

**UNIVERSIDADE METODISTA DE PIRACICABA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

**AVALIAÇÃO DA REGENERAÇÃO MUSCULAR EM RATOS EXPOSTOS
A NICOTINA E TRATADOS COM LASER DE BAIXA INTENSIDADE**

THIAGO SANTOS COHÉN

2013

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

THIAGOS SANTOS COHÉN

**AVALIAÇÃO DA REGENERAÇÃO
MUSCULAR EM RATOS EXPOSTOS A
NICOTINA E TRATADOS COM LASER DE
BAIXA INTENSIDADE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia, da Universidade Metodista de Piracicaba, para obtenção do Título de Mestre em Fisioterapia. Área de concentração: Intervenção Fisioterapêutica. Linha de pesquisa: Dosimetria e convalidação de recursos fisioterapêuticos.

Orientadora: Prof^a Dr^a Adriana Pertille

PIRACICABA

2013

Ficha Catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da Unimep

Bibliotecária: Luciene Cristina Correa Ferreira CRB8/8235

C678a Cohén ,Thiago Santos

Avaliação da regeneração muscular em ratos expostos a nicotina e tratados com laser de baixa intensidade. / Thiago Santos Cohén. – Piracicaba, SP: [s.n.], 2013.

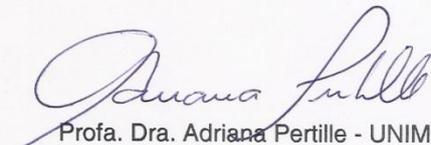
54 f. ; il.

Dissertação (Mestrado em Fisioterapia) – Faculdade de Ciências da Saúde / Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia - Universidade Metodista de Piracicaba. 2013.

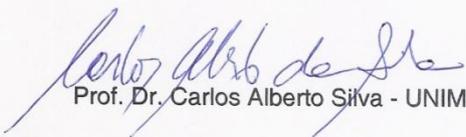
Orientadora: Dra. Adriana Pertille.

Os membros da Banca Examinadora da Defesa de Dissertação de Mestrado de **THIAGO SANTOS COHÉN** apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia, em Sessão Pública realizada em Aos vinte e cinco dias do mês de março de 2013, consideraram o candidato aprovado.

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dra. Adriana Pertille - UNIMEP



Prof. Dr. Carlos Alberto Silva - UNIMEP



Prof. Dra. Cintia Yuri Matsumura - UNICAMP

Dedico este trabalho aos meus pais e irmã, à minha tia Silene pela força, suporte e assistência que fizeram isso tudo ser possível.

À Renata Farias por estar comigo em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

A Deus por iluminar e guiar meu caminho.

A Nossa Senhora de Nazaré pela graça alcançada.

Aos meus pais, Carlindo Gentil Cohén e Simone Maria Santos Cohén, e a minha irmã Lorena de Fátima Santos Cohén, pelo esforço, dedicação, pelos ensinamentos, princípios, e por me mostrarem o valor dos estudos.

À minha tia Silene Maria Silva Santos, pelo lar, pelo conforto, pela dedicação e pelo carinho de mãe que teve comigo.

À Renata Gomes Farias por estar ao meu lado em todos os momentos, pela paciência, conselhos, sempre me incentivando, dando forças sendo muito mais que namorada, também amiga e companheira.

À Prof^a Dr^a Adriana Pertille pela paciência, dedicação e incentivo na orientação, pelos ensinamentos e conselhos não apenas para esta pesquisa, mas para toda a minha vida acadêmica.

Ao Prof^o Dr^o Carlos Alberto Silva pelos ensinamentos, conversas, conselhos, orientação, por fazer de uma das nossas muitas ideias malucas resultar neste trabalho.

Aos amigos de laboratório e companheiros de mestrado, Felipe, Cássio, Paulo e Aline pelo apoio durante a pesquisa, os experimentos e por fazerem dos laboratórios ambientes sempre divertidos.

Aos amigos do LIP André e Vitor pela grande ajuda durante a coleta dos eletrocardiogramas.

As professoras Dr^a Maria Luiza Polacow e Dr^a Cintia Yuri Matsumura pela sua importante contribuição neste trabalho, através das considerações propostas na banca de qualificação e defesa.

E a todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

Resumo

A nicotina quando em uso contínuo pelo fumante, possui grande capacidade limitante das funções homeostáticas, promovendo ação depressora do sistema nervoso central podendo provocar alterações na atividade elétrica cardíaca e na pressão arterial, além de agir negativamente no processo de regeneração muscular. Nesse sentido, este estudo teve como objetivo investigar o comportamento elétrico cardíaco e ajustes da pressão arterial, e analisar a regeneração muscular através do tratamento com laser de baixa intensidade no músculo tibial anterior de ratos submetidos à ingestão de nicotina por 18 semanas, após criolesão. Foram utilizados 35 ratos com 5 semanas de idade. Os animais foram divididos em 7 grupos : controle (CT) submetidos somente a ingestão de nicotina; lesão 3 e 7 dias (LE3 e LE7) submetidos à ingestão de nicotina e lesão muscular; laser 3 e 7 dias (LA3 e LA7) submetidos à ingestão de nicotina, lesão muscular e tratados com laser de diodo GaAlAs a cada 48 horas; sham 3 e 7 dias (SH3 e SH7) submetidos à ingestão de nicotina, lesão muscular e simulação do tratamento com laser, os grupos SH3 e LA3 receberam apenas uma aplicação/simulação e os respectivos grupos 7 dias receberam 3 sessões. Antes da divisão dos grupos foi avaliada a atividade elétrica cardíaca (ECG) e medida a pressão arterial dos animais. Para o procedimento de lesão muscular utilizou-se o método de criolesão do músculo tibial anterior direito. A análise da regeneração muscular foi analisada 3 e 7 dias após a lesão, através de microscopia de luz e immunoblotting. Para análise estatística utilizou-se os testes ANOVA one-way e Tukey para os dados com distribuição normal, nos dados com distribuição não normal utilizou-se os testes Kruskal-Wallis e SNK, adotando um valor de $p < 0,05$. Nos resultados do ECG foram constatados aumento de 39% na frequência cardíaca, como também aumento de 40% no intervalo QRS e 33% no segmento PR, a partir do 4º dia de ingestão de nicotina. A partir do 3º dia de ingestão verificou-se uma significativa elevação tanto na pressão sistólica quanto diastólica. Em relação a área de secção transversa o grupo laser 7 dias diferiu estatisticamente apresentando maior número de fibras com área entre 1201 e 1800 μm^2 em relação aos grupos de mesmo período, e menor quantidade de fibras com área entre 300 e 600 μm^2 em relação ao grupo SH7. Três dias após a lesão o grupo LA3 diferiu dos demais grupos apresentando maior quantidade de fibras com área entre 101 e 300 μm^2 e menor quantidade entre 0 e 100 μm^2 . A análise histológica mostrou que não houve diferença na área de inflamação/regeneração total entre os grupos, e quanto ao percentual de tecido conjuntivo, observou-se no grupo LA7 menor valor quando comparado aos outros grupos. O grupo controle diferiu dos demais grupos em todas as análises realizadas. A análise molecular evidenciou que o conteúdo de TGF- β 1 nos grupos sham foi significativamente maior que nos outros grupos. Conclui-se que poucos dias de uso de nicotina são suficientes para provocar alterações hemodinâmicas, como o aumento da pressão arterial e uma sobrecarga cardíaca, e que para este modelo experimental o tratamento com laser foi efetivo no processo de regeneração muscular, pois favoreceu a maturação das fibras em regeneração e reduziu a quantidade de tecido conjuntivo.

