, são mais expressos durante a diferenciação terminal e fusão de mioblastos para formar miotubos no processo de reparação das fibras musculares (Palmer e Rudnicki, 2003; Dumont et al., 2015).

A regulação da atividade das células satélites envolve fatores que podem ser divididos em dois grupos. Os fatores de crescimento, que atuam como reguladores positivos, tais como os hormônios (GH, insulina e testosterona), os fatores de crescimento: IGF-I, HGF, FGF e as citocinas. Os reguladores positivos são responsáveis pela reentrada das células satélites no ciclo de divisão celular e posteriormente estimulam a replicação do DNA. Há também os reguladores negativos tais como a miostatina e o TGF- β (Chargè e Rudnicki, 2004) (Figura 4).

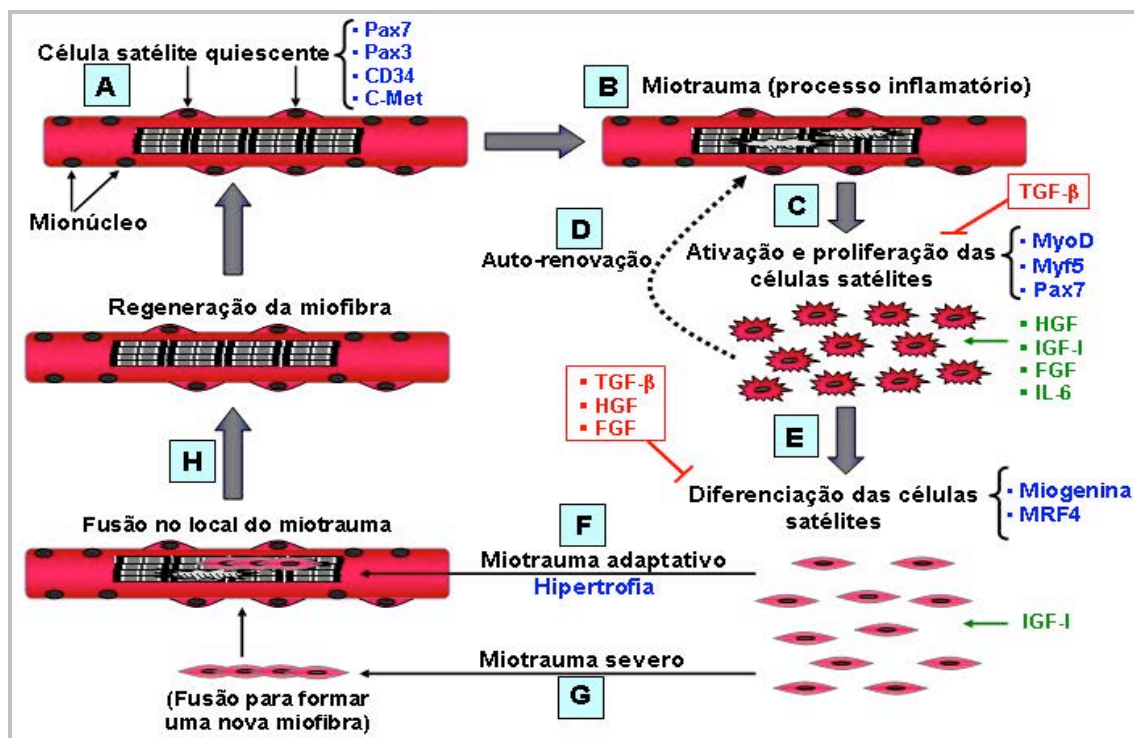


Figura 4. Regeneração Muscular. Fibra muscular normal com célula satélite quiescente e mionúcleo (A). Após um miotrauma (B), as células satélites quiescentes são ativadas, proliferam-se (C) e se diferenciam em mioblastos (E). No miotrauma adaptativo do exercício físico, os mioblastos migram para a região danificada e fundem-se à fibra muscular pré-existente para reparar o local da microlesão e/ou adicionar núcleos para ampliar a taxa síntese protéica (hipertrofia) (F). Porém, em situações de miotraumas severos que ocorra necrose das fibras (ação de toxinas e distrofia), os mioblastos poderão se alinhar e fundir-se entre si, para formar uma nova miofibrila (G), e reparar o dano da fibra muscular (H). Durante o processo de regeneração, alguns mioblastos retornam ao estado quiescente e restabelecem a população de células satélites (D). A fase de ativação das células satélites é caracterizada pela alta expressão de MyoD e Myf5, e na diferenciação ocorre um aumento na expressão de Miogenina e MRF4 (Azul). Cada estágio do processo de regeneração é mediado por fatores de crescimento, que atuam como reguladores positivos (verde) ou reguladores negativos (vermelho). Adaptado de Charge e Rudnicki, (2004).

O IGF-I é um hormônio importante para o desenvolvimento e regeneração do músculo esquelético. Após a lesão muscular as fibras danificadas expressam IGF I e IGF II, contudo apenas o IGF-I está envolvido na proliferação e diferenciação de mioblastos (Serra et al., 2011; Jiao et al., 2013). De acordo com Cassano et al., 2009 a expressão de IGF-1 regula positivamente a regeneração muscular e a hipertrofia muscular por estimular o aumento da síntese de proteínas.

O HGF está relacionado com a regulação das células satélites, ativando-as e inibindo a diferenciação de mioblastos (Hawke & Garry, 2001). Na fase inicial do

processo de regeneração atinge seu maior pico de expressão e diminui à medida que ocorre a regeneração das fibras musculares lesadas. De acordo com Miller et al., 2000, na fase inicial do processo de regeneração o HGF ativa as células satélites aumentando o número de células satélites ativadas. Posteriormente, os níveis de HGF diminuem e ocorre o aumento da diferenciação dos mioblastos.

A miostatina é uma proteína sintetizada no músculo esquelético, também conhecida como fator 8 de crescimento e diferenciação que regula o desenvolvimento e crescimento do tecido muscular. Estudos demonstraram que o aumento na expressão de miostatina inibe a proliferação e diferenciação das células satélites e por consequência diminui o desenvolvimento muscular normal. No entanto, a supressão da miostatina desencadeia aumento excessivo da massa muscular (Kambadur et al., 1997; McPherron et al., 1997; Lee, 2004; Cassano et al., 2009)

O TGF- β é um dos mais importantes fatores de crescimento relacionados com o processo de reparação tecidual, pois influencia a resposta inflamatória, a angiogênese, a reepitelização, a deposição e a remodelação da matriz extracelular (Riedel et al., 2007). No músculo esquelético, membros da superfamília do TGF- β têm mostrado ter efeitos fundamentais no desenvolvimento muscular pós-natal como no processo de regeneração muscular por modular a atividade de mioblastos e inibindo tanto a proliferação e a diferenciação das células satélites (Charge e Rudnicki, 2004; Kollias and McDermott, 2008). Estudos demonstraram que TGF- β não só induz a expressão de proteínas da matriz extracelular, mas também inibe a sua degradação através da inibição de metaloproteases de matriz e estimula a síntese de colágeno. (Suguru et al., 2005; Wisdom et al., 2005).

Após a lesão muscular, também ocorre aumento significativo nos níveis de creatina quinase (CK), das interleucinas IL-1 β e IL-6 e de citocinas pró-inflamatórias, aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e diminuição na atividade de enzimas antioxidantes (Droge, 2002; Buford et al., 2009). A diminuição na atividade das enzimas antioxidantes contribui para ativar o NF-kB responsável por alterações na expressão de genes que modulam a resposta inflamatória, dentre estes as citocinas pró-inflamatórias, fatores de crescimento e moléculas de adesão. A expressão excessiva destes mediadores é prejudicial para a reparação muscular, uma vez que intensifica a inflamação e pode inibir a diferenciação de mioblastos e o processo de

fusão (Barnes et al., 1997; Van den Berg et al., 2001; Adams et al., 2002; Langen et al., 2004).

A IL-1 β e TNF- α promovem aumento da expressão de iNOS (*do inglês Nitric oxide synthases*) e, conseqüentemente, aumenta os níveis de NO (*do inglês nitric oxide*) no tecido (Kaminski e Andrade, 2001; Filippin et al., 2011). O aumento na expressão de NO aumenta as espécies reativas de oxigênio e pode provocar alterações na síntese de proteínas, no DNA e no metabolismo (El-Remessy et al., 2009). O TNF- α é liberado principalmente por macrófagos, mas também pode ser liberado por linfócitos e mastócitos. Além de estimular a síntese de prostaglandinas e collagenases, atua também como agente quimiotático para células inflamatórias (Ishigame et al., 2006). A família da interleucina-6 (IL-6) é formada por citocinas as quais são produzidas por vários tipos celulares, incluindo mioblastos e macrófagos. A IL-6 é capaz de promover a degradação de tecido necrosado e a diferenciação das células satélites (Hawke & Garry, 2001).

A rápida recuperação do músculo após a lesão e a manutenção de suas propriedades mecânicas são importantes para a reabilitação do indivíduo não atleta, mas em especial para atletas que necessitam de sua máxima eficiência durante as competições (Freitas Filho et al., 2006). Diversos recursos terapêuticos têm sido utilizados no tratamento de diferentes afecções que acometem o tecido muscular esquelético e dentre esses destacamos a Laserterapia de Baixa Intensidade. Os objetivos terapêuticos no processo de reabilitação das lesões musculares são controlar o processo inflamatório, minimizar a formação de fibrose e estimular a regeneração tecidual (Assis et al., 2012).

1.5.Laserterapia

O termo laser é um acrônimo que significa “amplificação da luz por emissão estimulada de radiação”. A radiação laser são ondas eletromagnéticas amplificadas com características que a diferenciam das demais formas de radiações. Essas características são: monocromaticidade, coerência (temporal e espacial) e colimação (Robertson et al., 2009).

A Laserterapia de Baixa Intensidade (LBI) é uma forma de radiação eletromagnética de baixa potência, na faixa de 1 mW à 500 mW, utilizada no tratamento de diversas patologias, e o comprimento de onda se situa entre 660 a 1000 nanômetros (nm) (Huang et al., 2011). As radiações vermelhas e infravermelhas são as mais utilizadas no tratamento de diferentes tipos de tecidos. A infravermelha apresenta o comprimento de onda acima de 700 nm e a vermelha abaixo de 700 nm. Em geral, quanto maior o comprimento de onda, maior a penetração do feixe no tecido. Por esta razão, o comprimento de onda infravermelho tem maior penetração quando comparado ao comprimento de onda vermelho e, por esse motivo esses são utilizados com mais frequência na prática clínica do fisioterapeuta, no tratamento de diversos tecidos moles, como por exemplo, músculos, tendões, ligamentos e cápsulas, dentre outros (Turner e Hode, 2002; Esnouf et al., 2007; Karu, 2007; Meinhardt et al., 2008).

A LBI é um recurso não térmico e o seu efeito terapêutico é creditado a uma interação fotoquímica com as células (Shefer et al., 2002; Lin et al., 2010). A interação dos fótons da radiação laser com receptores específicos na mitocôndria aumenta a função mitocondrial, aumenta o consumo de oxigênio, a síntese de NADH e ATP e age no potencial de membrana. A absorção da luz do laser pelos tecidos pode estimular um aumento da síntese de RNA e na expressão de várias proteínas reguladoras do ciclo celular, e, por conseguinte, aumentar a proliferação das células (Dortbudak et al., 2000; Renno, et al., 2007; Huang et al., 2009).

Estudos experimentais em animais revelaram que a LBI é capaz de reduzir o processo inflamatório, aumentar a atividade mitótica celular, estimular a angiogênese, a síntese de colágeno e promover a regeneração muscular (Albertini et al., 2007; Bortone et al., 2008; Liu et al., 2009; Sussai et al., 2010). Os possíveis mecanismos sugerem que a laserterapia pode diminuir o estresse oxidativo e a produção de espécies reativas de oxigênio (Avni et al., 2005; Rizzi et al 2006; Assis et al., 2012), melhorar a função mitocondrial (Xu et al., 2008; Silveira et al., 2009) e ativar a microcirculação (Bibikova 1993).

A radiação laser é uma excelente opção para o tratamento de lesões musculares, pois é um recurso de baixo custo, não invasivo, de fácil aplicação, pode reduzir o uso de medicamentos e, além disso, até o presente momento não foram

relatados efeitos colaterais nos tecidos tratados com o uso desse recurso (Alves et al., 2014).

Estudos recentes com diferentes tipos de lasers e parâmetros de radiação mostram efeitos benéficos na fase inicial do processo de regeneração muscular modulando o processo inflamatório (De Almeida et al., 2013; Rodrigues et al., 2013; Brunelli et al., 2014; Fernandes et al., 2014); estimulando a formação de novos vasos sanguíneos (De Souza et al., 2011); remodelando a matriz extracelular (Baptista et al., 2010; Alves et al., 2014) e estimulando a proliferação e diferenciação das células satélites (Vatansever et al., 2012; Assis et al., 2013).

Os lasers mais frequentemente utilizados em tratamentos de lesões teciduais são o Hélio-Neon (HeNe), Arseneto de Gálio (AsGa), Arseneto de Gálio Alumínio (AsGaAl) e Índio-Gálio-Alumínio-Fosforeto (InGaAlP) (Silva et al., 2010). Vários estudos foram realizados, em humanos, utilizando o Laser de Arseneto de Gálio (AsGa) (comprimento de onda de 904 nm) e mostraram os seus efeitos benéficos em diferentes condições patológicas tais como, no tratamento da dor miofascial (Gur et al., 2004); diminuição da dor lombar (Mandić e Rancié, 2011; Jovicić et al., 2012); diminuição da dor no ombro (Bingöl et al., 2010); no tratamento do líquen plano oral (Cafaro et al., 2010).

Estudos experimentais em ratos, utilizando o Laser de Arseneto de Gálio (AsGa) (comprimento de onda de 904 nm e energia final variando entre 0,04 a 3,0 Joules) também tem demonstrado o benefício do laser sobre as lesões no músculo esquelético. Foi observado diminuição do processo inflamatório e da formação de fibrose (Rizzi et al., 2006), aumento na síntese de ATP (Silveira et al., 2009), previne lesões musculares induzidas pelo exercício físico (De Almeida et al., 2011), aumento da expressão dos MRFs (Silva et al., 2012), redução significativa do estresse oxidativo e da síntese de colágeno (De Souza et al., 2013; Silveira et al., 2013) e previne a progressão das alterações musculares na Distrofia Muscular de Duchenne (Leal-Júnior et al., 2014).

Embora os estudos que utilizaram a laserterapia no tratamento de diferentes tecidos mostram que a radiação laser acelera o processo de regeneração tecidual, diferentes protocolos de tratamento são utilizados o que dificulta a comparação dos resultados e a escolha de parâmetros adequados de tratamento (Silva et al., 2010). Um estudo avaliou os parâmetros em equipamentos de diferentes fabricantes e mostrou

variações na energia final irradiada, indicando que a densidade de energia apenas não parece ser o melhor parâmetro para a escolha da dose adequada a ser utilizada no tratamento, mas também é importante observar a energia final irradiada para se obter o melhor resultado terapêutico (Fukuda and Malfatti, 2008).

De acordo Enwemeka, (2009) a densidade da energia ou fluência é definida como a quantidade de energia aplicada por unidade de área. A densidade de energia é obtida dividindo a energia final irradiada pela área do feixe é expressa em joules por centímetro quadrado (J/cm^2).

A energia irradiada é um dos parâmetros mais críticos que tem influência nos resultados do tratamento, e apresenta variações de acordo com a potência do equipamento e o tempo de irradiação. É o produto da potência do equipamento em miliwatts (mW) pelo tempo de irradiação em segundos (s), portanto, a densidade de energia é influenciada por variáveis tais como: potência do equipamento, energia final irradiada, tempo de irradiação e área do feixe (Enwemeka, 2009).