Palavras-chave: nicotina, regeneração muscular, fisioterapia, laser de baixa intensidade

Abstract

The nicotine when used continuously by the smoker, has great limiting capacity of the homeostatic functions, promoting depressing action of the central nervous system, which can cause changes in the cardiac electrical activity and blood pressure, besides acting negatively in the process of muscle recovery. Thus, this study had as an objective to investigate the cardiac electrical behavior and adjustments of the blood pressure, as well as to analyze the muscle recovery through treatment with low intensity laser at the anterior tibia muscle of rats submitted to the ingestion of nicotine for 18 weeks, after cryoinjury. 35 five-week-old rats were used. The animals were divided in 7 groups: control (CT) submitted only to the ingestion of nicotine; Injury 3 and 7 days (LE3 and LE7) submitted to the ingestion of nicotine and muscle injury; Laser 3 and 7 days (LA3 and LA7) submitted to the ingestion of nicotine, muscle injury and treated with GaAlAs diode laser every 48 hours; sham 3 and 7 days (SH3 and SH7) submitted to the ingestion of nicotine, muscle injury and laser treatment simulation, the groups SH3 and LA3 received only one application/simulation and the respective groups 7 days received 3 sessions. Before the group division, the cardiac electrical activity was evaluated as well as the blood pressure measurement of the animals. For the procedure of muscle injury, it was used the cryoinjury method of the right anterior tibia muscle. The analysis of the muscle recovery was analyzed 3 and 7 days after the injury, through light microscopy and immunoblotting. For the statistical analysis, it was used the ANOVA one-way tests and Tukey for the data with normal distribution, on the data with abnormal distribution, it was used the Kruskal-Wallis and SNK tests, adopting a value of $p < 0,05$. On the results of ECG, it was found out an increase of 39% in the heart rate as well as an increase of 40% in the QRS interval and 33% in the PR segment, from the 4th day of nicotine ingestion. From the 3rd of ingestion it was verified a significant increase both in the systolic pressure and the diastolic one. In relation to the area of transversal section the laser group 7 days differed statistically presenting higher number of fibers with area between 1201 and 1800 μm^2 in relation to the groups from the same period, and lower amount of fibers with area between 300 and 600 μm^2 in relation to the group SH7. Three days after the injury the group LA3 differed from the other groups presenting higher amount of fibers with area between 101 and 300 μm^2 and lower amount between 0 and 100 μm^2 . The histological analysis showed that there was no difference in the area of total inflammation/regeneration among the groups, and as for the percent of the conjunctive tissue, it was observed in the LA7 group a smaller value when compared to the other groups. The control group differed from the other groups in all the practiced analyses. The molecular analysis evidenced that the content of TGF- β 1 on the sham groups was significantly higher than the other groups. It was concluded that few days of nicotine use are enough to cause hemodynamic changes, such as increase of the blood pressure and a cardiac overcharge, and that for this experimental model the treatment with laser was effective in the process of muscle recovery because it favored the maturation of the fibers in regeneration and reduced the amount of conjunctive tissue.

Key words: nicotine, muscle recovery, physiotherapy, low- level laser therapy

Sumário

| | |
|---|----|
| 1. Introdução | 9 |
| 2. Objetivos | 15 |
| 2.1 Objetivo Geral | 15 |
| 2.2 Objetivos Específicos | 15 |
| 3. Material e métodos | 16 |
| 3.1 Administração da nicotina | 16 |
| 3.2 Avaliação da atividade elétrica cardíaca | 16 |
| 3.3 Avaliação da pressão arterial e frequência cardíaca | 17 |
| 3.4 Grupos Experimentais | 18 |
| 3.5 Procedimento da lesão muscular | 18 |
| 3.6 Tratamento com laser | 19 |
| 3.7 Eutanásia dos animais | 20 |
| 3.8 Análise Histológica | 20 |
| 3.8.1 Coloração com Hematoxilina e Eosina | 21 |
| 3.8.2 Coloração por Tricômico de Masson | 21 |
| 3.9 Técnica de imunoblotting | 22 |
| 3.9.1 Preparação do extrato total | 22 |
| 3.9.2 Eletroforese | 22 |
| 3.9.3 Anticorpos | 23 |
| 3.10 Análise dos resultados | 24 |
| 3.10.1 Quantificação da área de regeneração e fibrose | 24 |
| 3.10.2 Análise bandas imunorreativas | 25 |
| 3.11 Análise estatística | 25 |
| 4. Resultados | 26 |
| 5. Discussão | 35 |
| 6. Conclusão | 43 |
| Referências bibliográficas | 44 |
| Anexo 1 | 54 |

1. Introdução

O tabaco, considerado a forma mais popular de exposição à nicotina, é obtido através de duas espécies vegetais nativas dos andes peruanos e equatorianos, denominadas *Nicotiana tabacum* e a *Nicotiana rústica*. Estas espécies foram descobertas há 18.000 anos, sendo bastante utilizadas pelos indígenas em rituais e cerimônias religiosas, e a partir da chegada dos colonizadores foi disseminado pelo mundo (Musk e De Klerk, 2003; Rosemberg, 2003).

Desde o período de colonização das Américas o tabaco passou a exercer um papel importante na economia de muitos países, e assim se mantém até hoje. No Brasil foi introduzido no século XIX primeiramente no estado da Bahia, em seguida nos estados de Goiás, Minas Gerais, São Paulo e por fim Rio Grande do Sul, região que hoje concentra 95% da produção de tabaco brasileira (Jaques, 2010).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) cerca de 5 milhões de pessoas morrem anualmente em consequência de doenças relacionadas ao tabagismo (Caram et al., 2009) estando relacionado a 30% das mortes por câncer. Dessa forma, o tabagismo é considerado um fator de risco no desenvolvimento de carcinomas no aparelho respiratório, no esôfago, no estômago, no pâncreas, no útero, no rim e na bexiga (Balbani e Montovani, 2005).

Segundo o Ministério da Saúde, em 2003 aproximadamente 400 mil novos casos e quase 130 mil óbitos por câncer foram registrados no Brasil. Estima-se que o tabagismo seja responsável por mais de 200 mil mortes por ano em

território nacional, apesar de seu consumo entre adultos estar diminuindo desde a década de 90 (Instituto Nacional do Câncer, 2002-2003).

A nicotina é o maior alcalóide do tabaco, correspondendo a aproximadamente 5% da massa total da planta, é também o agente farmacologicamente mais ativo (Abood et al., 1981), sendo o nível de nicotina encontrado em fumantes ativos em torno de 15 a 50 mg/mL de sangue (Beckers e Camu, 1991).

A absorção da nicotina ocorre através dos pulmões e da vascularização da cavidade oral, onde a fumaça do cigarro inspirada é rapidamente transferida para uma extensa rede de capilares e atinge a circulação sistêmica e, em aproximadamente 7 segundos, chega ao cérebro (Benowitz, 1990; Benowitz, 1992). Devido a semelhança química com a acetilcolina, a nicotina liga-se aos receptores nicotínicos em diferentes áreas do sistema nervoso central e periférico. Assim, quando presente em baixas concentrações ocorre estimulação, por outro lado, em concentrações elevadas atua inibindo esses receptores (Benowitz, 1988), assim promovendo a liberação de opióides endógenos e glicocorticoides (Taylor, 1996).