A Associação Mundial de Laserterapia recomenda a utilização de energia final de 2 a 4 Joules para o tratamento de diferentes tipos de tecidos humanos, incluindo músculo esquelético (Walt, 2006). Estudos que avaliaram os efeitos da radiação laser no processo de regeneração muscular mostraram que a energia final mais comum utilizada apresentou variações entre 1,4 e 2,0 Joules (Alves et al., 2014). Um estudo utilizando um Laser de Arseneto de Gálio (AsGa), 904 nm, 1,5 mW, que comparou o efeito de diferentes energias finais (1,5 e 3,0 Joules), aplicadas durante 5 dias consecutivos, com a primeira aplicação 3 dias após a lesão mostraram que o tratamento com uma energia final de 3,0 Joules, foi eficaz para melhorar a regeneração do músculo (Silva et al., 2012). No entanto, Oliveira et al., 1999, utilizando o Laser de Arseneto de Gálio (AsGa), 904 nm, 1,5 mW e energia final de 0,19 e 0,72 Joules não observaram alterações morfológicas na recuperação muscular (Oliveira et al., 1999).

Com base nos dados apresentados, no nosso estudo, optamos por investigar o efeito do Laser de Arseneto de Gálio (AsGa), 904 nm, 50 mW e área do feixe $0,035\text{ cm}^2$ na regeneração do músculo estriado esquelético, após criolesão, utilizando uma energia final alta (4,8 Joules).

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do efeito Laser de Arseneto de Gálio (AsGa) na fase inicial do processo de regeneração muscular, utilizando energia final alta de 4,8 Joules. Para tanto foram avaliados aspectos morfológicos da área da lesão, número de fibras musculares em regeneração e degeneração, o percentual de colágeno, a expressão dos fatores regulatórios miogênicos (MyoD e miogenina), o processo inflamatório através da expressão do TNF- α e fibrose através da expressão do TGF- β .

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Modelo Animal

Todo o experimento e procedimentos foram realizados de acordo com as normas internacionais de experimentação animal (Clark et al., 1997), e foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, São Paulo, (protocolo nº 713/11). Foram utilizados 30 ratos Wistar machos, (*Rattus norvegicus*), com três meses de idade, com peso de 210 a 340 g, oriundos do Biotério Central da Universidade do Oeste Paulista. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais no Biotério de Pequenos Mamíferos do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências da UNESP, em ambiente com temperatura controlada (22-24 °C), ciclo de luminosidade claro/escuro invertido (12/12 h) e providos com ração e água *ad libitum*.

3.2. Grupos Experimentais

Os animais (n=30) foram divididos aleatoriamente em três grupos (n = 10 por grupo) como descrito abaixo:

- 1) Grupo controle (C): Os animais não foram submetidos à lesão ou tratamento.
- 2) Grupo Lesado (L): animais submetidos à lesão, mas não foram submetidos a tratamento com a terapia laser de baixa intensidade (LBI).
- 3) Grupo Lesado/Tratado (LT): animais foram lesados e submetidos ao tratamento com a terapia laser de baixa intensidade (LBI).

3.3. Modelo de Lesão

Os animais foram anestesiados com 1 ml/kg de 1% ketamina HCl (Dopalen; Vetbrands; São Paulo; Brasil) e 2% xilazina (Anasedan; Vetbrands; São Paulo; Brasil), via intraperitoneal (IP). A lesão foi realizada conforme descrito por Assis et al., (2012) e Miyabara et al. (2006). Após a anestesia, foi realizada tricotomia no membro posterior direito e esquerdo e, em seguida, um corte longitudinal (1 cm) foi realizado na pele ao

longo do ventre do músculo tibial anterior (TA) expondo o músculo de ambos os membros. Em seguida, uma barra retangular de ferro ($0.8 \times 0.8 \text{ mm}^2$), previamente congelada em nitrogênio líquido por 30 segundos, foi mantida em contato (transversal) com a região central do músculo TA de ambos os membros durante 10 segundos, de maneira alternada. O procedimento foi repetido por duas vezes consecutivas, com um intervalo de tempo de 30 segundos e depois a pele foi suturada (Figura 5). O músculo TA foi escolhido porque é um músculo superficial, tornando a cirurgia simples. Após a cirurgia, os animais foram alojados em gaiolas de plástico individuais em uma sala com condições ambientais controladas.



Figura 5: Imagem ilustrativa da criolesão no ventre do músculo tibial anterior.

3.4.Desenho Experimental

Foi utilizado um laser de diodo semiconductor composto por Arseneto de Gálio (AsGa), (KLD Biosistemas®, Amparo, Brasil), emissão pulsada, comprimento de onda de 904 nanômetros, potência de saída (média) de 50 mW (miliwatts), área de emissão do feixe de $0,035 \text{ cm}^2$.

O tratamento foi iniciado 24 horas após a criolesão, e as aplicações foram realizadas por 5 dias consecutivos, com intervalo de 24 horas entre as aplicações. Os animais foram contidos manualmente com o membro posterior posicionado em extensão, a caneta do Laser foi posicionada diretamente sobre a pele (contato direto), na área da lesão, no ventre do músculo tibial anterior, mantida em um ângulo de 90° à superfície irradiada (Figura 6). A densidade de energia utilizada foi de 69 J/cm^2 ,

aplicado em dois pontos sobre a área da lesão, a uma distância de 1 cm por ponto, para atingir toda a área da lesão (Morrone et al., 1998). O tempo de irradiação foi de 48 segundos por ponto, resultando em uma energia final de 2,4 Joules em cada ponto, totalizando 4,8 Joules na área da lesão. Esta dose e energia final foram escolhidas com base em um estudo anterior, utilizando um Laser de Arsenieto de Gálio na fase inicial do processo de regeneração muscular (Silva et al., 2012). Após 7 dias foi mensurado o peso corporal dos animais (PC) e em seguida, foram mortos mediante overdose de anestésico (ketamina) via intraperitoneal. O músculo tibial anterior de ambos os membros foi removido, e em seguida fragmentos do terço medial do músculo foram removidos e congelados, utilizando-se isopentano a -156°C , previamente resfriado em nitrogênio líquido. O material congelado foi armazenado em Freezer a -80°C . O Fragmento do músculo tibial anterior esquerdo foi utilizado para análise morfológica e o direito para a análise molecular (expressão genética).

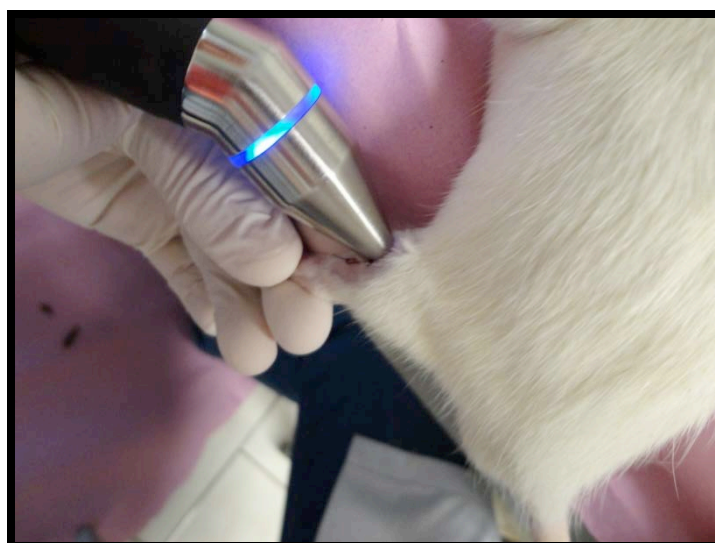


Figura 6: Imagem representativa do tratamento com o Laser.

3.5. Análise Histológica

Cortes histológicos de 8 μm , do terço medial do músculo tibial anterior do membro posterior esquerdo foram obtidos em micrótomo criostato (JUNG CM1800, Leica Alemanha), a -20°C e submetidos a técnica de coloração Hematoxilina e Eosina (HE) para avaliar a morfologia geral das fibras musculares na área da lesão. A

freqüência (porcentagem) de fibras musculares em degeneração e regeneração foi analisada utilizando-se quatro campos de imagem computadorizada para cada animal. A avaliação histopatológica por HE foi realizada com microscópio de luz (Olympus, OpticalCo. Ltd., Tokyo, Japan), com a objetiva de 20x e quatro campos foram escolhidos aleatoriamente na área da lesão. Na análise qualitativa investigada para cada animal se considerou qualquer modificação no local da lesão como processo inflamatório, edema, número de fibras em regeneração e degeneração. Para avaliação histológica do colágeno foi realizada a técnica do PicroSirius (Calvi et al, 2012). Três amostras de imagem computadorizadas foram usadas para cada animal. A quantificação dos dados histopatológicos foi realizada utilizando um microscópio de luz ligado a um sistema de análise de imagem computadorizado (Qwin Leica, Wetzlar, Alemanha). A freqüência de fibras musculares (processo de degeneração e regeneração) e análise do colágeno foram determinadas usando o Image Analysis Software System (Leica, Alemanha). Estes parâmetros foram calculados utilizando uma objectiva de 20x.

3.6.Avaliação quantitativa da expressão gênica por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real após Transcrição Reversa (qPCR)

Fragmentos do terço medial do músculo tibial anterior do membro posterior direito foram utilizados na análise da expressão gênica (MyoD, Miogenina, TNF- α e TGF- β).

3.6.1.Expressão de RNA

Uma porção muscular de cada amostra, previamente congelada em nitrogênio líquido, foi homogeneizada com homogeneizador de tecidos (IKA UltraTurrax/T-25) em 1 mL de TRIzol/50-100 mg de tecido. O material insolúvel resultante da homogeneização foi retirado por centrifugação a 12.000g por 10 min a 4 °C. Essa solução foi coletada e transferida para um tubo de 1,5 mL e incubada durante cinco minutos à temperatura ambiente para permitir a completa dissociação dos complexos núcleo-protéicos. Após esse período, foi acrescentado 0,2 mL de clorofórmio para ml de TRIzol utilizado, homogeneizando vigorosamente e incubando novamente, desta vez,

por 3 min a temperatura ambiente. Após essa segunda incubação o material foi centrifugado a 12.000g/15 min a 4 °C.

Para a precipitação do RNA, a fase aquosa formada, após a centrifugação do material, foi separada e precipitada por intermédio da incubação com 0,5 mL de isopropanol (por mL de TRIzol utilizado inicialmente) por 10 min à temperatura ambiente. Após esse período, o material foi novamente centrifugado a 12.000g/10 min a 4 °C. O sedimento formado foi lavado com 1mL de etanol 75%/mL de TRIzol utilizado inicialmente) e centrifugado a 7.500g/5 min a 4 °C. O sobrenadante foi removido cuidadosamente e, após a retirada do excesso de líquido do fundo do tubo, o *pellit* foi seco à temperatura ambiente durante cerca de 5 min. O RNA total foi dissolvido em água destilada e autoclavada (tratada com Dietilpirocarbonato-Sigma® - DEPC, a 0,01%), incubado por 10 min à temperatura de 60°C e, finalmente, armazenado a - 80°C. O RNA foi quantificado por espectrofotometria a 260 nm, usando-se o fator de correção próprio para o RNA (40). Foi também determinada a razão entre as medidas espectrofotométricas a 260 e 280 nm (razão entre a quantidade de RNA e proteínas), o que nos forneceu uma estimativa da qualidade da extração. As amostras utilizadas terão razão 1.8.

3.6.2.Tratamento do RNA

As amostras de RNA foram tratadas com TURBO DNase (*Ambion*, EUA) para remover a contaminação com DNA genômico. A concentração de RNA, em ng/μL, foi determinada através do espectrofotômetro. A qualidade do RNA foi obtida pelo número da integridade do RNA (*RNA Integrity Number*, RIN), a partir da análise dos RNAs ribossomais baseadas em microfluidos, utilizando-se o sistema *2100 Bioanalyzer* (Agilent, EUA).

3.6.3.Reação em cadeia da polimerase em Tempo Real (qPCR).

Os níveis de expressão dos genes alvos foram detectados por RT-qPCR através do QuantStudio™ Real-Time PCR Systems (). Para cada reação, 2 μL de cDNA (20 ng/μL) foram amplificados usando 6.5 μL de *Power SYBR Green PCR Master Mix 2x* (Applied Biosystems, USA), 2 μL de cada primer (nas concentrações ótimas testadas

previamente) e 6.5 μ L de água ultrapura, completando 25 μ L de reação. As reações para cada gene foram realizadas em duplicatas, utilizando-se as condições de termociclagem descritas para a RT-qPCR. Ao término de cada reação, a amplificação específica de cada gene foi confirmada pela análise da curva de dissociação dos fragmentos amplificados. Para cada gene, foram utilizados um controle negativo da PCR (cDNA substituído por água livre de RNase) e um controle negativo para a reação de Transcrição Reversa (cDNA substituído por mistura inicial contendo quantidades iguais de RNA de todas as amostras). Os primers utilizados para detectar os genes alvo MyoD, miogenina, TGF- β , TNF- α e os controle endógenos PpIa, PpIb e B2m são mostrados na Tabela 1. Expressão gênica relativa foi calculada usando o método comparativo CT (Livak and Schmittgen, 2001), e o grupo controle para a normalização dos dados obtidos. A expressão dos genes alvos e os genes de referência mais estáveis (PpIa e PpIb) foram obtidos usando geNorm (versão 3.5, descrito por Vandesompele et al., 2002).

Tabela 1. Conjunto de primer utilizados para expressão gênica.

Gene	Forward primer	Reverse primer
MyoD	TTTTTCATGCGACTCACAGC	GAAGGCAGGGCTTAAGTGTG
Myogenin	GTCTTTTCCGACCTGATG	ATAGAAGTGGGGCTCCTGGT
TGF- β	GGACTCTCCACCTGCAAGAC	GACTGGCGAGCCTTAGTTTG
TNF- α	TGATCGGTCCCAACAAGGA	GGGCCATGGAAGTATGAGA
PpIa	TCAACCCACCGTGTTCTTC	ACTTTGTCTGCAAACAGCTCG
PpIb	CAAGACCTCCTGGCTAGACG	CCGTACCACATCCATGCCTT
B2M	CGAGACCGATGTATATGCTTGC	GTCCAGATGATTGAGAGCTCCA

MyoD; Myogenin; TNF- α ; TGF- β ; PpIa: peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A); PpIb: peptidylprolyl isomerase B (cyclophilin B; beta-2-microglobulin).

3.7. Análise Estatística

Os dados referentes às análises de expressão gênica (TNF- α , Miogenina, MyoD e TGF-beta) foram submetidos ao teste de variância (ANOVA ONE Way), para permitir a análise comparativa entre os grupos experimentais. O teste de Tukey foi utilizado para caracterizar se houve diferença entre os grupos. Os resultados do número de fibras em regeneração e de fibras em degeneração e bem como das fibras em regeneração foram submetidos ao teste de Mann-Whitney para determinar possíveis

diferenças entre os grupos lesados e tratados quando comparados com o grupo lesado e não tratado. A análise estatística dos dados referentes ao percentual de colágeno foi avaliado através do teste de Kruskal-Wallis seguido de teste a posteriori de Dunn para determinar as diferença entre os grupos analisados. Para todas as análises estatísticas foi estipulado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4. CAPÍTULO 1 - High Final Energy Of Low - Level Gallium Arsenide Laser Therapy Enhances Skeletal Muscle Recovery Without A Positive Effect On Collagen Remodeling *

*Artigo publicado na revista Photochemistry and Photobiology, v 4, 2015.

High Final Energy of Low - Level Gallium Arsenide Laser Therapy Enhances Skeletal Muscle Recovery without a Positive Effect on Collagen Remodeling

Carlos Eduardo Assumpção de Freitas^{1,3*}, Raquel Santilone Bertaglia¹, Ivan José Vechetti Júnior¹, Edson Assunção Mareco¹, Rondinelle Artur Simões Salomão¹, Tassiana Gutierrez de Paula¹, Gisele Alborghetti Nai⁴, Robson Francisco Carvalho², Francis Lopes Pacagnelli³ and Maeli Dal-Pai-Silva²

¹ Post Graduate Program in General and Applied Biology, Bioscience Institute, State University of São Paulo, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil.