A dependência química provocada pela nicotina leva o fumante a ajustar o seu comportamento de fumo, no caso da opção por cigarros com menor teor de nicotina, o tabagista involuntariamente eleva o número de cigarros fumados por dia, para que assim atinja a concentração plasmática de nicotina, cujo seu organismo está acostumado a receber (Benowitz, 1991).

Alguns tabagistas relatam que o hábito de fumar alivia o estresse e a depressão, eventos que acompanham os efeitos neuroquímicos representados pela a liberação de dopamina, noradrenalina e serotonina, semelhante aos

efeitos de alguns antidepressivos (Jones e Benowitz, 2002). Considera-se que todos esses processos podem levar ao aumento na glicemia desestimulando, também, o apetite, o que leva os tabagistas a pesar em média 4 Kg a menos que não fumantes (Benowitz, 1996).

Silvertein (1992) evidencia alguns efeitos da nicotina que podem prejudicar a cicatrização, como a diminuição do número de hemácias, fibroblastos e macrófagos e aumento da adesividade plaquetária, que promove a vasoconstrição periférica devido a produção de microcoágulos. Skinovsky (2000) observou menor proliferação de fibroblastos no 7º dia e menor área ocupada por colágeno imaturo no 28º dia de pós-operatório de anastomose do intestino delgado em ratos que receberam nicotina.

Martinez et al. (2002) submeteram culturas celulares de uma linhagem contínua de fibroblastos à diferentes doses de nicotina, tempos e condicionamento diferentes, e observaram que a nicotina pode alterar *in vitro* a morfologia de fibroblastos de acordo com a dose e tempo de exposição.

No estudo de Ichinose et al. (2010), o uso da nicotina promoveu diminuição na produção de óxido nítrico e aumento na síntese de colágeno. Esse aumento induziu o aumento da tensão no tendão do músculo supraespinhal de ratos no teste de tração máxima, o que ocasionou a predisposição do tendão à ruptura.

Em estudo com enxerto muscular utilizado na reconstrução do relevo mamário pós-mastectomia, o uso da nicotina se mostrou um fator prejudicial, promovendo aumento na área de necrose tecidual do músculo reto do abdome (Ely et al., 2009).

Segundo Oshida et al. (1989) o hábito de fumar está associado com a resistência insulínica, fato comprovado no estudo de Frati et al. (1996), onde os tabagistas apresentam maior intolerância à glicose. Tal intolerância promove a síntese de glicogênio deficiente (Rothman, Shulman e Shulman., 1992) e prejudicam o metabolismo muscular, pois diminuem a captação de glicose após o exercício físico (Price, Krishnan-sarin e Rothman., 2003).

O sucesso da regeneração fisiológica da lesão muscular depende do indivíduo, da extensão e da natureza da lesão, porém em todas as situações o processo envolve três fases seguidas: inflamação, proliferação e remodelação, fatores externos como tratamentos visam acelerar o período das mesmas (Pinto e Castillo, 1999; Ferrari et al., 2005; Järvinen et al., 2005).

A grande ocorrência de lesões musculares, além de incentivar estudos relacionados ao processo de regeneração muscular, é também estimulante de estudos relacionados aos tratamentos das diversas lesões que acometem o sistema musculoesquelético (Ferrari et al., 2005).

A terapia por laser de baixa intensidade (Low-Level Laser Therapy – LLLT) é utilizada ao longo de décadas no tratamento clínico de condições que requerem uma melhora no reparo tecidual, resposta inflamatória e alívio da dor (Moreira, 2008).

A crescente utilização da LLLT se dá por esta ser um recurso que possui propriedades especiais capazes de produzir efeitos bioquímicos e fisiológicos nos tecidos (Ortiz et al., 2001). Cruães (1984) classificou os efeitos do laser em diretos e indiretos, sendo os diretos efeitos bioquímicos, bioelétricos e bioestimulantes, e os indiretos como aumento do trofismo local, analgesia,

efeito anti-inflamatório, bioestimulante e tissular trófico, todos provindos da estimulação da microcirculação.

É atribuído ao laser de baixa intensidade o aumento do ATP mitocondrial e o incremento da síntese protéica, promovendo assim um aumento no número de fibroblastos e da síntese de colágeno, na regeneração dos vasos sanguíneos, na velocidade de crescimento de nervos periféricos e da divisão celular (Cruães 1984; Balboni et al.,1986; Asencio e Martinez 1988; Porter 1992).

O uso do laser de baixa intensidade tem demonstrado inibir a expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias, reduzir protraglandinas e reduzir o estresse oxidativos em diferentes tecidos, entre eles o muscular (Gavish, Perez e Gertz ., 2006; Aimbire, Albertini e Pacheco 2006; Fillpin et al., 2005; De Assis et al., 2012).

No estudo de Rennó et al. (2011) comparou-se os efeitos da aplicação do ultrassom de 1.5 MHz pulsado a 20% (intensidade média 30 W/cm² durante 20 min) com os efeitos do laser de baixa intensidade de 830 nm (potência 30 mW e densidade de energia 50 J/cm²) na regeneração muscular após criolesão. O tratamento foi iniciado 24 horas após a lesão totalizando 6 aplicações. Na análise histológica, o grupo de animais tratado com laser apresentou significativa redução da resposta inflamatória ante o grupo tratado com ultrassom, enquanto que a análise imunohistoquímica demonstrou uma redução na expressão de COX-2 em ambos os grupos.

Diante da constante necessidade de amplificação dos conhecimentos do terapeuta quanto à aplicabilidade e efetividade de parâmetros dos recursos fisioterapêuticos como a LLLT, e visando maior aprofundamento do

conhecimento dos fatores deletérios provindos do uso da nicotina sobre a regeneração muscular, fator ainda pouco explorado se comparado a outras ações prejudiciais da nicotina, como as pulmonares por exemplo, este trabalho realizou uma análise do efeito do laser de baixa intensidade no tratamento de animais sob uso de nicotina, submetidos à lesão muscular através de criolesão.

Considerando o discorrido sobre os malefícios da nicotina e os efeitos facilitadores da terapia com laser, este estudo teve como hipótese que a regeneração muscular em usuários de nicotina pode ser comprometida, com o aumento da fibrose, e que o tratamento com a LLLT pode reverter esse quadro.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Analisar a regeneração muscular pós criolesão através do tratamento com laser de baixa intensidade no músculo tibial anterior e as alterações hemodinâmicas em animais submetidos à ingestão de nicotina.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar a regeneração muscular em ratos submetidos à ingestão de nicotina por 18 semanas, nos períodos de 3 e 7 dias após criolesão no músculo tibial anterior.
- Avaliar a eficácia do laser de baixa intensidade com comprimento de onda de 830nm, aplicado 1 ou 3 vezes.
- Analisar morfometricamente a relação do tratamento proposto com o percentual de tecido conjuntivo e com a área de secção transversa da fibra muscular;
- Analisar o conteúdo da citocina TGF- β 1 nos diferentes períodos de tratamento;
- Analisar o efeito da nicotina no sistema cardiovascular;
- Oferecer dados científicos aos profissionais da área de saúde referentes à regeneração muscular em usuários de nicotina.