² Department of Morphology, Bioscience Institute State University of São Paulo, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil

³ Department of Physiotherapy, University of Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, São Paulo, Brazil

⁴ Department of Pathology, University of Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, São Paulo, Brazil

* Corresponding author email: cfreitas@unoeste.br

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effects of a Gallium Arsenide (GaAs) laser, using a high final energy of 4.8 Joules, during muscle regeneration after cryoinjury. Thirty Wistar rats were divided into three groups: Control (C, n=10); Injured (I, n=10) and Injured and laser treated (Injured/LLLT, n=10). The cryoinjury was induced in the central region of the Tibialis Anterior muscle (TA). The applications of the laser (904 nm, 50mW average power) were initiated 24 hours after injury, at energy density of 69 J/cm² for 48 seconds, for five days, to two points of the lesion. Twenty-four hours after the final application, the TA muscle was removed and frozen in liquid nitrogen to assess the general muscle morphology and the gene expression of TNF- α , TGF- β , MyoD and Myogenin. The Injured/LLLT group presented a higher number of regenerating fibers and fewer degenerating fibers ($p<0.05$) without changes in the collagen remodeling. In addition, the Injured/LLLT group presented a significant decrease in the expression of TNF- α and Myogenin compared to the injured group ($p<0.05$). The results suggest that the GaAs laser, using a high final energy after cryoinjury, promotes muscle recovery without changing the collagen remodeling in the muscle extracellular matrix.

INTRODUCTION

Skeletal muscle lesions are common in many situations and represent a challenge for sport scientists since the rate of muscle strain injury recurrence is 30% among some professional athletes (1). Muscle is a dynamic tissue with an extraordinary capacity for regeneration; a complex and synchronized process involving the activation of various cell types (2). Thus, there is great interest in better understanding the mechanisms involved in muscle regeneration after an injury.

Furthermore, the main objectives in muscle rehabilitation following injury are improvement in the regenerative capacity and prevention of muscle fibrosis (3).

Muscle regeneration is a highly orchestrated process that involves degeneration, inflammation, regeneration and fibrosis (4, 5). Additionally, several factors control this process, among which the myogenic regulatory factors (MRFs) and pro-inflammatory cytokines such as the Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF - α) and Transforming Growth Factor Beta (TGF - β) are highlighted (6).

TNF- α is a proinflammatory cytokine that promotes the stimulation of other cytokines and acts as a chemotactic agent for inflammatory cells, activated mainly by macrophages during the early phase of the tissue healing process (7). TGF- β is a cytokine produced by the fibroblasts, epithelial cells and macrophages at the site of the injury, producing extracellular matrix proteins and collagen synthesis. An increased expression of TGF- β over a prolonged period is detrimental to the process of muscle regeneration as it contributes to the formation of fibrous tissue and can inhibit the proliferation, differentiation and fusion of myoblasts (8, 9).

In addition to these inflammatory cytokines, several studies have demonstrated the importance of satellite cells (SCs) in muscle regeneration. The steps associated with

the proliferation, differentiation and fusion of SCs (regulated by MRFs) during the regeneration process are generally well established (10). The MRFs are part of the family of transcriptional factors that play an important role during myogenesis and muscle growth. Although the MRFs are markers involved with satellite cell proliferation and differentiation, MyoD and Myf5, are more related with myogenic precursor cells towards proliferation and Myogenin and MRF4, are more expressed during the terminal differentiation and fusion of myoblasts to form myotubes that mature into new muscle fibers (11). The MRFs are highly expressed during muscle plasticity and regeneration, since in these situations the events observed during myogenesis occur (4). Although muscle regeneration after injury is well defined, depending on the level of injury, the process is very slow and may affect muscle function, leading to atrophy, contracture, pain and an increased likelihood of re-injury (12, 13).

In this context, treatments that could accelerate cell regeneration and prevent fibrosis are important for avoiding complications and sequelae in the treatment of these injuries. Low-level Laser Therapy (LLLT) has been shown to be an excellent treatment option for the recovery of skeletal muscle after injury (14). This therapy effectively reduces inflammation, accelerates soft tissue healing and stimulates the myogenic process (15).

The cell biological responses resulting from the laser radiation absorption are the result of photoexcitation of electrons that promote changes in the cellular redox state, which in turn increases the transfer of electrons throughout the respiratory chain, increasing the transference of electrons and protons accelerating the oxidative metabolism, leading to an increase in adenosine triphosphate (ATP) synthesis (16-19).

The absorption of the laser light by tissues can also stimulate an increase in RNA synthesis and the expression of various cell-cycle regulatory proteins, therefore increasing cell proliferation (20, 21).

The most commonly used lasers in research are the Helium-Neon (HeNe), Gallium Arsenide (GaAs), Gallium Aluminum Arsenide (GaAlAs) and Indium Gallium Aluminum Phosphorus (InGaAlP) (22). Studies using the GaAs laser, wavelength 904 nm, with different parameters (peak power, power density, beam area, irradiation time, dosage and final energy radiated) in vivo and in vitro have demonstrated that it was able to reduce oxidative stress and collagen synthesis, promoting increased expression of collagen type I Alpha 1 (Col1 α 1) and vascular endothelial growth factor (VEGF) (23, 24).

The final energy radiated is one of the most important parameters influencing the results of treatment, and is directly related to the peak power of the equipment and radiation time (25). A study of equipment from different manufacturers has shown that using the same energy density in devices with different average or peak power can provide variable final energy, not only the energy density, but also the final energy and other parameters such as spot size and, average or peak power should be mentioned, so that the appropriate dosage can be established and the best therapeutic results achieved (26).

The World Association for Laser Therapy recommends final energy of 2 to 4 Joules for the treatment of different kinds of human tissues, including skeletal muscle (27). Research with a Gallium Arsenide laser, early in the process of muscle regeneration, using different doses and final energy, presented discrepancies in the results.

Treatments with a final energy of 3.0 Joules using a 5 mW power equipment were able to accelerate muscle regeneration in skeletal muscle, However, when treated with a final energy of 0.19 and 0.72 Joules using a 1.5 mW power equipment non morphological changes were observed in muscle recovery. Furthermore, the greater the power of a given therapeutic device, the shorter the necessary treatment time to achieve a particular target dose (28, 29). Several studies have been conducted to evaluate the effects of a GaAs laser on skeletal muscle with different parameters; in these studies the final energy radiated varied between 0.04 to 3.0 Joules, therefore justifying the design of a new study using high energy (24, 30-34).

The lack of standardization in dose, final energy radiated and discrepancies in the results of operations using a Gallium Arsenide laser in the muscle regeneration process indicate the need for a study using high final energy. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effects of a Gallium Arsenide laser, in the early phase of muscle regeneration after cryoinjury, with final radiated energy of 4.8 Joules.

Our hypothesis was that the use of high final energy would influence muscle regeneration by changing the expression of factors related to muscle maintenance and growth.

MATERIAL AND METHODS

Animal model and muscle injury: Adult male Wistar rats (3 months of age) weighing 210-340 g, provided by the Central Animal House of the Oeste Paulista University, were maintained with light-dark periods of 12h and food and water “*ad libitum*”. The experimental design was conducted in accordance with the policies and international standards for animal experimentation (35). This experiment was approved by the Oeste Paulista University Ethics Committee, Presidente Prudente, SP, Brazil (Protocol No. 713/11).

The animals were randomly distributed into three groups: Control group (C, n=10): animals without injury or treatment; Injured group (I, n=10): injured animals without any treatment; Injured and laser treated group (Injured/LLLT, n=10): injured animals treated with low-level laser therapy (LLLT). .

The rats were subjected to anesthesia with Ketamin/Xilazin (40mg/kg and 20mg/kg, intraperitoneally). The right and left hind limbs of each animal were shaved and a longitudinal cut (1 cm) was made to expose the Tibialis Anterior muscle (TA) to cryolesion. Cryolesion is a well-known and highly reproducible model, which reproduces the natural response of muscle to damaging lesions, as well as its regeneration capacity (36). A rectangular iron bar (0.8 x 0.8 mm²), previously frozen in liquid nitrogen for 30 seconds, was held in contact (transversal), with the central region of the TA muscle for 10 seconds, without pressing the iron bar on the muscle. The procedure was repeated twice in both limbs, with a 30 second interval between applications, following which the skin was sutured. The model is characterized by the development of a homogeneous and well-defined lesion area, which can be

macroscopically observed by the white color that develops once it is established (Fig. 1) (37).



Figure 1. Freezing Tibialis anterior muscle injury (cryolesion) model.

Laser treatment protocol: A Gallium Arsenide (GaAs) diode laser (Endofhoton - KLD Biosistemas®, Amparo, Brazil) with pulsed emission, wavelength of 904 nm, mean output power of 50 mW and spot size of 0.035 cm² was used in the experiment. The irradiation time and final energy was automatically controlled by the previously calibrated laser equipment.

The animals were manually restrained with the left hind limb positioned in extension. Treatment was initiated 24 hours after cryoinjury and performed for 5 consecutive days, every 24 hours. The laser pen was positioned at a 90° angle and placed directly on the skin (direct contact), on the surface of the middle region of the TA muscle in both hind limbs. The energy density used was 69 J/cm², applied to two spots of the lesion area, for 48 seconds per point (2.4 J per dot), at a distance of 1 cm per point, as described by (38), to reach the entire area of the lesion, promoting a final

energy of 4.8 Joules. This dose and final energy were chosen based on a previous study using a Gallium Arsenide laser in the early phase of the muscle regeneration process (28). Seven days after the injury, the animals were euthanized with an overdose of anesthetic (Ketamine Intraperitoneally) and muscle samples from the lesion area were collected for analysis.

Histopathological analysis: The TA muscles were removed and the middle portion was frozen using isopentane at -156°C, pre-cooled in liquid nitrogen, for histopathological analysis of the muscle fibers in the area of the injury. Histological sections (8µm thick) were maintained in a cryostat (JUNG CM1800, Leica Germany) at -24°C and stained with hematoxylin and eosin (HE). The frequency (percentage) of muscle fibers in the degeneration and regeneration process was examined using four computer image samples for each animal. Histological sections (8µm thick) were also stained with PicroSirius red (39) for collagen analysis. Three computer image samples were used for each animal. The quantification of histopathological data was carried out using a light microscope attached to a computerized imaging analysis system (Leica Qwin, Wetzlar, Germany). The frequency of muscle fibers (degeneration and regeneration process) and collagen analysis were determined using Image Analysis System Software (Leica, Germany). These parameters were calculated using a 20x objective.

Real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR) analysis: Total RNA was extracted from the TA muscles using TRIzol Reagent (Invitrogen, USA). The muscles (100 mg) were mechanically homogenized in 1 ml ice-cold TRIzol reagent in accordance with the manufacturer's instructions. The total RNA was solubilized in nuclease-free H₂O, incubated in DNase I (Invitrogen, USA) to remove any DNA present in the sample, and quantified by measuring the optical density (OD) at 260 nm. RNA purity was ensured

by obtaining a 260/280 nm OD ratio of ~2.0. Degradation of RNA samples was monitored by the observation of appropriate 28S to 18S ribosomal RNA ratios as determined by the GelRed staining of the agarose gels.

For each sample, cDNA was synthesized from 2 µg of total RNA using components from the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA). The reaction contained 10 µl 10x Reverse Transcription Buffer, 4 µl 25x dNTPs, 10 µl 10x random primers, 100 units of RNase inhibitor (Applied Biosystems, USA), 250 units of MultiScribe™ Reverse Transcriptase, and the final volume was adjusted to 100 µl with nuclease-free H₂O. The cDNA samples were aliquoted and stored at -20 °C and submitted to Real-Time PCR amplification. The reactions were run in duplicate using 0.4 µM of each primer and 2X Power SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems, USA).

The primers used to detect the target genes MyoD, Myogenin, TGF-β, TNF-α and the reference genes PpIa, PpIb and B2M are shown in Table1. Cycling conditions were as follows: 50°C for 2 min, 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min in QuantStudio (Applied Biosystems, USA). Melting dissociation curves and agarose gel electrophoresis were performed to confirm that only a single product was amplified. Control reactions were run lacking a cDNA template to check for reagent contamination. Relative gene expression was calculated using the Comparative CT Method (40) and the control group was used as a reference. The choice of reference genes was experimentally determined according to Vandesompele et al., 2002 (41). The qPCR data were imported into Real-Time StatMiner Software (Integromics, Spain), which calculates normalizing genes based on geNorm calculations. The normalization factor was obtained as the geometric mean of

expression data of the three most stable reference genes (PpIa, PpIb and B2M). The normalization factor, generated by geNorm, using the most stable genes (PpIa and PpIb) was used to normalize the RT-qPCR data.

Table 1. Primer set

Table 1. Primer sets. MyoD; Myogenin; TNF- α : Tumor necrosis factor alpha; TGF- β : Transforming growth factor beta; PpIa: peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A); PpIb: peptidylprolyl isomerase B (cyclophilin B); B2M: beta-2-microglobulin.

Gene	Forward primer	Reverse primer
MyoD	TTTTTCATGCGACTCACAGC	GAAGGCAGGGCTTAAGTGTG
Myogenin	GTCTTTTCCGACCTGATG	ATAGAAGTGGGGCTCCTGGT
TGF- β	GGACTCTCCACCTGCAAGAC	GACTGGCGAGCCTTAGTTTG
TNF- α	TGATCGGTCCCAACAAGGA	GGGCCATGGAACTGATGAGA
PpIa	TCAACCCCACCGTGTTCTTC	ACTTTGTCTGCAAACAGCTCG
PpIb	CAAGACCTCCTGGCTAGACG	CCGTACCACATCCATGCCTT
B2M	CGAGACCGATGTATATGCTTGC	GTCCAGATGATTCAGAGCTCCA

Statistical analysis: The *RT-qPCR* data (TNF- α , Myogenin, MyoD and TGF- β) were statistically evaluated by analysis of variance (ANOVA), followed by the Tukey–Kramer post test. The numbers of fibers in regeneration and in degeneration were subjected to the Mann-Whitney test and data concerning the percentage of collagen were evaluated using the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post test. Data were expressed as mean ($\pm$) standard deviation (SD). Values with $P < 0.05$ were considered statistically significant.

RESULTS

At the end of the experiment, morphological analysis of the TA muscle from animals of the injured group presented muscle fibers with several degrees of damage. Interstitial edema, inflammatory cell infiltrate, myofibrillar disorganization and degeneration were observed, characterizing muscle cell necrosis. Some small basophilic muscle fibers with a central nucleus were observed in the lesion area. In the injured/LLLT group there was decreased edema, less intense inflammation and muscle cell necrosis and small basophilic muscle fibers with a central nucleus were more frequent in comparison to the cryoinjured group which did not receive treatment with the laser (Fig. 2 A and B). In the control group, morphological sections showed muscle fibers with a normal aspect, polygonal in shape and acidophilic cytoplasm. The nuclei were in the periphery of muscle fibers and these were well organized and distributed in fascicles by connective tissue of endomysium and perimysium (Fig. 2C).

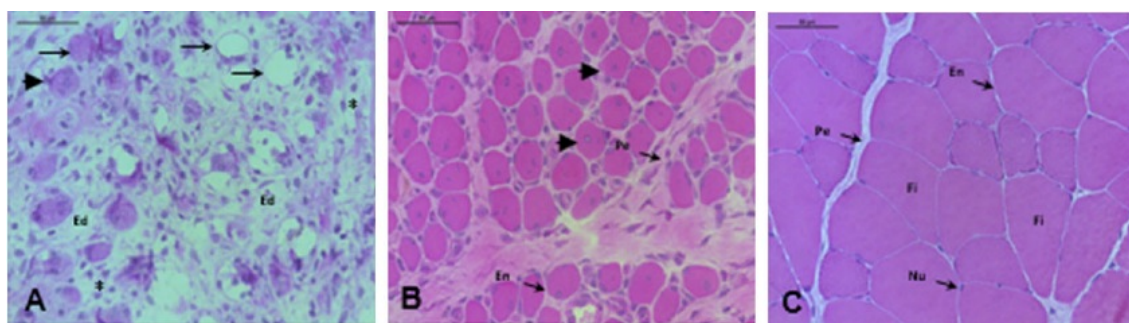


Figure 2. Cross-sections of the Tibialis anterior muscle stained with H&E. A: Injured group (I); B: Injured and laser treated group (Injured/LLLT). Interstitial edema (Ed), inflammatory cell infiltrate (*) and fiber degeneration (arrow) more intense in the injured group. Note the small basophilic muscle fibers, with more frequent central nucleus (arrow head) in the injured and laser treated group; connective tissue of endomysium (En) and perimysium (Pe). C: Control Group with muscle presenting normal morphological pattern: polygonal muscle fibers (Fi) with nuclei in the periphery (Nu), connective tissue of endomysium (En) and perimysium (Pe).