3. Material e Métodos

Foram utilizados 35 ratos Wistar machos, com idade de 24 semanas, oriundos do Biotério Central da UNIMEP e mantidos no Biotério da Faculdade de Ciências da Saúde (FACIS-UNIMEP), sob temperatura ambiente controlada, submetidos a ciclo claro/escuro de 12h, com água e ração *ad libitum*. Em média foram alocados 4 animais em gaiolas de polietileno de tamanho grande. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética sobre o Uso de Animais da UNIMEP protocolo de pesquisa nº 02/12 (Anexo 1).

3.1 Administração da nicotina

A nicotina foi administrada por via oral segundo o método proposto por Larsson et al. (1988) gerando um padrão de nicotina no plasma do animal semelhante ao encontrado em humanos que fumam 20 cigarros/dia.

Os animais iniciaram a exposição à nicotina com 5 semanas de idade (pós desmame), através da ingestão de água potável tratada com adição de nicotina BGP® numa proporção de 50 mg/L durante 18 semanas. Para evitar a rejeição foi adicionado à mistura 1g de sacarose a cada 2 L de água para que os animais mantenham o consumo de água médio de 23ml/dia.

3.2 Avaliação da atividade elétrica cardíaca

Os animais foram avaliados sendo os primeiros dias considerados controle por não haver a presença da nicotina. Para análise Eletrocardiográfica os animais foram anestesiados com Pentobarbital sódico (40mg/Kg, ip) e os eletrodos conectados aos canais do eletrocardiógrafo (Heart Ware System) e registradas três derivações bipolares (DI, DII e DIII) e três derivações

amplificadas (aVR, aVL e aVF), com sensibilidade N e velocidade de 50 mm/segundo. O intervalo QT foi medido em dez batimentos consecutivos, do início do complexo QRS ao ponto de retorno da onda T isoeletrica definido como segmento TP. O intervalo QT foi corrigido pela frequência cardíaca usando a fórmula de Bazett ($QTc = QT / \sqrt{RR}$). A frequência e atividade elétrica cardíaca começaram a ser verificadas 48 horas após o início da administração da nicotina, com intuito de constatar se a nicotina estava exercendo uma atividade fisiológica no organismo dos animais, tendo em vista que neste período a quantidade de nicotina circulante já é suficiente para promover tais ações (Benowitz, 1990).

3.3 Avaliação da pressão arterial e frequência cardíaca

Durante todo o período experimental foi verificada a pressão arterial dos animais por meio da conexão de um pletismógrafo (BP-2000 Blood Pressure Analysis SystemTM) à cauda dos animais (Krege et al., 1995), em ambiente com isolamento acústico e diminuição de quaisquer fontes de ruído que pudessem interferir nesta avaliação. Os ratos foram retirados do biotério e mantidos por 30 minutos no laboratório de experimentação para que pudessem se adaptar ao ambiente. Dois ratos de grupos alternados foram colocados no aparelho, cada um dentro de um compartimento retangular adequado ao tamanho do animal, onde permaneceram por 5 minutos sobre uma plataforma aquecida a 36° C e com a cauda já conectada ao “cuff” do aparelho. Após 5 minutos de adaptação do animal ao aparelho, este foi acionado e as medidas de pressão arterial sistólica, diastólica, média e frequência cardíaca foram coletadas. Em cada troca de animal, o compartimento retangular foi lavado com sabão neutro

e secado para evitar que os odores liberados pelos ratos anteriormente analisados pudessem interferir nas análises dos ratos subsequentes. As análises foram realizadas uma vez por semana entre 8:00 e 12:00 h.

3.4 Grupos Experimentais

Após a exposição à nicotina, os ratos foram divididos em 7 grupos, com 5 animais cada:

- Grupo controle (CT): submetidos somente a ingestão de nicotina;
- Grupo lesão 3 e 7 dias (LE3 e LE7): submetidos à ingestão de nicotina e lesão muscular;
- Grupo laser 3 e 7 dias (LA3 e LA7): submetidos à ingestão de nicotina, lesão muscular e tratados com laser de diodo GaAIs a cada 48 horas.
- Grupo Sham 3 e 7 dias (SH3 e SH7): submetidos à ingestão de nicotina, lesão muscular e simulação do tratamento com laser de diodo GaAIs a cada 48 horas. Os animais foram submetidos ao mesmo procedimento do grupo laser, mas o equipamento permaneceu desligado.

3.5 Procedimento da lesão muscular

Os animais, com 24 semanas de vida, foram anestesiados via intraperitoneal com uma mistura de Ketalar® (50 mg/mL) e Rompun® (2 g/100mL), na proporção 1:1, na dose de 0,2 mL/100 g de massa corporal. Após apresentar sinais de anestesia, os animais foram tricotomizados na região a ser lesionada, o músculo tibial anterior direito foi exposto e lesionado com uma barra metálica de 1 cm / 0,5 cm (Figura 1) resfriada em nitrogênio líquido por 30 segundos. A haste foi pressionada sobre o ventre muscular por 10

segundos, em seguida imersa novamente em nitrogênio líquido por 30 segundos, e pressionada no mesmo lugar do músculo por 10 segundos, segundo protocolo de Rodrigues (2009) (Figura 1). A fáscia muscular e a pele foram suturadas e os animais foram acondicionados individualmente em caixas com ração e água com nicotina *ad libitum* até a recuperação. Posteriormente foram acondicionados em caixas maiores com 3 animais cada.

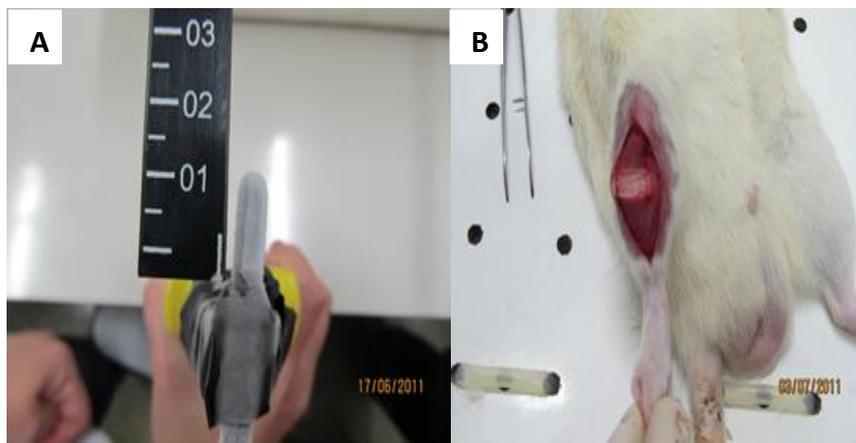


Figura 1: Em A: haste metálica resfriada em nitrogênio líquido. Em B: Músculo tibial anterior após a criolesão.