The percentage of muscle fibers in the degeneration process was low in the injured/LLLT group compared to the injured group. However, the percentage of muscle fibers in the regeneration process was high in the injured/LLLT group compared to the injured group (Fig.3).

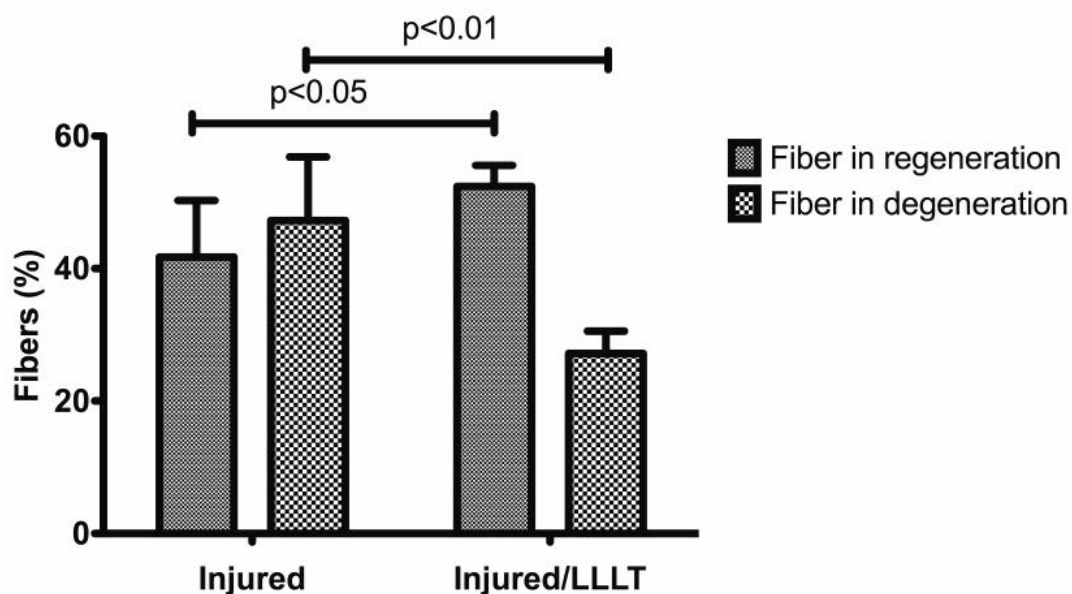


Figure 3. The percentage of muscle fibers in the process of regeneration and degeneration were determined using Image Analysis System Software (Leica, Germany) in the Injured (I) and Injured laser treated (Injured/LLLT) groups.

The control group exhibited normal distribution of the collagen in the endomysium and perimysium regions (Fig. 4C). In both the injured and injured/LLLT groups, the collagen in the lesion area had increased and was disorganized in bundles arranged in a compact form (Fig. 4A and B).

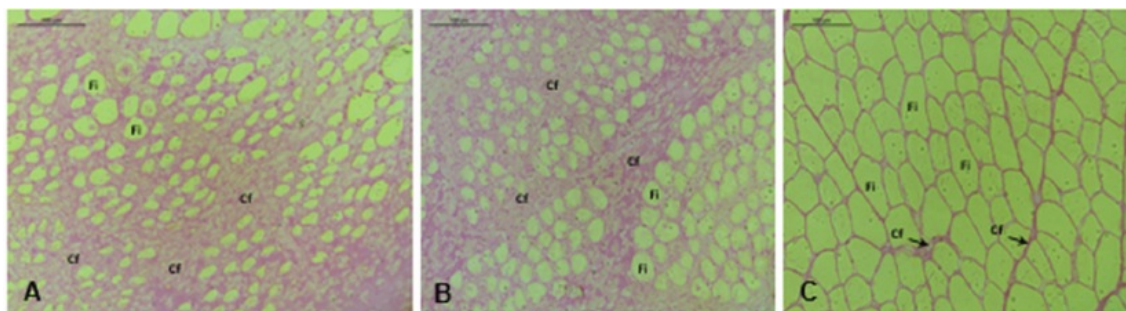


Figure 4. Cross-sections of the Tibialis anterior muscle stained by Picrosirius Red. Figures illustrating images used to quantify the percentage of the collagen area of the extracellular matrix using Image Analysis System Software (Leica, Germany). Collagen Fibers (Cf); muscle fibers (Fi). A: Injured Group (I); B: Injured and laser treated group (Injured/LLLT); C: Control Group.

The collagen percentage in the lesion area in both the injured and injured/LLLT groups increased, by 57.3% and 63.6%, respectively, compared with the control group ($P < 0.05$). However, the percentage of collagen in the injured/LLLT group decreased 17.4% compared with the injured group. (Fig.5).

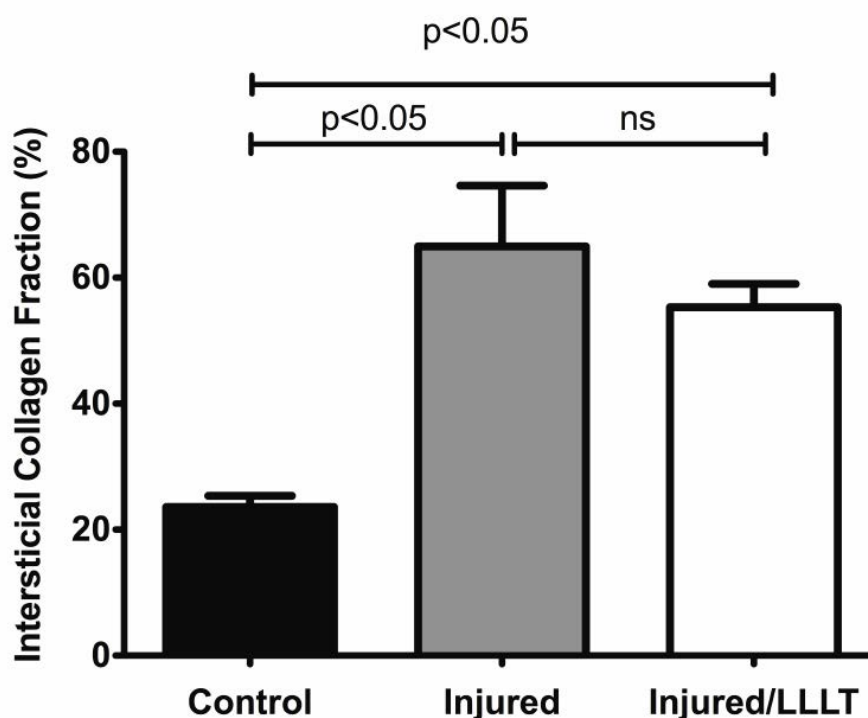


Figure 5. The percentage areas of interstitial collagen were determined using Image Analysis System Software (Leica, Germany) in the control (C), injured (I) and injured laser-treated (Injured/LLLT) groups. ns – not significant.

The expression of TGF- β increased in both the injured and injured/LLLT groups, 36% and 57%, respectively, when compared to the control group ($p<0.05$). Furthermore, there was no significant difference between the injured treated group and the injured untreated group (Fig. 6). Regarding the expression of TNF- α , a decrease (51.4%) was observed in the injured/LLLT group compared to the injured group ($p<0.05$). The injured group showed an increase of 37.5% in the expression of TNF- α compared to the control group, but there was no significant difference between groups. (Fig.7).

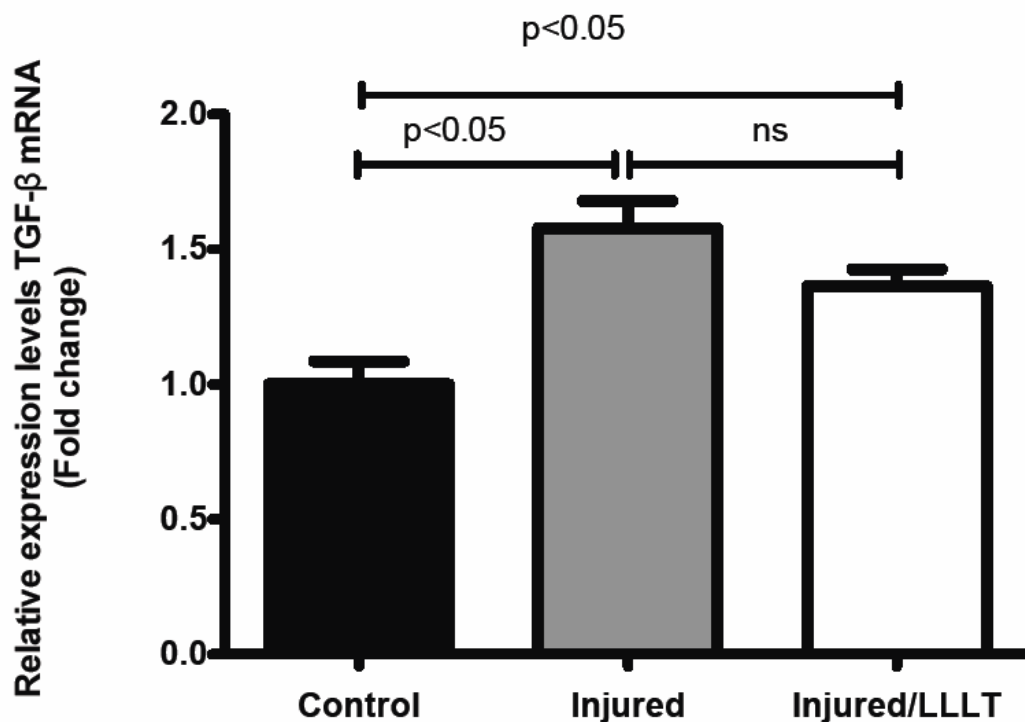


Figure 6. Expression levels of TGF- β mRNA estimated by RT-qPCR in rat tibialis anterior muscle from the control(C), injured (I), and injured laser-treated (injured/LLLT) groups normalized to peptidylprolyl isomerase A (PpIa) and peptidylprolyl isomerase B (PpIb) expression. Data are expressed as fold change (mean $\pm$ SD, $n = 10$) relative to control group expression level. ns - not significant.

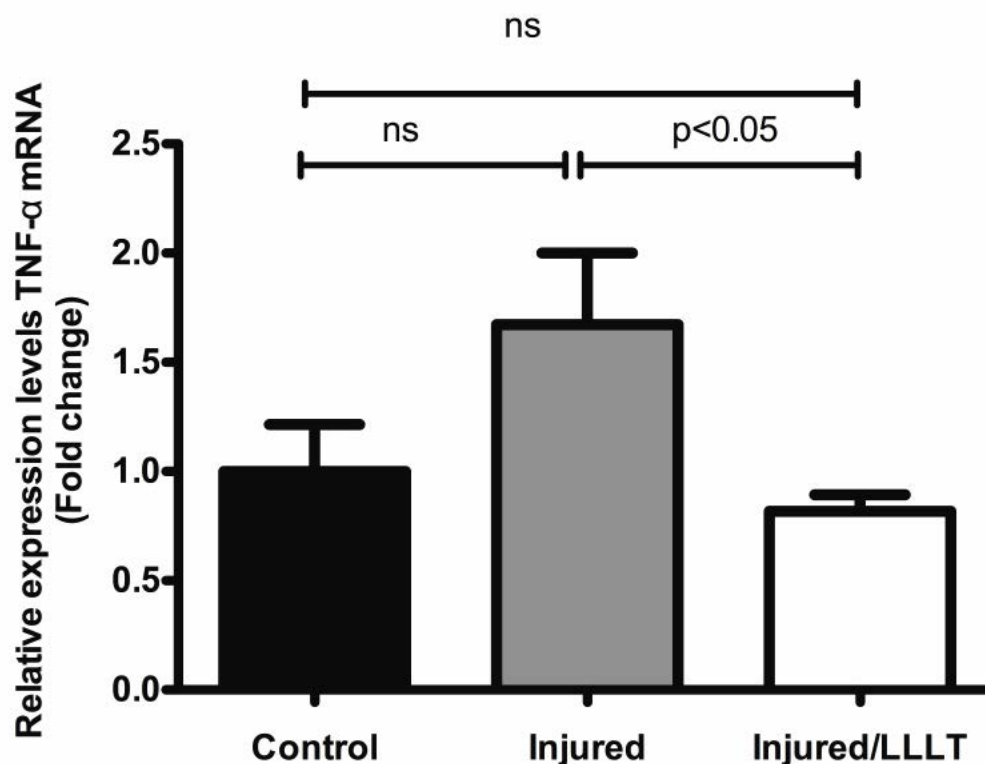


Figure 7. Expression levels of TNF- α mRNA estimated by RT-qPCR in rat tibialis anterior muscle from the control(C), injured (I), and injured laser-treated (injured/LLLT) groups normalized to peptidylprolyl isomerase A (PpIa) and peptidylprolyl isomerase B (PpIb) expression. Data are expressed as the fold change (mean $\pm$ SD, n = 10) relative to the control group expression level. ns – not significant.

The mRNA expression of MyoD was lower in both the injured and injured/LLLT groups, 67% and 57%, respectively compared to the control group ($p < 0.05$); however, there was no significant difference between the injured groups (treated and untreated) (Fig.8). The mRNA expression of Myogenin was higher in both the injured and injured/LLLT groups, 40.8 % and 53.3 %, respectively, compared to the control group ($p < 0.05$). In addition, the expression of Myogenin in the injured group was higher (24.2%) compared to the injured/LLLT group ($p < 0.05$) (Fig.9).

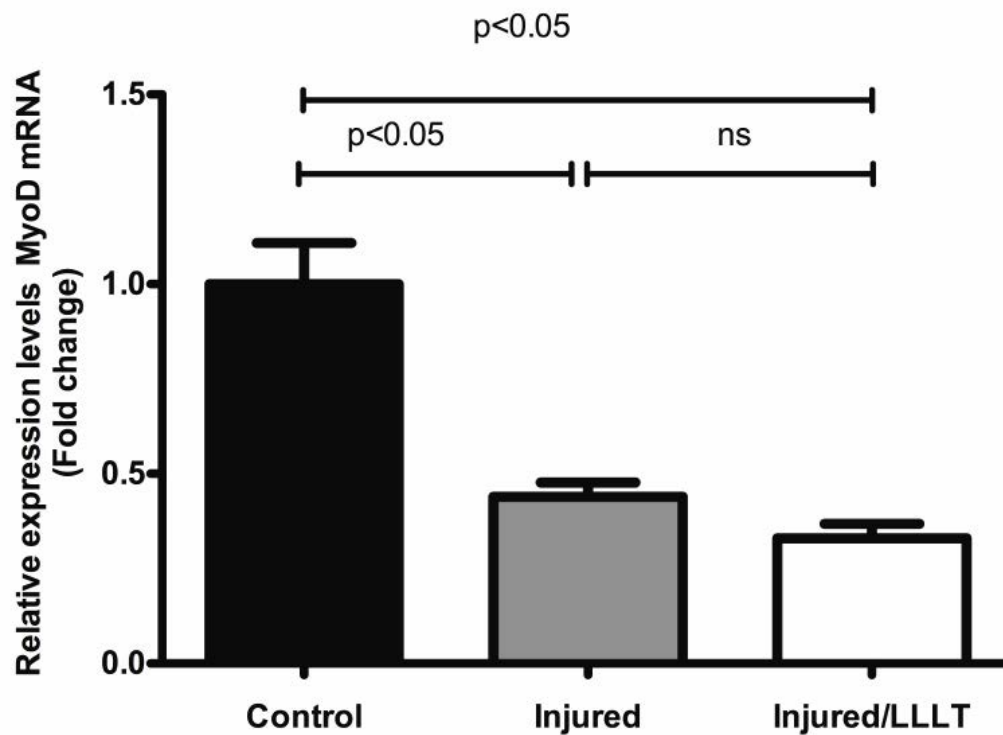


Figure 8. Expression levels of MyoD mRNA estimated by RT-qPCR in rat tibialis anterior muscle from the control(C), injured (I), and injured laser-treated (injured/LLLT) groups normalized to peptidylprolyl isomerase A (PpIa) and peptidylprolyl isomerase+ B (PpIb) expression. Data are expressed as fold change (mean $\pm$ SD, n = 10) relative to control group expression level. ns - not significant.

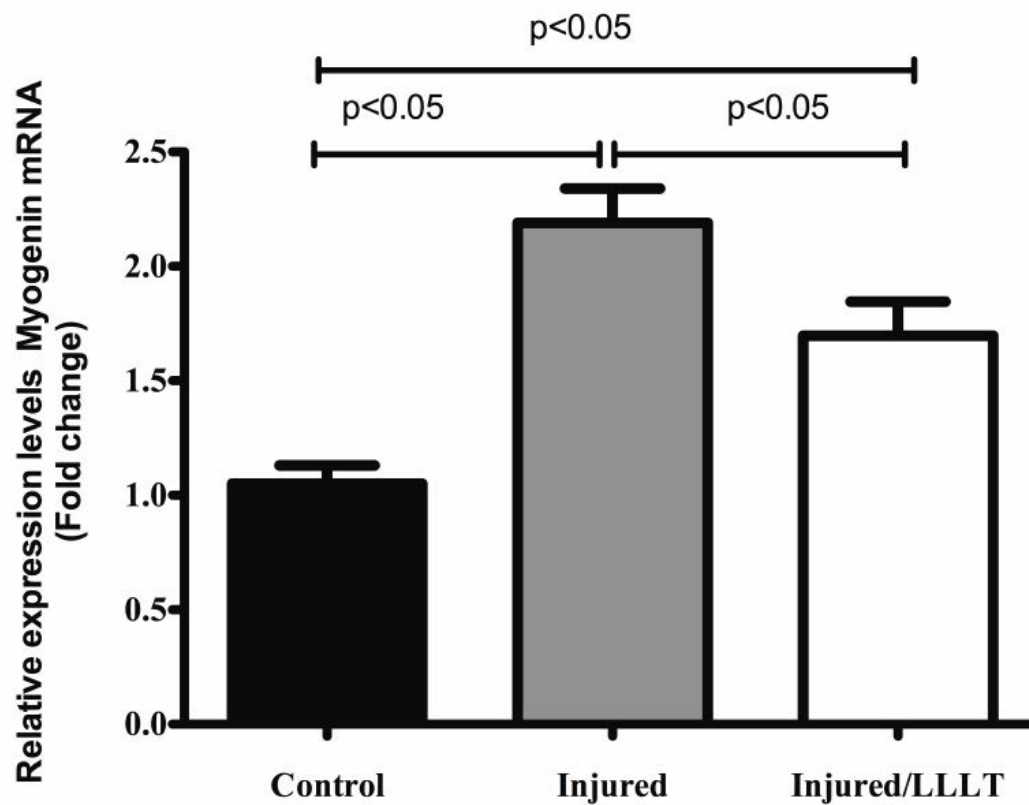


Figure 9. Expression levels of myogenin mRNA estimated by RT-qPCR in rat tibialis anterior muscle from the control(C), injured (I), and injured laser-treated injured/LLLT) groups normalized to peptidylprolyl isomerase A (PpIa) and peptidylprolyl isomerase B (PpIb) expression. Data are expressed as fold change (mean $\pm$ SD, n = 10) relative to control group expression level. ns - not significant.

DISCUSSION

The present experiment showed that treatment with a GaAS laser (904 nanometers, 50mW), at a high final energy of 4.8 Joules, applied for 5 consecutive days to the TA muscle after cryoinjury, promoted an increase in the number of regenerating fibers (20.3%), a decrease in the number of degenerating fibers (55.5%) and a decrease in the gene expression of TNF- α and Myogenin, but did not change the collagen percentage and TGF- β gene expression, compared with the TA injured that was not treated with the laser.

The World Association of Laser Therapy for humans recommends final energy use of 2-4 J. The study of Silva et al., 2012 was considered as high energy (3.0 Joules). Other studies using the same type laser (GaAs) final energy varied between 0.04 to 3.0 Joules (24, 30-34). Therefore, it is appropriate to use the term high end power compared to previous studies.

Several experimental studies have demonstrated the effectiveness of different types of lasers on the process of muscle regeneration, and the majority of these studies assessed their effect on the expression of inflammatory markers, growth factors, collagen synthesis and angiogenesis (37, 42-45). Moreover, a laser has also been used in the treatment of articular inflammatory processes (46); preventing the progression of muscle changes in Duchenne Muscular Dystrophy (30) and the expression of inflammatory mediators in tendonitis (47).

Although research has shown that laser therapy is an excellent therapeutic option for the treatment of different types of tissues, the results are dependent on the irradiation parameters, periods of treatment and analysis (15). Considering the types of lasers, different parameters (wavelength, power, beam diameter, irradiation time, energy

density and treatment protocols) have been used to analyze the benefits. The final energy radiated in the majority of these studies, with different laser types, varied from 0.4 to 9 Joules, although the more common energy used was between 1.4 and 2.0 Joules (48). In a study using a GaAs laser which compared the effects of two final energies (1.5 and 3.0 Joules), applied for 5 consecutive days, with the first application 3 days after TA injury induced by myotoxin showed that treatment at a final energy of 3.0 Joules, was an effective method for improving muscle regeneration (28). In the present study the GaAs laser (904 nanometers, 50mW), was also shown to be effective in the muscle regeneration process using a higher final energy (4.8 Joules). This result denotes the fact that although the effects of laser therapy on tissue is dose-dependent, for the GaAs laser, a higher final energy (4.8 Joules) can be positive in accelerating muscle recovery without changing the collagen of the extracellular matrix.

In our study, the histological analysis of the cryoinjured tibialis anterior muscle after five consecutive applications of the Gallium Arsenide laser, showed more regenerating fibers, with central nuclei, less degenerating fibers (quantitative analysis) and decreased edema and inflammatory infiltrate (qualitative analysis), in the injured laser treated group compared with the injured untreated group. Brunelli et al (49) using a Gallium Aluminum Arsenide laser (780 nanometers, 20mW and 40mW), at doses of 10 J/cm² and 50 J/cm² (0.4 Joules to 2.0 Joules, respectively) for 7 days from the injury of the TA muscle, showed a decrease in the inflammatory infiltrate and organization of muscle tissue in both treatment groups compared to the injured control group. Alves et al (48) also showed a reduction in edema and myonecrosis in the tibialis anterior muscle of an injured group treated with a Gallium Aluminum Arsenide laser (780 nanometers, 40mW), with a dose of 10 J/cm² (0.4 Joules applied to 8 points of the injured area,

totaling 3.2 Joules), after 6 consecutive applications. Muscle fibers presented a higher degree of maturity, being polygonal with peripheral nuclei. Based on these studies we can infer that, in general, laser treatment using low final energy doses is not as efficient in promoting muscle regeneration. Our results corroborate this idea since the high final energy dose improved TA muscle regeneration.

Muscle regeneration is a complex event and involves the activation, proliferation and differentiation of satellite cells (SCs), and, depending on the degree of muscle damage, the SCs will either form new muscle fibers or fuse to the damaged fibers so that muscle repair occurs (50). This process is mediated by the myogenic regulatory factors (MRFs), including MyoD and Myogenin which are related to the proliferation and differentiation of SCs, respectively (51).

After five consecutive applications of the GaAs laser (904 nm, 50mW), with a final energy of 4.8 Joules, for 7 days after cryoinjury of the TA muscle, in our experiment, the expression of MyoD decreased significantly in both the injured and injured/LLLT groups compared to the control group. However, there was no significant difference between the injured groups. The Myogenin expression was also higher in both injured and injured/LLLT groups, compared to the control group. However, the Myogenin expression in the injured/LLLT was significantly lower compared to the injured groups.

Rodrigues et al (52) using an Indium Gallium Aluminum Phosphorus laser (660 nm, 20mW and 40mW), at doses of 10 and 50 J/cm² (0.4 Joules and 2.0 Joules, respectively) showed that at 7 days from cryoinjury of the TA muscle, the treatment with the dose of 50 J/cm² promoted an increase in the MyoD gene expression compared to the control group and the injured group treated with the dose of 10 J/cm². The

expression of Myogenin was lower in both the treated groups compared to the control group. The authors suggest that the laser had a positive effect on muscle lesion predominantly with the dose of 50 J/cm² (2.0 Joules). Silva et al (28) also compared the effect of two doses (1.5 Joules and 3.0 Joules; 904 nm, 5mW) of a Gallium Arsenide laser, applied for 5 consecutive days after 3 days of myotoxin injury to the TA muscle but did not observe changes in the MyoD gene expression in either treated group compared to the injured untreated group. However, the Myogenin gene expression decreased in the injured group treated with a dose of 3.0 Joules compared to the injured group treated with 1.5 Joules. Using morphological evaluation, the authors also observed an improvement in the muscle recovery in the injured group treated with a dose of 3.0 Joules, demonstrating a better effect of laser treatment with a high final energy level in accelerating the muscle recovery process.

MyoD is expressed rapidly 12 hours after injury and the peak expression is on the 3rd day after injury, while the expression of Myogenin tends to decrease starting from the 7th day after injury (53). In the present study, the low expression of MyoD in both the injured and injured/LLLT groups may be related to the evaluation period being 7 days after injury, as the peak expression of MyoD probably occurred before this. However, in this period, a low level of Myogenin expression in the injured/LLLT group compared to the injured group could indicate that the laser treatment may have accelerated the cellular differentiation process during muscle regeneration. These data are consistent with the histological findings in this study, suggesting that laser treatment (final energy 4.8 Joules) presented a better effect on the muscle regeneration process.

The TNF- α gene expression in the present study significantly decreased in the injured/LLLT group compared with the injured group. After muscle injury, an

inflammatory process occurs, characterized by muscle fiber degeneration, proliferation of inflammatory cells (neutrophils and macrophages) and the release of inflammatory cytokines, among them TNF- α (54). Although the results involving cytokine levels during muscle recovery using laser treatment present variation depending on the irradiation parameters, periods of treatment and analysis (15), in general, laser treatment promotes a decrease in TNF- α (37, 55, 42, 30). This cytokine plays an important role during muscle regeneration contributing to satellite cells (SC) proliferation, differentiation and fusion to form myotubes to repair the muscle fibers (53), and, in this study, probably contributed to effectively reducing the inflammatory process, benefiting muscle regeneration in the injured muscle treated with the GaAs laser (final energy 4.8 Joules).

Collagen content increased significantly in the lesion area of both the injured and injured/LLLT groups (57.3%) compared to the control group (63.6%) in the present experiment. In addition, in the injured/LLLT, the collagen percentage was 17.4% lower than that of the injured group, although this data was not statistically significant. It is well known that laser therapy treatment can accelerate tissue healing by improving collagen organization or synthesis (56, 48, 57, 24, 45). Silveira et al (24) using a GaAs laser (904 nanometers, 40mW), at a dose of 5 J/cm² (0.5 Joules), observed that in the injured group treated with the laser there was a significant reduction in collagen synthesis, by measuring the amino acid hydroxyproline.

Collagen constitutes an important component of the muscle extracellular matrix and plays an important role in the maintenance of muscle contractile function (54, 58 59). During muscle regeneration, collagen remodeling occurs through the increase of collagen synthesis (60-62). In addition, MMPs play an important role in the homeostasis

and maintenance of myofiber functional integrity by breaking down the extracellular matrix and regulating skeletal muscle regeneration (61). Alves et al (48) using a GaAlAs laser (780 nanometers, 40mW), at a dose of 10 J/cm² (0.4 Joule), totaling 3.2 Joules, observed that this laser had a positive effect on the MMP2 activity and collagen organization and distribution in the repair process of rat skeletal muscle.

In the current study, the increase in collagen content in both injured and injured/LLLT groups compared to the control group was accompanied by an increase in the TGF- β gene expression. TGF- β is believed to play an important role in modulating the synthesis and remodeling of the extracellular matrix through the activation of collagenases and gelatinases (54, 63, 64, 3).

Several studies involving tissue regeneration using low-level laser therapy (LLLT) (final energy of 1.4 and 1.6 Joules) have shown that the laser was effective in decreasing the expression of TGF- β in muscles (37, 44) and tendons (47). In view of this data, and based on our results, we can infer that the GaAs laser at a high final energy (4.8 Joules) was not effective at inducing a decrease in gene expression of TGF- β in the injured muscle, fact that may have contributed to the non-collagen remodeling.

However, although the study design described here has proven useful to better understand the effect of laser therapy on muscle fiber and extracellular matrix recovery after injury, some limitations must be considered. First, the biological implications of the mRNA expression profiles and their impact on signaling pathways cannot be determined with confidence using only RT-qPCR analysis. In addition, while the functionality of individual mRNAs is measurable, this measure is intricately linked to the protein expression and activity. Thus, whether the laser treatment used reflects a direct or indirect effect on the mRNA changes, or whether this is related to the

modulation of transcriptional and posttranslational factors that amplify systemic changes caused by laser treatment, cannot be distinguished. In view of this future studies need to be conducted to better understand the molecular mechanisms involved with the effects of laser therapy on muscle fiber and extracellular matrix recovery.

Although some research suggests that laser treatment can promote better collagen organization in the muscle extracellular matrix, influencing muscle fiber regeneration by promoting the degradation of the basement membrane collagen IV and other components of the extracellular matrix, (48, 61), based on our results, we can conclude that laser therapy using a GaAs laser, using high final energy (4.8 Joules) promoted muscle recovery without changing the collagen remodeling in the muscle extracellular matrix.

REFERENCES

1. Bedair, H.S., A. M. Ho, F. H. Fu and J. Huard (2004) Skeletal muscle regeneration: an update on recent findings. *Curr. Orthop. Pract.* 15, 360-363.
2. Anderson, J.E. (2006) The satellite cell as a companion in skeletal muscle plasticity: currency, conveyance, clue, connector and colander. *The Journal of experimental biology.* 209, 2276-2292.
3. Huard, J, L. Young, F and F. H. Fu (2002) Muscle injuries and repair: current trends in research. *J Bone Joint Surg Am.* 84, 822–832.
4. Zanou, N and P. Gailly (2013) Skeletal muscle hypertrophy and regeneration: interplay between the myogenic regulatory factors (MRFs) and insulin-like growth factors (IGFs) pathways. *Cell Mol Life Sci.* 70, 4117- 4130.
5. Tidball, J.G. (2005) Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 288, 345– 353.
6. Dimauro, I., G. Loredana, F. Simona., F. Cristina, M. Neri, S. R. Silvia, G. Stefano., G. Alessia Di, C. Daniela, P. Fabio and B. Paolo (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.* 9. 1 – 13.
7. Pereira, M.C., C. B. de Pinho, A. R. P. Medrado, Z. A. Andrade and S.R.A Reis (2010) Influence of 670 nm low-level laser therapy on mast cells and vascular response of cutaneous injuries. *J Photochem Photobiol B Biol* 98,188–192.
8. Brandan, E and J. Gutierrez (2013) Role of proteoglycans in the regulation of the skeletal muscle fibrotic response. *The FEBS J.* 280, 4109 – 4117.
9. Kollias, H.D and J.C. McDermott (2008) Transforming growth factor beta and myostatin signaling in skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 104, 579–587.