3.6 Tratamento com laser

Para o tratamento fisioterapêutico foi utilizado o LLLT de diodo GaAIAs com comprimento de onda 830 nm, potência 30 mW, dose (densidade de energia) 20 J/cm^2 , adaptado de Rennó et al. (2011). As aplicações foram feitas através da técnica pontual, realizado em um ponto, acima da área lesada por 70 segundos. A primeira sessão de tratamento foi realizada 24 horas após a lesão, em dias intercalados com intervalo de 48 horas. Dessa forma, os animais sacrificados 3 dias após a lesão receberam apenas uma aplicação e os animais sacrificados 7 dias após a lesão receberam três sessões de

tratamento. Para aplicação do laser os animais foram contidos manualmente por um pesquisador, enquanto outro realizou o procedimento.

O laser com diodo de GaAlAs (830 nm) foi selecionado para esta pesquisa devido ao seu alto comprimento de onda, tendo em vista a necessidade do feixe atingir o músculo ultrapassando barreiras bioimpedantes, como a pele do animal, sendo o comprimento de onda a propriedade que define a profundidade de penetração do laser no tecido irradiado (Vladimirov, Osipov e Klebanov, 2004).

3.7 Eutanásia dos animais

Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de uma mistura de Ketalar® (50 mg/mL) e Rompun® (2 g/100mL), na proporção 1:1, na dose de 0,3 mL/100 g de massa corporal. Após sinais de anestesia geral, os animais foram perfundidos com PBS (perfusão cardíaca) e o músculo tibial anterior direito foi retirado, pesado e dividido em duas partes transversais iguais, sendo uma parte destinada à técnica de microscopia de luz e a outra parte destinada à técnica de imunobloting. Para melhor avaliação da resposta tecidual, os animais foram eutanaziados 3 e 7 dias após o protocolo de lesão muscular.

3.8 Análise Histológica

Parte do músculo tibial anterior direito de cada animal foi fixada em suporte de madeira com tragacanth gum, imerso em isopentano à -80° C por 40 segundos e imediatamente colocado em nitrogênio líquido à -196° C. Os músculos foram retirados do nitrogênio e mantidos em Biofreezer à -70° C ou

em tambores de nitrogênio. Para obtenção dos cortes, os músculos foram descongelados por aproximadamente 30 minutos até que atingissem a temperatura de -23° C, e seccionados transversalmente utilizando um criostato (modelo HYRAX C 25 - Zeiss). Cortes transversais seriados com espessura variando entre 8 e 12 µm foram coletados para:

3.8.1 Coloração com Hematoxilina e Eosina (HE): foi utilizada para a mensuração de áreas de secção transversal e a quantificação da área de inflamação/regeneração muscular. Os cortes foram fixados em Bouin por 30 min. e posteriormente lavados em álcool 70% por 12h. No dia seguinte foram lavados em água corrente por 10 minutos e corados com hematoxilina de Harris e novamente lavados em água corrente 10 minutos. Em seguida os cortes foram corados com eosina e as lâminas foram lavadas em água destilada, após a lavagem iniciou-se a desidratação em álcool e a diafanização em xilol. As lâminas foram montadas com Entellan.

3.8.2 Coloração por Tricrômico de Masson: foi utilizada para a quantificação de áreas de fibrose. Os cortes foram fixados em Bouin por 3h. Posteriormente foram lavados em solução de álcool 70% por 12h e em água corrente por 10 minutos, em seguida, os cortes foram corados com hematoxilina de Harris e novamente lavados em água corrente 10 minutos. As lâminas foram imersas em solução de Masson (0,7g de Ponceau Fucsina, 0,03g de Fucsina ácida, 0,7g de Orange G e 100 mL de solução de ácido acético 0,2%) por 15min, banhadas em solução de ácido acético a 0,2% e mergulhadas em solução de

verde-luz. Para retirar o excesso de verde-luz, as lâminas foram imersas em solução aquosa de ácido acético a 0,2%. As lâminas foram desidratadas, diafanizadas e montadas com Entellan.

3.9 Técnica de Immunoblotting

3.9.1 Preparação de Extrato Total

A outra parte dos músculos foi cortada em pequenos pedaços e homogeneizada em tampão Triton X-100 1%, tris-HCl 100 mM (pH 7,4), pirofosfato de sódio 100 mM, fluoreto de sódio 100 mM, EDTA 10 mM, ortovanadato de sódio 10 mM, PMSF 2 mM e 0,1mg/ml de aprotinina, com volume variando entre 600 a 1000 μ L, a 4^o C usando homogeneizador tipo Polytron PTA 20S (modelo PT 10/35; Brinkmann Instruments, Westbury, NY, EUA) operado em velocidade máxima por 30 segundos. Os extratos foram centrifugados a 11000 rpm a 4^o C por 20 minutos e o sobrenadante utilizado para análise por extrato total. A determinação de proteína foi realizada pelo método colorimétrico através do Biureto.

3.9.2 Eletroforese

As amostras dos extratos protéicos foram tratadas com tampão Laemmli (azul de bromofenol 0,1% e fosfato de sódio 1 M pH 7,0, glicerol 50% e SDS 10%), acrescido de ditioneitol 100 mM e aquecidas banho seco por 5 minutos. Em seguida, 50 μ g de proteína foram aplicados em gel SDS-poliacrilamida, com porcentagem de 15 % em aparelho para eletroforese da Bio-Rad (mini-Protean, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, EUA). Foram obtidos 3 extratos protéicos por grupo, resultando em 12 géis da proteína analisada. A

eletrotransferência do gel para a membrana de nitrocelulose foi realizada em 90 minutos a 120 V (constante) em aparelho de transferência da Bio-Rad. As membranas foram incubadas com solução basal (Trisma base 10mM, cloreto de sódio 150 mM e Tween-20 0,02%) contendo 5 % de leite desnatado, por 1 hora em temperatura ambiente para reduzir a ligação não específica de proteínas. Posteriormente, foram incubadas com 10 µg de anticorpo primário diluído em 10 mL de solução basal contendo 3% de leite desnatado a 4° C durante a noite. No dia seguinte, as membranas foram lavadas por 30 minutos com solução basal e incubadas em 10 mL de solução basal contendo 3 % de leite desnatado e 2,5 µg de anticorpo secundário por 2 horas em temperatura ambiente. Posteriormente, as membranas foram novamente lavadas por 30 minutos com solução basal.

Para detectar as bandas imunorreativas, as membranas foram expostas à solução de quimioluminescência (Pierce) por 5 minutos e, em seguida, o sinal fluorescente foi captado no equipamento G-Box (GeneSys).

3.9.3 Anticorpos

– Anticorpo Primário:

TGF-β1, mouse monoclonal, Sigma-Aldrich, T7039

- Anticorpo secundário:

Goat anti-mouse IgG-HRP, sc-2005 (Santa Cruz)

3.10 Análise dos resultados

3.10.1 Quantificação da AST, área de inflamação/regeneração e fibrose

Para a análise da área de secção transversa foram utilizados dois cortes aleatórios por lâmina, sendo uma lâmina para cada animal, onde foram contadas 200 fibras musculares normais (CT) e 200 fibras em regeneração. As fibras foram classificadas a cada $300 \mu\text{m}^2$ nos grupos 7 dias, e a cada $100 \mu\text{m}^2$ nos grupos 3 dias para análise da variância. Também foi quantificada a porcentagem de infiltrado inflamatório e a área em regeneração (% Infl/Reg).