10. Chargé, S. B. P and M. A. Rudnicki (2004) Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev.* 84, 209–238
11. Palmer, C.M and M. A. Rudnicki (2003) The myogenic regulatory factors. *Adv. Dev. Biol.Biochem.* 11, 1–32.
12. Piedade, M.C.B., M.S. Galhardo, C.N. Battlehner, M.A. Ferreira, E.G. Caldini and O.M.S de Toledo (2008) Effect of ultrasound therapy on the repair of gastrocnemius muscle injury in rats. *Ultrasonics.* 48, 403–411.
13. Markert, C.D., M.A. Merrick, T.E. Kirby and S.T. Devor (2005) Nonthermal ultrasound and exercise in skeletal muscle regeneration. *Nonthermal ultrasound and exercise in skeletal muscle regeneration. Arch. Phys. Med. Rehabil.* 86,1304 – 1310.
14. Cressoni, M. D.C., H. H. K. D. Giusti, R. A. Casarotto and C. A. Anaruma (2008) The Effects of a 785-nm AlGaInP Laser on the Regeneration of Rat Anterior Tibialis Muscle After Surgically-Induced Injury. *Photomed Laser Surg.* 26,461–466.
15. Alves, A.N., K.P.S. Fernandes, A.M. Deana, S.K. Bussadori and R.A Mesquita-Ferrari (2014) Effects of Low-Level Laser Therapy on Skeletal Muscle Repair: A Systematic Review. *Am J Phys Med Rehabil.* 93, 1073 – 1085.
16. D. Pastore, M. Greco, S. Passarella (2000) Specific helium–neon laser sensitivity of the purified cytochrome c oxidase, *Int. J. Radiat. Biol.* 6, 863–870.
17. Karu, T. (1999) Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *J. Photochem. Photobiol. Biol.* 49, 1-17.

18. Grossman, N., N. Schneid, H. Reuveni, S. Halevy and R. Lubarty (1998) 780 nm low power diode laser irradiation stimulates proliferation of keratinocyte cultures: involvement of reactive oxygen species, *Lasers Surg. Med.* 22, 212–218.
19. Hallen, S., P. Brzezinski (1994) Light-induced structural changes in cytochrome c oxidase: implication for the mechanism of electron and proton gating, *Biochim. Biophys. Acta.* 1184, 207–218.
20. Renno, A.C,M A., P. A. McDonnell, N. A. Parizotto and E.L. Laakso (2007). The effects of laser irradiation on osteoblast and osteosarcoma cell proliferation and differentiation in vitro. *Photomed. Laser Surg.* 25, 275 –280.
21. Dortbudak, O., R. Hass and G.Mailath-Pokorny (2000) Biostimulation of bone marrow cells with a diode soft laser *Clin. Oral Implants Res.* 16, 540–545.
22. Silva, J.P., M.A. Silva, A.P.F. Almeida, I.L. Júnior and A.P. Matos (2010) Laser Therapy in the Tissue Repair Process: A Literature Review. *Photomed Laser Surg.* 28, 17-21.
23. Martignago, C. C. S., R. F. Oliveira, D. A. A. Pires-Oliveira, P. D. Oliveira, C.S. Pacheco, P.S. Monzani and R.S. Poli-Frederico (2014) Effect of low-level laser therapy on the gene expression of collagen and vascular endothelial growth factor in a culture of fibroblast cells in mice. *Lasers Med Sci.* 30, 203 – 208..
24. Silveira, P.C.L., L. A. Silva, C.A. Pinho, P.S. Souza, M.M. Ronsani., D. Scheffer and R.A. Pinho (2013) Effects of low-level laser therapy (GaAs) in an animal model of muscular damage induced by trauma. *Lasers Med Sci.* 28, 431–436
25. Enwemeka, C.S. (2009) Intricacies of dose in laser phototherapy for tissue repair and pain relief. *Photomed. Laser Surg.* 27, 387-393.

26. Fukuda T.Y and C.A. Malfatti (2008) Analysis of low-level laser therapy doses in Brazilian equipment. *Rev. Bras. Fisioter.* 12, 70 – 74.
27. World Association of Laser Therapy (WALT) (2006) Consensus agreement on the design and conduct of clinical studies with low-level laser therapy and light therapy for musculoskeletal pain and disorders. *Photomed Laser Surg.* 24, 761–762.
28. Silva, L.H., M.T. Silva, R.M. Gutierrez, T.C. Conte, C.A. Toledo, M.S. Aoki, R.E. Liebano and E.H. Miyabara (2012) GaAs 904-nm laser irradiation improves myofiber mass recovery during regeneration of skeletal muscle previously damaged by crotoxina. *Lasers Med Sci*, 27, 993–1000.
29. Oliveira, N.M.L., N. A. Parizzotto and S.F.Tania (1999) GaAs (904-Nm) Laser Radiation Does Not Affect Muscle Regeneration in Mouse Skeletal Muscle. *Lasers in Surgery and Medicine.* 25, 13–21.
30. Leal-Júnior, E.C.P., P. de Almeida., S.S. Tomazini., P.T.C. de Carvalho., R.A. Ivaro., B.F. Lopes-Martins.,J. Joenssens.,M.I. Johnson and J.M. Bordjal (2014) Superpulsed Low-Level Laser Therapy Protects Skeletal Muscle of mdx Mice against Damage, Inflammation and Morphological Changes Delaying Dystrophy Progression. *PLOS ONE* | www.plosone.org, V, 9, 3 e89453
31. Sousa, E. A, J. A.H.M. Bittencourt, N. K.S. de Oliveira, S. V. C. Henriques, L. C.S.Picanço, C. P. Lobato, J. R. Ribeiro, W. L. A. Pereira, J.C.T. Carvalho and J.O. da Silva (2013) Effects of a low-level semiconductor gallium arsenide laser on local pathological alterations induced by *Bothrops moojeni* snake venom. *Photochem. Photobiol. Sci.* 12, 1895–1902

32. Dourado, D. M., S. F. R. Matias, P.T.C. Carvalho and M. A.C.Hofling (2011) Low-level Laser Therapy Promotes Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 Expression in Endothelial and Nonendothelial Cells of Mice Gastrocnemius Exposed to Snake Venom. *Photochemistry and Photobiology*. 87, 418–426.
33. Rizzi, C. F., J. L.Mauriz, D. S. F. Correa, A. J. Moreira, C.G. Zettler, L. I. Filippin, N.P. Marroni, and J.G. Iez-Gallego (2006) Effects of Low-Level Laser Therapy (LLLT) on the Nuclear Factor (NF)- κ B Signaling Pathway in Traumatized Muscle. *Lasers in Surgery and Medicine*. 38,704–713
34. Fillipin, L. I., J. L. Mauriz, K. Vedovelli, A. J. Moreira, C.G.Zettler, O. Lech, N.P. Marroni, and J. G. Iez-Gallego (2005). Low-Level Laser Therapy (LLLT) Prevents Oxidative Stress and Reduces Fibrosis in Rat Traumatized Achilles Tendon. *Lasers in Surgery and Medicine*. 37,293–300
35. Clark, J.D., G.F. Gebhart, J.C. Gonder, M.E. Keeling, D.F. Kohn (1997) The 1996 Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. *ILAR J*.38, 41–48.
36. Myabara E.H., J.L. Martin., T.M. Griffin., A.S. Moriscot and R. Mestril (2006) Overexpression of inducible 70-K Da heat shock protein in mouse attenuates skeletal muscle damage induced by cryolesioning. *Am J Physiol Cell Physiol*. 290, 1128 - 1138.
37. Assis, L., A.I.S. Moretti, T.B. Abrahão, H.P. Souza, M.R. Hamblim and N.A. Parizzoto (2012) Low-level laser therapy (808 nm) contributes to muscle regeneration and prevents fibrosis in rat tibialis anterior muscle after cryolesion. *Lasers Med Sci*. 28, 947-955.

38. Morrone G., G.A. Guzzardella, L. Orienti L, G. Giavaresi, M. Fini, M. Rocca, P. Torricelli, L. Martini and R. Giardino (1998) Muscular trauma treated with a Ga-Al-As diode laser: in vivo experimental study. *Lasers Med Sci* 13, 293–298
39. Calvi, E.N., F.X. Nahas, M.V. Barbosa, J.A. Calil, S.S. Ihara., M.S. Silva, M.F. Franco and L.M. Ferreira (2012) An experimental model for the study of collagen fibers in skeletal muscle. *Acta Cir Bras.* 27, 681-686.
40. Livak, K. J. and T.D. Schmittgen. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T) Method. *Methods.* 25, 402-8.
41. Vandesompele, J., K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe and F. Speleman (2002) Accurate normalization of Real-Time quantitative RT-PCR by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3, 34. 1-34.11.
42. Almeida, P., R.A.B. Lopes-Martins, S.S. Tomazoni, G.M. Albuquerque-Pontes, L.A.Santos, A. A. Vanin, L. Frigo, R. P. Vieira, R. Albertini., P.T.C. de Carvalho and E. C. P. Leal-Junior (2013) Low-Level Laser Therapy and Sodium Diclofenac in Acute Inflammatory Response Induced by Skeletal Muscle Trauma: Effects in Muscle Morphology and mRNA Gene Expression of Inflammatory Markers. *Photochemistry and Photobiology.* 89, 501–507.
43. Souza, T.O.F., D. A. Mesquita, R.A. Mesquita-Ferrari, D.S.P, Júnior, L. Correa, S.K. Bussadori., K. P. S. Fernandes and M. D. Martins (2011) Phototherapy with low-level laser affects the remodeling of types I and III collagen in skeletal muscle repair. *Lasers Med Sci.* 26, 803–814.

44. Mesquita-Ferrari, R.A., M.D. Martins, J.A.S. Júnior., T.D. da Silva., R.F. Piovesan, V.C.S. Pavesi, S.K. Bussadori and K. P. S. Fernandes (2010) Effects of low-level laser therapy on expression of TNF- α and TGF- β in skeletal muscle during the repair process. *Lasers Med Sci.* 26, 335-340.
45. Baptista, J., M.D. Martins, V.C.S. Pavesi, S.K. Bussadori, K.P.S. Fernandes, D.S.P. Júnior and R.A. Mesquita-Ferrari (2010) Influence of Laser Photobiomodulation on Collagen IV During Skeletal Muscle Tissue Remodeling After Injury in Rats. *Photomedicine and Laser Surgery.* 29,1-7
46. Santos, S. A., A. C A. Alves, E. C. P. Leal-Junior, R. Albertini, R. P. Vieira, A.P. Ligeiro, J. A. S. Junior and P.T.C. de Carvalho (2014). Comparative analysis of two low-level laser doses on the expression of inflammatory mediators and on neutrophils and macrophages in acute joint inflammation. *Lasers Med Sci.* 29, 1051–1058.
47. Pires, D., M. Xavier, T. Araújo, J. A. S. Júnior, F. Aimbire and R. Albertini (2011) Low-level laser therapy (LLLT; 780 nm) acts differently on mRNA expression of anti- and pro-inflammatory mediators in an experimental model of collagenase-induced tendinitis in rat. *Lasers Med Sci.* 26,85–94
48. Alves, A. N., K. P. S. Fernandes, C. A. V. Melo, R. Y. Yamaguchi, C. M. França, D. F. Teixeira, S. K. Bussadori, F. D. Nunes and R. A. Mesquita-Ferrari (2014) Modulating effect of low level-laser therapy on fibrosis in the repair process of the tibialis anterior muscle in rats. *Lasers Med Sci.* 29, 813–821
49. Brunelli, R. M., N. C. Rodrigues, D. A. Ribeiro, K. Fernandes, A. Magri, L. Assis, N. A. Parizotto, A. C. Júnior, A.C.M. Renno and D. C. C. Abreu (2014) The

- effects of 780-nm low-level laser therapy on muscle healing process after cryolesion. *Lasers Med Sci.* 29, 91–96
50. Ten Broek, R.W., S. Grefte, J.W.V. Den Hoff (2010) Regulatory factors and cell populations involved in skeletal muscle regeneration. *J Cell Physiol.* 224, 7–16.
 51. McKay, B. R., C. E. O'Reilly, S. M. Phillips, M. A. Tarnopolsky and G. Parise (2008) Co-expression of IGF-1 family members with myogenic regulatory factors following acute damaging muscle-lengthening contractions in humans. *J Physiol* 586.22. 5549–5560.
 52. Rodrigues, N. C., R. Brunelli, H. S. S. de Araújo, N. A. Parizotto and A. C. M. Renno (2013) Low-level laser therapy (LLLT) (660 nm) alters gene expression during muscle healing in rats. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* 120, 29–35.
 53. Tidball J.G and S.A. Villalta (2010) Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 298. 1173–1187.
 54. Mann, O. J., E. Perdiguero, Y. Kharraz, S. Aguilar, P. Pessina, A. L Serrano and P. Muñoz-Cánoves (2011) Aberrant repair and fibrosis development in skeletal muscle. *Skeletal Muscle.* 1, 1- 21
 55. Almeida, P., S. S. Tomazoni, L. Frigo, P.T.C.de Carvalho, A. A. Vanin, L. A. Santos, G. M. Albuquerque-Pontes, T. De Marchi, O.Tairova, R. L. Marcos, R. Á.B. Lopes-Martins and E. C. P. Leal-Junior (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, 653–658

56. Casalechi, H.L., A.C.F. Marques, E.A.P. da Silva, F. Aimbire, R.L. Marcos, R.A.B. Lopes-Martins, P.T.C. de Carvalho and R. Albertini (2014) Analysis of the effect of phototherapy in model with traumatic Achilles tendon injury in rats. *Lasers Med Sci.* 29, 1075–1081.
57. Guerra, F.R., C.P. Vieira, M.S. Almeida, L.P. Oliveira, A.A. de Aro and E.R. Pimentel (2013) LLLT improves tendon healing through increase of MMP activity and collagen synthesis. *Lasers Med Sci.* 28, 1281–1288.
58. Tang M., F. Zhou, W. Zhang, Z. Guo, Y. Shang, H. Lu, R. Lu, Y. Zhang, Y. Chen and M. Zhong (2011) The role of thrombospondin-1-mediated TGF- β 1 on collagen type III synthesis induced by high glucose. *Mol Cell Biochem.* 346,49–56
59. Kjaer, M (2004) Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. *Physiol Rev.* 84,649–698
60. Zemowaska, M., H.O. Krzysztof, M. Swierzynska, M. A. Ciemerych (2012) Decrease ofMMP-9 activity improves soleus muscle regeneration. *Tissue Eng Part A* 18:1–11.
61. Chen, X., Y. Li (2009) Role of matrix metalloproteinases in skeletal muscle: migration, differentiation, regeneration and fibrosis. *Cell Adhesion & Migration* 3,337–341.
62. Bellayr, I.H., X. Mu and Y. Li (2009) Biochemical insights into the role of matrix metalloproteinases in regeneration: challenges and recent developments. *Future Med Chem.* 1,1095–1111
63. Cencetti, F.B.C., P. Nincheri, C. Donati and P. Bruni (2010) Transforming growth factor-beta1 induces transdifferentiation of myoblasts into myofibroblasts via up-regulation of sphingosine kinase-1/S1P3 axis. *Mol Biol Cell.* 21, 1111–1124

64. Li, Y., W. Foster, B.M. Deasy, Y. Chan, V. Prisk, Y. Tang, J. Cummins and Huard, J (2004) Transforming growth factor-beta1 induces the differentiation of myogenic cells into fibrotic cells in injured skeletal muscle: a key event in muscle fibrogenesis. *Am J Pathol.* 164, 1007–1019.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

Abou-Khalil R, Brack AS (2010) Muscle stem cells and reversible quiescence: the role of sprouty. *Cell Cycle*. 9:2575–2580.

Albertini R, Aimbiere AB, Villaverde J, Silva JR, Costa MS (2007) COX-2 mRNA expression decreases in the subplantar muscle of rat paw subjected to carrageenan-induced inflammation after low level laser therapy. *Inflamm. Res*. 56 (6): 228-229.