As áreas de inflamação e regeneração foram caracterizadas por apresentar intenso infiltrado inflamatório e fibras em estágio inicial de regeneração. Essas fibras possuem pequeno diâmetro, citoplasma escasso fortemente basófilo e núcleo central (Grounds e Torrisi, 2004; Grounds et al., 2005; Marques et al., 2008). As lâminas foram observadas ao microscópio óptico com câmera acoplada, com objetiva de 28X e conectado a um computador com software Image Pro-Plus[®] 6.2 (Media Cybernetics).

A mensuração da fibrose, nas lâminas coradas com Tricrômico de Masson foi realizada através do software Image ProExpress com imagens adquiridas através de vídeo câmera (Nikon Express Series), acoplada ao microscópio de luz (Nikon Eclipse E 400) com objetiva de 28X.

Foram analisadas 15 imagens por animal, e sobre as imagens foi sobreposta uma grade contendo 88 intersecções, onde foram contabilizadas aquelas que se sobrepunha sobre tecido conjuntivo, e posteriormente transformadas em porcentagem.

3.10.2 Análise das bandas imunorreativas

As bandas observadas na técnica de immunoblotting foram escaneadas e salvas em discos de computador para posterior quantificação da densitometria óptica, usando um scanner e o programa Image J[®] (The National Institute of Health, EUA).

3.11 Análise Estatística

A avaliação dos dados foi realizada através do programa SPSS 13.0, considerando média e desvio padrão. Para análise estatística utilizou-se os testes ANOVA one-way e Tukey para os dados com distribuição normal, nos dados com distribuição não normal utilizou-se os testes Kruskal-Wallis e SNK e o índice de COHEN para a comparação do peso dos animais. Para todas as análises foi adotado um valor de $p < 0,05$ para significância estatística.

4. RESULTADOS

O peso dos animais foi medido mensalmente para controle do seu desenvolvimento, e comparado com o peso de outros animais de mesma espécie e mesma idade presentes no biotério. Os animais utilizados para a comparação apresentaram na primeira semana um domínio quanto a mediana dos pesos de 62% em relação aos animais que receberam nicotina, esse domínio se manteve em 58% nos demais períodos em que os animais foram pesados. (Figura 2)

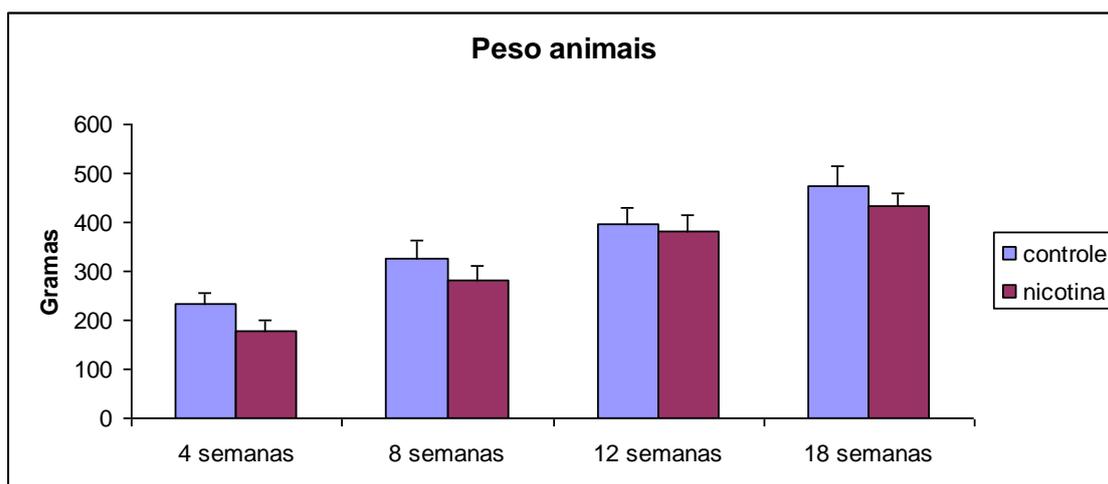


Figura 2 – Evolução do ganho de peso dos animais nicotina, comparado à animais controle da mesma idade.

Inicialmente analisou-se a variação da frequência cardíaca, sendo verificado que nos três primeiros dias não ocorreu variação da mesma, no entanto, a partir do quarto dia ocorreu elevação de 39%, permanecendo durante os 30 dias de observação. Este padrão funcional também foi observado em diferentes segmentos avaliados, desta forma no intervalo QRS foi observado elevação de 40%, evento também observado no intervalo PR

onde a elevação foi de 33,6%, já no segmento PR, onde houve elevação de 5%, a mesma foi notada a partir do 3º dia de ingestão de nicotina (Tabela 1).

Tabela 1. Parâmetros da frequência cardíaca (bat/min) e intervalos eletrocardiográficos na interface desde a fase sem tratamento até 30 dias de observação. Os valores correspondem a média \pm epm, n=10.

| | Freq. Cardíaca (bat/min) | QRS (ms) | Intervalo PR (ms) | Segmento PR (ms) |
|----------|-------------------------------------|---------------------|------------------------------|-----------------------------|
| Controle | 209,9 \pm 4,1 | 50 \pm 10 | 37,8 \pm 2,2 | 10,5 \pm 0,7 |
| 2 dias | 206 \pm 19 | 39,2 \pm 1,5 | 29 \pm 1,3 | 9,7 \pm 0,2 |
| 3 dias | 175,4 \pm 12 | 35,7 \pm 1,4 | 29 \pm 2,4 | 12,4 \pm 0,1¥ |
| 4 dias | 255,9 \pm 8,9* | 53,7 \pm 2,4* | 36 \pm 1,5* | 12,1 \pm 0,8* |
| 10 dias | 229,8 \pm 1,3* | 49,7 \pm 1,6* | 39 \pm 0,9* | 12,4 \pm 0,9* |
| 20 dias | 233,7 \pm 10* | 47,5 \pm 0,9* | 39 \pm 2,4* | 11 \pm 0,6* |
| 30 dias | 257,8 \pm 6,7* | 49,7 \pm 0,9* | 41 \pm 1,7* | 12,1 \pm 0,2* |

*: p<0,05 comparado ao controle, segundo e terceiro dias; ¥: p<0,05 comparado ao controle e segundo dia.

No mesmo perfil de análise foi avaliada a pressão arterial sendo verificado que a partir do terceiro dia houve elevação significativa, tanto na pressão sistólica quanto diastólica indicando que a pressão média estava sendo influenciada pela nicotina (Tabela 2).

Tabela 2. Pressão arterial (mm/Hg) desde a fase sem tratamento (controle) até 30 dias de observação. Os valores correspondem a média \pm epm, n =10.

| | Sistólica | Diastólica | Média |
|----------|------------------|-------------------|--------------|
| Controle | 106 | 63 | 84,5 |
| 2 dias | 107 | 66 | 86,5 |
| 3 dias | 128* | 77* | 102,5* |
| 4 dias | 136* | 79* | 107,5* |
| 10 dias | 153* | 92* | 122,5* |
| 20 dias | 158* | 93* | 125,5* |
| 30 dias | 166* | 93* | 129,5* |

*:p<0,05 comparado ao segundo e terceiro dias.

A área de secção transversa (AST) foi analisada nos períodos de 3 e 7 dias após a lesão muscular, onde notou-se extenso infiltrado inflamatório e fibras musculares degeneradas e em processo de regeneração apresentando núcleo centralizado, essas fibras apresentaram citoplasma escasso e fortemente basófilo. Nos grupos 7 dias foi verificado um aumento na área das fibras e diminuição do infiltrado inflamatório em relação aos grupos 3 dias.

O grupo controle apresentou fibras musculares uniformes, de diâmetro médio de $2469 \pm 122,8 \mu\text{m}^2$ (Média/Desvio padrão), o grupo não apresentou alterações quanto a quantidade de tecido conjuntivo e se diferiu de todos os outros grupos (Figura 3).

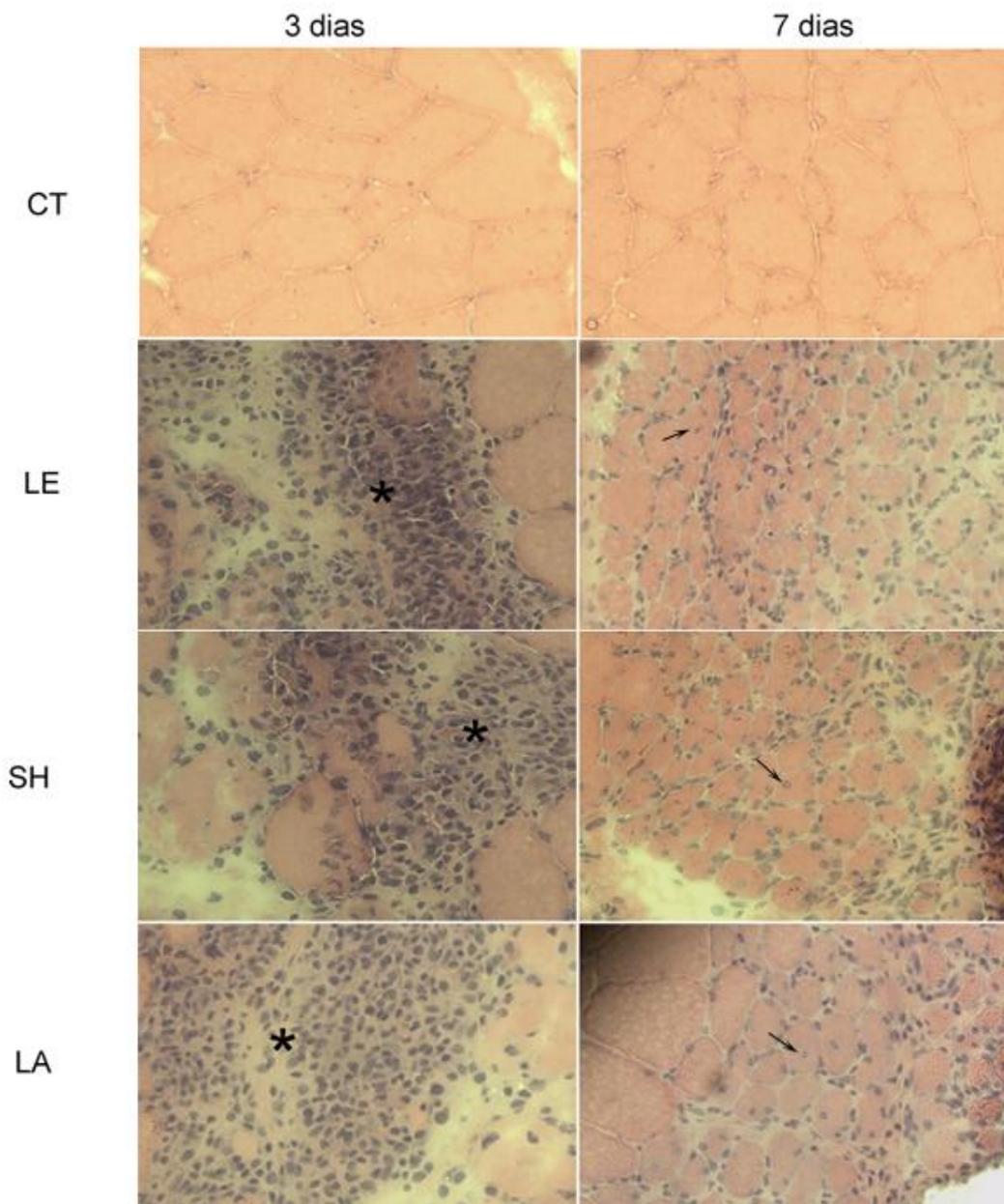


Figura 3 – Cortes transversais do músculo tibial anterior de ratos expostos à nicotina corados com HE, 3 e 7 dias após-tratamento. Nota-se intenso infiltrado inflamatório (*) no grupo 3 dias e presença de fibras em regeneração nos grupos 7 dias, caracterizadas pela posição central do núcleo (seta). CT: controle; LE: lesão; SH: sham; LA: laser. Aumento de 28 x

Nos grupos 3 dias após a lesão, o grupo laser apresentou aumento significativo no número de fibras musculares com diâmetro de 101 a $200 \mu\text{m}^2$ e 201 a $300 \mu\text{m}^2$, e menor quantidade de fibras entre 0 a $100 \mu\text{m}^2$ em relação aos grupo lesão e sham 3 dias (Figuras 3 e 4).

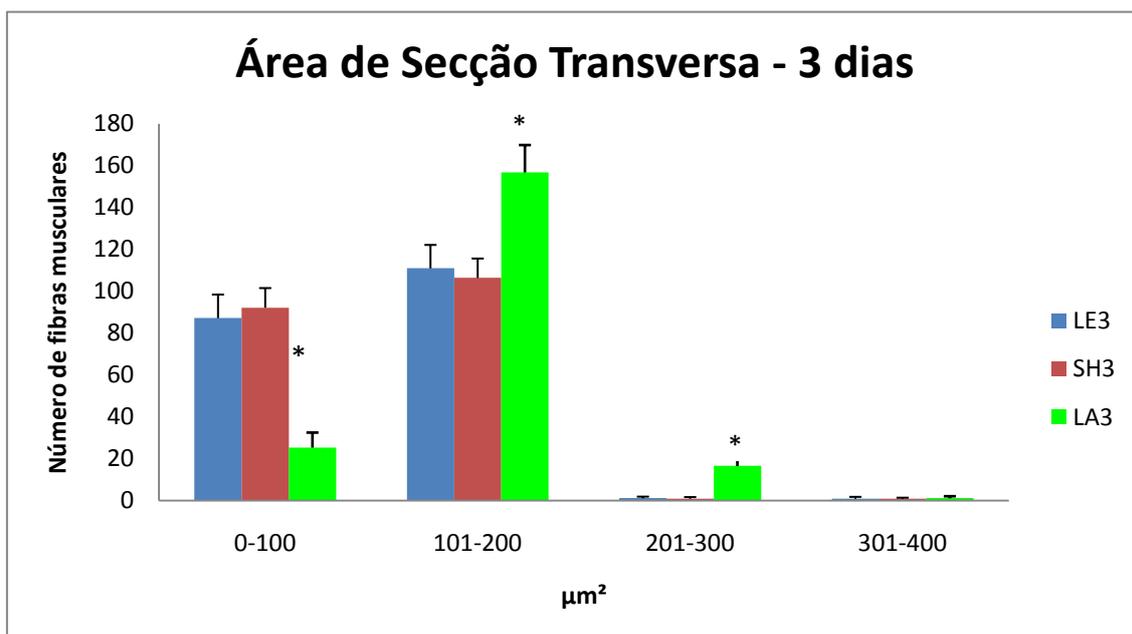


Figura 4 – Média e desvio padrão da quantidade de fibras musculares do tibial anterior, segundo a área de secção transversa nos diferentes grupos. LE3: lesão 3 dias; SH3: sham 3 dias; LA3: laser 3 dias.