Albertini R, Villaverde AB, Aimbiere F, Bjordal J, Brugnera A, Mittmann J, Silva JA, Costa M (2008) Cytokine mRNA expression is decreased in the subplantar muscle of rat paw subjected to carrageenan-induced inflammation after low-level laser therapy. *Photomed Laser Surg*. 26(1):19–24.

Adams V, Nehrhoff B, Spate U, Linke A, Schulze PC, Baur A, Gielen S, Hambrecht R, Schuler G (2002) Induction of iNOS expression in skeletal muscle by IL-1 β and NF κ B activation: An in vitro and in vivo study. *Cardiovasc Res*. 54(1):95–104.

Allbrook DB, Han MF, Hellmuth AE (1971) Population of muscle satellite cells in relation to age and mitotic activity. *Pathology* 3(3):223–243

Ahmad CS, Redler LH, Ciccotti MG, Maffulli N, Longo UG, Bradley J. Evaluation and management of hamstring injuries (2013). *Am J Sports Med*. 41(12):2933-47

Alonso JM, Edouard P, Fischetto G, Depiesse F, Mountjoy M (2012) Determination of future prevention strategies in elite track and field: analysis of Daegu 2011 IAAF Championships injuries and illnesses surveillance. *Br J Sports Med*. 46: 505–51.

Alves AN, Fernandes KP, Deana AM, Bussadori SK, Mesquita-Ferrari RA (2014) Effects of Low-Level Laser Therapy on Skeletal Muscle Repair: A Systematic Review. *Am J Phys Med Rehabil*. 93, 1073 – 1085.

Alves AN, Fernandes KP, Melo CA, Yamaguchi RY, França CM, Teixeira DF, Bussadori SK, Nunes FD, Mesquita-Ferrari RA (2014) Modulating effect of low level-laser therapy on fibrosis in the repair process of the tibialis anterior muscle in rats. *Lasers Med Sci*. 29: 813–821.

Assis L, Moretti AIS, Abrahão TB, Cury V, Souza HP, Hamblim MR, Parizzoto NA (2012) Low-Level Laser Therapy (808 nm) Reduces Inflammatory Response and Oxidative Stress in Rat Tibialis Anterior Muscle After Cryolesion. *Lasers in Surgery and Medicine* 44:726–735.

Assis L, Moretti AIS, Abrahão TB, Souza HP, Hamblim MR, Parizzoto NA (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(3):947-55.

Avni D, Levkovitz S, Maltz L (2005) Protection of skeletal muscle from ischemia/reperfusion injury by low energy laser irradiation. *Photomed. Laser Surg.* 23: 273–277.

Baptista JPT, Martins MD, Pavesi VCS, Bussadori SK, Fernandes KPS, Pinto Júnior DS, Mesquita-Ferrari RA (2010) Influence of Laser Photobiomodulation on Collagen IV During Skeletal Muscle Tissue Remodeling After Injury in Rats. *Photomedicine and Laser Surgery*.29 (1):11-7.

Bareja A, Billin AN (2013) Satellite cell therapy—from mice to men. *Skelet Muscle* 3(1):2.

Barnes PJ, Karin M (1997) Nuclear factor-kappaB: A pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 336(15):1066–1071.

Bentzinger CF, von Maltzahn J, Rudnicki MA (2010) Extrinsic regulation of satellite cell specification. *Stem Cell Res Ther* 1: 27.

Bentzinger CF, Wang YX, Rudnicki MA (2012) Building muscle: molecular regulation of myogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. Cite this article as *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 4:a008342.

Bibikova A, Oron U (1993) Promotion of muscle regeneration in the toad (*Bufo viridis*) gastrocnemius muscle by lowenergy laser irradiation. *Anat. Rec.* 235 (3): 374-380.

Bingöl U, Altan L, Yurtkuran M (2005) Low-power laser treatment for shoulder pain. *Photomed Laser Surg.* 23(5):459-64.

Bjornson CRR, Cheung TH, Liu L, Tripathi PV, Steeper KM, Rando TA (2012). Notch signaling is necessary to maintain quiescence in adult muscle stem cells. *Stem Cells* 30 (2): 232-242.

Bortone FSHA, Albertini RPJB, Costa MS, Silva JA (2008) Low level laser therapy modulates knin receptors mRNA expression in the subplantar muscle of rat paw subjected to carreageenan-induced inflammation. *Int Immunopharmacol.* 8 (2): 206-210.

Brunelli RM, Rodrigues NC, Ribeiro DA, Fernandes KPS, Magri A, Assis L, Parizotto NA, Júnior AC, Renno ACM, Abreu DCC (2014) The effects of 780-nm low-level laser therapy on muscle healing process after cryolesion. *Lasers Med Sci.* 29, 91–96

Buckingham M (2007) Skeletal muscle progenitor cells and the role of Pax genes. *Comptes rendus biologies*, 330(6-7), 530-3.

Buford TW, Cooke MB, Shelmadine BD, Hudson GM, Redd L, Willoughby DS. Effects of eccentric treadmill exercise on inflammatory gene expression in human skeletal muscle (2009) *Appl Physiol Nutr Metab.*34(4):745–753.

- Cafaro A, Albanese G, Arduino PG, Mario C, Massolini G, Mozzati M, Broccoletti R (2010) Effect of low-level laser irradiation on unresponsive oral lichen planus: early preliminary results in 13 patients. *Photomed Laser Surg.* 28 Suppl 2:S99-103.
- Calvi EN, Nahas FX, Barbosa MV, Calil JA, Ihara SS, Silva Mde S, Franco MF, Ferreira LM (2012) An experimental model for the study of collagen fibers in skeletal muscle. *Acta Cir Bras.* 27(10):681-6.
- Cantini M, Giurisato E, Radu C, Tiozzo S, Pampinella F, Senigaglia D, Zaniolo G, Mazzoleni F, Vitiello L (2002) Macrophage-secreted myogenic factors: a promising tool for greatly enhancing the proliferative capacity of myoblasts in vitro and in vivo. *Neurol Sci* 23:189–194.
- Cassano M, Quattrocchi M, Crippa S, Perini I, Ronzoni F, Sampaolesi M: Cellular mechanisms and local progenitor activation to regulate skeletal muscle mass (2009) *J Muscle Res Cell Motil*, 30:243-253.
- Chargé SB, Rudnicki MA (2004) Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev* 84(1):209-238.
- Chakkalakal JV, Christensen J, Xiang W, Tierney MT, Boscolo FS, Sacco A, Brack AS (2014) Early forming label-retaining muscle stem cells require p27kip1 for maintenance of the primitive state. *Development*. 141,1649-1659.
- Chazaud B, Sonnet C, Lafuste P, Bassez G, Rimaniol AC, Poron F, Authier FJ, Dreyfus PA, Gherardi RK (2003) Satellite cells attract monocytes and use macrophages as a support to escape apoptosis and enhance muscle growth. *J Cell Biol* 163:1133–1143.
- Chen SE, Jin B, Li YP (2007) TNF- α regulates myogenesis and muscle regeneration by activating p38 MAPK. *Am J Physiol Cell Physiol* 292: C1660–C1671.
- Christov C, Fabrice C, Rana A-K, Guillaume B, Grégoire V, Francois JA, Yann B, Vasily S, Shahrugim T, Benedicte C and Romain KG (2007) Muscle Satellite Cells and Endothelial Cells: Close Neighbors and Privileged Partners *Molecular Biology of the Cell*. 18: 1397–1409.
- Cicilliot S, Schiaffino S (2010) Regeneration of mammalian skeletal muscle. Basic mechanisms and clinical implications. *Curr Pharm Des* 16(8):906–914.
- Clark JD, Gebhart GF, Gonder JC, Keeling ME, Kohn DF (1997) The 1996 Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. *ILAR J* 38(1) 41–48.
- Cornelison DD, Olwin BB, Rudnicki MA, Wold BJ (2000) MyoD(-/-) satellite cells in single-fiber culture are differentiation defective and MRF4 deficient. *Dev Biol*. 15; 224(2):122-37.

Dal Pai M, Carvalho RF (2007) Mecanismos celulares e moleculares que controlam o desenvolvimento e o crescimento muscular. R. Bras. Zootec., 36, suplemento especial, 21-31.

De Almeida P, Lopes-Martins RÁ, Tomazoni SS, Silva JA Jr, de Carvalho Pde T, Bjordal JM, Leal Junior EC (2011) Low-level laser therapy improves skeletal muscle performance, decreases skeletal muscle damage and modulates mRNA expression of COX-1 and COX-2 in a dose-dependent manner. Photochem Photobiol. 87(5):1159-63.

De Almeida, P, Lopes-Martins RA, Tomazoni SS, Albuquerque-Pontes GM, Santos LA, Vanin AA, Frigo L, Vieira RP, Albertini R, de Carvalho PTC, Leal-Júnioe ECP (2013) Low-Level Laser Therapy and Sodium Diclofenac in Acute Inflammatory Response Induced by Skeletal Muscle Trauma: Effects in Muscle Morphology and mRNA Gene Expression of Inflammatory Markers. Photochemistry and Photobiology. 89: 501–507.

De Souza TOF, Mesquita, DA, Mesquita-Ferrari RA, Júnior DSP, Correa L, Bussadori, SK, Fernandes KPS, Marins MD (2011) Phototherapy with low-level laser affects the remodeling of types I and III collagen in skeletal muscle repair. Lasers Med Sci. 26:803–814.

De Sousa EA, Bittencourt JAHM, de Oliveira NKS, Henriques SVC, Picanço LCS Lobato CP, Ribeiro JR, Pereira WLA, Carvalho JCT, da Silva JO (2013) Effects of a low-level semiconductor gallium arsenide laser on local pathological alterations induced by Bothrops moojeni snake venom. Photochem. Photobiol. Sci. 12: 1895–1902.

Dortbudak O, Hass R, Mailath-Pokorny G (2000) Biostimulation of bone marrow cells with a diode soft laser Clin. Oral Implants Res. 16: 540–545.

Droge W (2002) Free radicals in the physiological control of cell function (2002) Physiol Rev. 82(1):47–95.

Duchesne E, Tremblay MH, Cote CH (2011) Mast cell tryptase stimulates myoblast proliferation; a mechanism relying on protease-activated receptor-2 and cyclooxygenase-2. BMC Musculoskelet Disord 12: 235.

Dumont NA, Wang YX, Rudnick MA (2015) Intrinsic and extrinsic mechanisms regulating satellite cell function. The Company of Biologists Ltd Development. 142: 1572-1581.

El-Remessy AB, Al-Shabrawey M, Platt DH, Bartoli M, Behzadian MA, Ghaly N, Tsai N, Motamed K, Caldwell RB (2009) Peroxynitrite mediates VEGF's angiogenic signal and function via a nitration-independent mechanism in endothelial cells. FASEB J 2007;21(10):2528–2539

Enwemeka CS (2009) Intricacies of dose in laser phototherapy for tissue repair and pain relief. Photomed. Laser Surg. 27:387-393.

Esnouf A, Wright PA, Moore JC, Ahmed, S (2007) Depth of penetration of an 850nm wavelength low level laser in human skin. *Acupunct. Electrother. Res.* 32: 81–86.

Fernandes KPS, Alves AN, Nunes FD, Souza NH, Silva JA Jr, Bussadori SK, Ferrari RA (2014) Effect of photobiomodulation on expression of IL-1 β in skeletal muscle following acute injury. *Lasers Med Sci.* 28(3):1043-6.

Freckleton G, Pizzari T (2013) Risk factors for hamstring muscle strain injury in sport: a systematic review and meta-analysis. *Br J Sports Med.* 47: 351–358.

Filippin LI, Cuevas MJ, Lima E, Marroni NP, Gonzalez-Gallego J, Xavier RM (2011) The role of nitric oxide during healing of trauma to the skeletal muscle. *Inflamm Res.* 60(4): 347–356.

Fukuda TY, Malfatti CA (2008) Analysis of low-level laser therapy doses in Brazilian equipment. *Rev. Bras. Fisioter.* 12: 70 – 74.

Freitas Filho GA, Da Silva MFR, Belleti MR, Machado ER, Da Silva NS (2006) Efeitos da Radiação Laser de Baixa Potência de Arsenieto de Gálio Alumínio (AsGaAl) de 785 nm sobre a Cicatrização de Lesão Muscular. *Revista UniVap.* 13: 53-60.

Galli SJ, Borregaard N, Wynn TA (2011) Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nat Immunol* 12: 1035–1044.

Gibbs BF, Wierecky J, Welker P, Henz BM, Wolff HH, Grabbe J (2001) Human skin mast cells rapidly release preformed and newly generated TNF-alpha and IL-8 following stimulation with anti-IgE and other secretagogues. *Exp Dermatol* 10: 312–320.

Grounds MD (2002) Reasons for the degeneration of ageing skeletal muscle: a central role for IGF-1 signalling. *Biogerontology* 3:19–24.

Gur A, Sarac AJ, Cevik R, Altindag O, Sarac S (2004) Efficacy of 904 nm gallium arsenide low level laser therapy in the management of chronic myofascial pain in the neck: a double-blind and randomize-controlled trial. *Lasers Surg Med.*35(3):229-35.

Harridge SD (2007) Plasticity of human skeletal muscle: gene expression to in vivo function. *Exp. Physiol.* 92:783-797.

Hawke TJ, Garry DJ (2001) Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol* 91: 534–551.

Hosoyama T, Nishijo K, Prajapati SI, Li G, Keller C. (2011) Rb1 gene inactivation expands satellite cell and postnatal myoblast pools. *J. Biol. Chem.*286: 19556-19564.

Huang YY, Chen AC, Carrol JD, Hamblim MR (2009) Biphasic Dose response in low level light therapy. *Dose Response.* 7: 358-383.

Huang YY, Sharma SK, Carroll J, Hamblin MR (2011) Biphasic Dose Response In Low Level Light Therapy – an Update. *Dose-Response*, 9:602–618.

Huard J, Li Y, Fu FH (2002) Muscle injuries and repair: Current trends in research. *J Bone Joint Surg Am*. 84:822-32.

Hughes SM, Taylor JM, Tapscott SJ, Gurley CM, Carter WJ, Peterson CA (1993) Selective accumulation of MyoD and Miogenin mRNAs in fast and slow muscle is controlled by innervation and hormones. *Development* 118: 1137-1147.

Ishigame H, Nakajima A, Saijo S, Komiyama Y, Nambu A, Matsuki T et al (2006) The role of TNFalpha and IL-17 in the development of excess IL-1 signaling-induced inflammatory diseases in IL-1 receptor antagonist-deficient mice. *Ernst Schering Res Found Workshop* 56:129–15.

Jarvinen TAH, Jarvinen TLN, Kaariainen M, Kalimo H, Jarvinen M (2005) Muscle injuries: Biology and treatment. *Am J Sports Med* 33 (5):745 – 64.

Jiao S, Ren H, Li Y, Zhou J, Duan C, Lu L (2013) Differential regulation of IGF-I and IGF-II gene expression in skeletal muscle cells. *Mol Cell Biochem* 373:107–113

Jovicić M, Konstantinović L, Lazović M, Jovicić V (2012) Clinical and functional evaluation of patients with acute low back pain and radiculopathy treated with different energy doses of low level laser therapy. *Vojnosanit Pregl*.69(8):656-62.

Kambadur R, Sharma M, Smith TP, Bass JJ (1997) Mutations in myostatin (GDF8) in double-musled Belgian Blue and Piedmontese cattle. *Genome Res*. 7:910-916.

Kaminski HJ, Andrade FH. Nitric oxide (2001) Biologic effects on muscle and role in muscle diseases. *Neuromuscul Disord*. 11(6–7):517–524.

Karu T (2007) *Ten Lectures on Basic Science of Laser Phototherapy*. Grä ngesberg, Sweden: Prima Books AB.

Kjaer M (2004) Role of Extracellular Matrix in Adaptation of Tendon and Skeletal Muscle to Mechanical Loading. *Physiol* 84: 649–698.

Kollias HD, McDermott JC (2008) Transforming growth factor- β and myostatin signaling in skeletal muscle. *J Appl Physiol* 104:579–587.

Kuang S, Kuroda K, Le Grand F, Rudnicki MA (2007) Asymmetric self-renewal and commitment of satellite stem cells in muscle. *Cell* 129: 999–1010.

Langen RC, Van Der Velden JL, Schols AM, Kelders MC, Wouters EF, Janssen-Heininger YM (2004) Tumor necrosis factor-alpha inhibits myogenic differentiation through MyoD protein destabilization. *FASEB J*;18(2):227–237.

Langen RCJ, Schols AMWJ, Kelders MCJM, Van Der Velden JL, Wouters EFM, Janssen-Heininger YMW (2006) Muscle wasting and impaired muscle regeneration in a murine model of chronic pulmonary inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 35:689–696.

Leal-Júnior ECP, de Almieda P, Tomazini SS, de Carvalho PTC, Ivaro RA, Lopes-Martins BF, Joenssens J, Johnson MI, Bordjal JM (2014) Superpulsed Low-Level Laser Therapy Protects Skeletal Muscle of mdx Mice against Damage, Inflammation and Morphological Changes Delaying Dystrophy Progression. *PLOS ONE*. 9, 3 e89453.

Lee SJ (2004) Regulation of muscle mass by myostatin. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 20:61-86.

Le Grand F, Jones AE, Seale V, Scimè A, Rudnicki MA (2009) Wnt7a activates the planar cell polarity pathway to drive the symmetric expansion of satellite stem cells. *Cell Stem Cell* 4, 535-547.

Lin F, Josephs SF, Alexandrescu DT, Ramos F, Bogin V, Gammill V, Dasanu CA, De Necochea-Campion R, Patel AN, Carrier E, Koos DR (2010) Lasers, stem cells, and COPD. *J TransMed*. 8:16.

Lindstrom M, Thornell LE (2009) New multiple labeling method for improved satellite cell identification in human muscle: application to a cohort of power-lifters and sedentary men. *Histochem Cell Biol* 132(2):141–15.

Liu XG, Zhou YJ, Liu TC, Yuan JQ (2009) Effects of low-level laser irradiation on rat skeletal muscle injury after eccentric exercise. *Photomed. Laser Surg*. 27: 863-869.

Liu L, Cheung TH, Charville GW, Hurgo BMC, Leavitt T, Shih J, Brunet A, Rando T. A (2013) Chromatin modifications as determinants of muscle stem cell quiescence and chronological aging. *Cell Rep*. 4: 189-204.

Liu XH, Wu G, Shi DD, Zhu R, Zeng HJ, Cao B, Huang MX, Liao H (2015) Effects of Nitric Oxide on Notexin-Induced Muscle Inflammatory Responses. *International Journal of Biological Sciences*. 11(2): 156-167.

Livak K J, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402-8.

Mandić M, Rancié N (2011) Low power laser in the treatment of the acute low back pain. *Vojnosanit Pregl*. 68(1):57-61.

McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ (1997) Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature*. 387:83-90.

Mauro A (1961) A Satellite cells of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol*. 9: 493-495.

Meinhardt M, Krebs R, Anders A, Heinrich U, Tronnier H (2008) Wavelength-dependent penetration depths of ultraviolet radiation in human skin. *J. Biomed.Opt.* 13, 044030.

Megeney LA, Rudnicki MA (1995) Determination versus differentiation and the MyoD family of transcription factors. *Biochem Cell Biol* 73(9-10): 723-32.

Miyabara EH, Martin JL, Griffin TM, Moriscot AS, Mestral R (2006) Overexpression of inducible 70-K Da heat shock protein in mouse attenuates skeletal muscle damage induced by cryolesioning. *Am J Physiol Cell Physiol.* 290: 1128-1138.

Michal J, Xiang Z, Davenport G, Hayek M, Dodson MV, Byrne KM (2002) Isolation and characterization of canine satellite cells *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 38(8):467-80.

Miller KJ, Thaloer D, Matteson S, Pavlath GK (2000) Hepatocyte growth factor affects satellite cell activation and differentiation in regenerating skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000, 278:C174-181.

Molkentin JD, Olson EN (1996) Defining the regulatory networks for muscle development. *Curr Opin Genet Dev.* 6: 445-53.

Morrone G, Guzzardella GA, Orienti L, Giavaresi G, Fini M, Rocca M, Torricelli P, Martini L, Giardino R (1998) Muscular trauma treated with a Ga-Al-As diode laser: in vivo experimental study. *Lasers Med Sci* 13: 293–298.

Motohashi N, Asakura A (2014) Muscle satellite cell heterogeneity and self-renewal. *Cell and Developmental Biology.* 2; 1 -11.

Mourikis P, Gopalakrishnan S, Sambasivan R, Tajbakhsh, S (2012) Cell-autonomous Notch activity maintains the temporal specification potential of skeletal muscle stem cells. *Development* 139: 4536-4548.

Mourkioti F, Rosenthal N (2005) IGF-1, inflammation and stem cells: interactions during muscle regeneration. *Trends Immunol* 26:535–542

Murre C, Mccaw PS, Vaessin H, Caudy M, Jan LY, Yan JN, Cabrera CV, Buskin JN, Hauschka SD, Lassar AB, Weintraub H, Baltimore D (1989) Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* 58:537-544.

Nakano J, Kataoka H, Sakamoto J, Origuchi T, Okita M, Yoshimura T (2009) Low-level laser irradiation promotes the recovery of atrophied gastrocnemius skeletal muscle in rats. *Exp Physiol.* 94:1005–1015.

Oliveira NML, Parizotto NA, Tania SF (1999) GaAs (904-Nm) Laser Radiation Does Not Affect Muscle Regeneration in Mouse Skeletal Muscle. *Lasers in Surgery and Medicine.* 25: 13–21.

Palmer CM, Rudnicki MA (2003) The myogenic regulatory factors. *Adv. Dev. Biol. Biochem.* 11: 1–32.

Parker MH, Seale P, Rudnicki MA (2003) Looking back to the embryo: defining transcriptional networks in adult myogenesis. *Nat Rev Genet* 4:497–507.

Pereira MC, Pinho CB, Medrado ARP, Andrade ZA, Reis SRA (2010) Influence of 670 nm low-level laser therapy on mast cells and vascular response of cutaneous injuries. *J Photochem Photobiol B Biol* 98:188–192.

Renno ACMA, McDonnell PA, Parizotto NA, Laakso EL (2007) The effects of laser irradiation on osteoblast and osteosarcoma cell proliferation and differentiation in vitro. *Photomed. Laser Surg.* 25: 275–280.

Renno AC, Toma RL, Feitosa SM, Fernandes K, Bossini PS, de Oliveira P, Parizotto N, Ribeiro DA (2011) Comparative effects of low-intensity pulsed ultrasound and low-level laser therapy on injured skeletal muscle. *Photomed Laser Surg* 2011; 29(1):5–10.

Riedel K, Riedel F, Goessler UR, Germann G, Sauerbier M (2007) TGF-beta antisense therapy increases angiogenic potential in human keratinocytes in vitro. *Arch Med Res* 38(1):45–51

Rizzi CF, Maurizi JL, Freitas Correa DS (2006) Effects of Low-Level Laser Therapy on the Nuclear Fator (NF)-Kappa B Signaling Pathway in Traumatized Muscle. *Laser Surge Med.* 38: 704–713.

Robertson V, Ward A, Low J, Reed A (2009) *Eletroterapia Explicada: Principios e Prática*. 4ª edição, São Paulo, Elsevier.

Rodrigues NC, Brunelli R, Araújo HSS, Parizotto NA, Renno ACM (2013). Low-level laser therapy (LLLT) (660 nm) alters gene expression during muscle healing in rats. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 5;120:29–35.

Rudnick MA, Jaenish R (1995) The MyoD family of transcription factors and skeletal muscle myogenesis. *Bioessays*. 17: 203–09.

Sabourin LA, Rudnicki MA (2000) The molecular regulation of myogenesis. *Clin Genet.* 57: 16–25.

Sajko S, Kubínová L, Cvetko E, Kreft M, Wernig A, Erzen I. (2004) Frequency of M-cadherin-stained satellite cells declines in human muscles during aging. *J Histochem Cytochem* 52(2):179–185.

Schmalbruch H, Hellhammer U (1976) The number of satellite cells in normal human muscle. *Anat Rec* 185(3):279–287.

Schmidt K, Glaser G, Wernig A, Wegner M, Rosorius O (2003) Sox8 is a specific marker for muscle satellite cells and inhibits myogenesis. *J Biol Chem* 278(32):29769–29775.

Seale P, Rudnicki MA (2000) A new look at the origin, function, and “stem-cell” status of muscle satellite cells. *Exp Biol* 218:115-124.

Seale P, Polesskaya A, Rudnicki MA (2003) Adult stem cell specification by Wnt signaling in muscle regeneration. *Cell Cycle* 2:418–419.

Serra C, Bhasin S, Tangherlini F, Barton ER, Ganno M, Zhang A, Shansky J, Vandeburgh HH, Travison TG, Jasuja R, Morris C (2011) The role of GH and IGF-I in mediating anabolic effects of testosterone on androgen-responsive muscle. *Endocrinology* 152(1):193–206.

Serrano AL, Baeza-Raja B, Perdiguero E, Jardi M, Munoz-Canoves P (2008) Interleukin-6 is an essential regulator of satellite cell-mediated skeletal muscle hypertrophy. *Cell Metab* 7: 33–44.

Shefer G, Partridge TA, Heslop L, Gross JG, Oron U, Halevy O (2002) Low-energy laser irradiation promotes the survival and cell cycle entry of skeletal muscle satellite cells. *J Cell Sci* 115(Pt 7):1461–1469.

Shi X, Garry DJ (2006) Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. *Genes Dev.* 20: 1692-1708.

Silva JP, Silva MA, Almeida APF, Júnior IL, Matos AP (2010) Laser Therapy in the Tissue Repair Process: A Literature Review. *Photomed Laser Surg.* 28(1):17-21.

Silva LH, Silva MT, Gutierrez RM, Conte TC, Toledo CA, Aoki MS, Liebano RE, Miyabara EH (2012) GaAs 904-nm laser irradiation improves myofiber mass recovery during regeneration of skeletal muscle previously damaged by crotoxin. *Lasers Med Sci*, 27:993–1000.

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

Silveira PCL, Silva LA, Pinho CA, Souza PS, Ronsani MM, Scheffer D, Pinho RA (2013) Effects of low-level laser therapy (GaAs) in an animal model of muscular damage induced by trauma. *Lasers Med Sci.* 28:431–436.

Smith AG, Muscat GE (2005) Skeletal muscle and nuclear hormone receptors: implications for cardiovascular and metabolic disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 37(10):2047-63.

Sonnet C, Lafuste P, Arnold L, Brigitte M, Poron F, Authier FJ, Chrétien F, Gherardi RK, Chazaud B (2006) Human macrophages rescue myoblasts and myotubes from apoptosis through a set of adhesion molecular systems. *J Cell Sci* 119:2497–2507.

Sugaru E, Sakai M, Horigome K, Tokunaga T, Kitoh M, Hume WE et al (2005) SMP-534 inhibits TGF- β -induced ECM production in fibroblasts cells and reduces mesangial

matrix accumulation in experimental glomerulonephritis. *Am J Physiol Renal Physiol* 289:998–1004.

Sussai DF, Carvalho PD, Dourado DM, Belchior AC, Dos Reis FA, Pereira DM (2010) Low Level Laser Therapy Attenuates creatine kinase levels and apoptosis during forced swimming in rats. *Laser Surg Med.* 25:115-120.

Tajbakhsh S (2009) Skeletal muscle stem cells in developmental versus regenerative myogenesis. *J Intern Med* 266: 372–389.

Tidball JG (2005) Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288(2):R345– R353.

Turner J, Hode L (2002) *Laser Therapy: Clinical Practice and Scientific Background*. Grä ngesberg, Sweden: Prima Books AB.

Van den Berg R, Haenen GR, van den Berg H, Bast A (2001) Transcription factor NF-kappaB as a potential biomarker for oxidative stress. *Br J Nutr.* 86(Suppl 1):S121–S127.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002) Accurate normalization of Real-Time quantitative RT-PCR by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3(7):34.1-34.11.

Vatansever F, Rodrigues NC, Assis LL, Peviani SS, Durigan JL, Moreira Fernando MA, Hamblin MR, Parizotto NA (2012) Low intensity laser therapy accelerates muscle regeneration in aged rats. *Photonics Lasers Med.*1(4): 287–297.

Voytik SL, Przyborski M, Badylak SF, Konieczny SF (1993) Differential expression of muscle regulatory factor genes in normal and denervated adult rat hindlimb muscle. *Dev Dynam* 198: 214-224.

Xu X, Zhao X, Liu TC, Pan H (2008) Low-intensity laser irradiation improves the mitochondrial dysfunction of C2C12 induced by electrical stimulation. *Photomed Laser Surg.* 26:197-202.

Yin H, Price F, Rudnicki MA (2013) Satellite Cells And The Muscle Stem Cell Niche. *Physiol Rev* 93: 23–67.

Zammit PS, Partridge TA, Yablonka-Reuveni Z (2006) The Skeletal Muscle Satellite Cell: The Stem Cell That Came in From the Cold *J Histochem Cytochem* 54(11):1177-1191.

Zanou N, Gally P (2013) Skeletal muscle hypertrophy and regeneration: interplay between the myogenic regulatory factors (MRFs) and insulin-like growth factors (IGFs) pathways. *Cell Mol Life Sci.*70(21):4117-30.

Wang YX, Rudnicki MA (2012) Satellite cells, the engines of muscle repair. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13: 127-133.

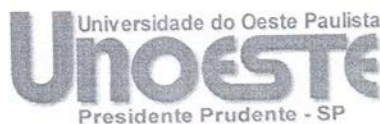
Wang YX, Dumont NA, Rudnicki MA (2014) Muscle stem cells at a glance. *J. Cell Sci.* 127: 4543–4548.

White RB, Biérinx AS, Gnocchi VF and Zammit PS (2010) Dynamics of muscle fibre growth during postnatal mouse development. *BMC Dev. Biol.* 10: 21.

Wisdom R, Huynh L, Hsia D, Kim S (2005) RAS and TGF- β exert antagonistic effects on extracellular matrix gene expression and fibroblast transformation. *Oncogene* 24:7043–7054.

World Association of Laser Therapy (WALT) (2006) Consensus agreement on the design and conduct of clinical studies with low-level laser therapy and light therapy for musculoskeletal pain and disorders. *Photomed Laser Surg.* 24: 761–762.

6. ANEXO – Certificado de Comissão de Ética no Uso de Animais

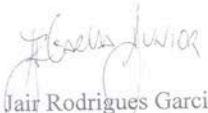


Coordenadoria Central de Pesquisa
Comissão de Ética no Uso de Animais

PARECER FINAL

Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado "INFLUÊNCIA DA LASERTERAPIA DE BAIXA INTENSIDADE NA FASE AGUDA DA REGENERAÇÃO DO MÚSCULO TIBIAL ANTERIOR EM RATOS" cadastrado na CCPq e na CEUA sob o número nº 713/11 (online) tendo como pesquisador responsável o Prof. Ms. **CARLOS EDUARDO ASSUMPÇÃO DE FREITAS**, os docentes participantes Dra. FRANCIS LOPES PACAGNELLI, Dra. INES CRISTINA GIOMETTI e Dra. ROSA MARIA BARILLI NOGUEIRA e os acadêmicos DAIANE OLIVEIRA DOS SANTOS, ESPERDINA SILVA DE PAULA FOLTRAN, MARCOS OLIVEIRA SANTOS e THIAGO KENDY KAWANO e o participante externo MAELI DAL PAI SILVA, foi avaliado e **APROVADO** nas duas instâncias da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente-SP, em reunião realizada em 30/06/2011.

Presidente Prudente, 04 de julho de 2011.


Prof. Dr. Jair Rodrigues Garcia Jr.
Coordenador Científico da CCPq


Profa. Ms. Adriana Falco de Brito
Coordenadora da CEUA-UNOESTE