* : difere dos demais grupos da mesma faixa de fibras analisadas.

Em 7 dias, o grupo laser apresentou aumento significativo no número de fibras musculares com diâmetro de 1201 a 1500 μm^2 e 1501 a 1800 μm^2 em relação aos grupos lesão e sham 7 dias, e menor quantidade de fibras de 300 a 600 μm^2 em comparação ao grupo sham 7 dias (Figuras 3 e 5).

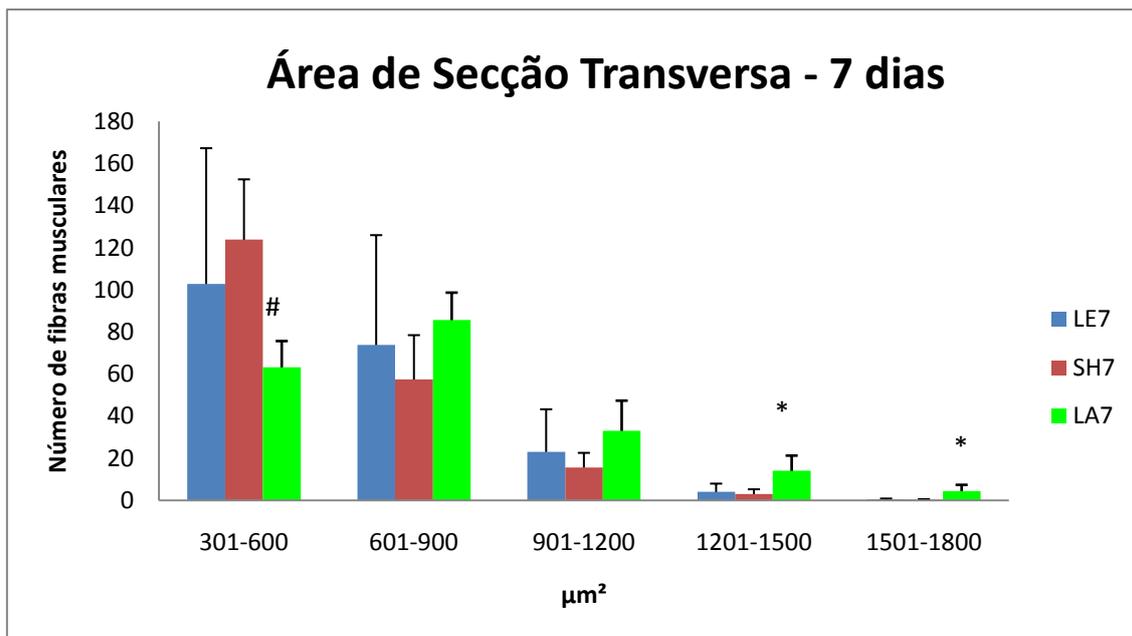


Figura 5 – Média e desvio padrão da quantidade de fibras musculares do tibial anterior, segundo a área de secção transversa nos diferentes grupos. LE7: lesão 7 dias; SH7: sham 7 dias; LA7: laser 7 dias.

*: difere dos demais grupos da mesma faixa de fibras analisadas;

#: difere do grupo SH7 da mesma faixa de fibras analisadas

Para uma análise do desenvolvimento do processo de regeneração muscular, foi quantificada a área de inflamação total das fibras, onde não foi constatado diferença entre os grupos (Tabela 3, Figura 6).

Tabela 3 – Média e desvio do percentual da área de inflamação e regeneração total do músculo tibial anterior. LE: lesão; SH: sham; LA: laser

| Grupo | LE3 | LE7 | SH3 | SH7 | LA3 | LA7 |
|------------------------|----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|----------------|
| Área de inflamação (%) | 52,8 ± 10,1 | 55,3 ± 7,7 | 57,2 ± 8,4 | 51,2 ± 7,9 | 55,6 ± 9,6 | 47,3 ± 10,7 |

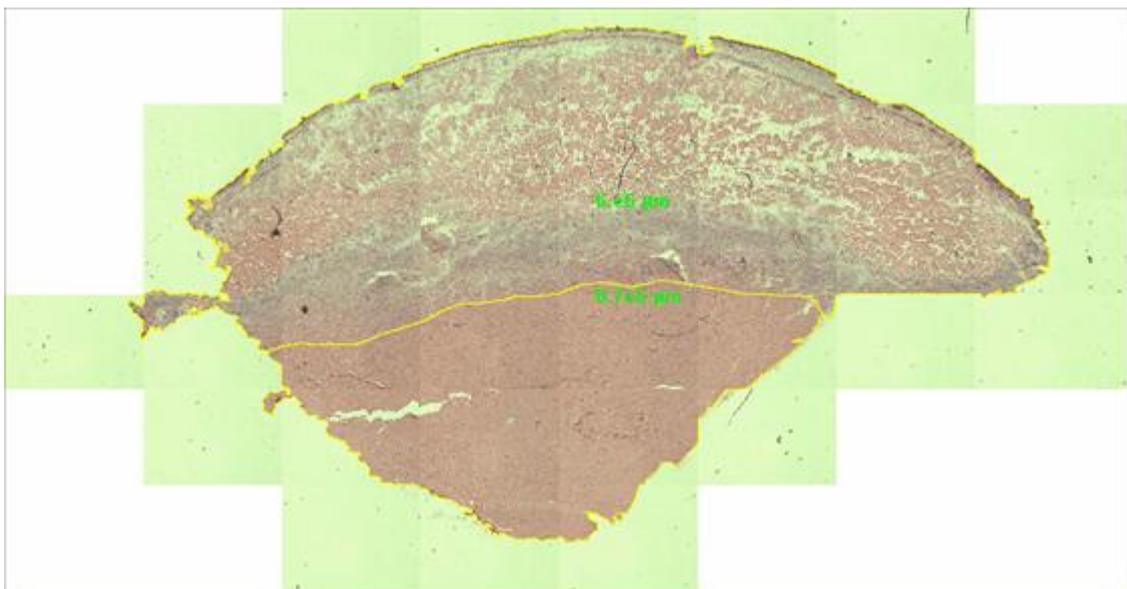


Figura 6 – Imagem de um corte transversal do músculo tibial anterior de um rato exposto à nicotina corados com HE 7 dias após a lesão muscular montada com imagens no aumento de 4x, para análise da área de inflação/regeneração total.

Na análise histológica das lâminas coradas com Tricrômico de Masson notou-se intenso infiltrado de tecido conjuntivo em todos os grupos, com exceção do grupo LA7 (Tabela 4, Figura 7).

Tabela 4 – Média e desvio padrão do percentual de tecido conjuntivo do músculo tibial anterior nos diferentes grupos. CT: controle; LE: lesão; SH: sham; LA: laser

| Grupo | CT | LE3 | LE7 | SH3 | SH7 | LA3 | LA7 |
|----------------------|--------------|----------------------------|------------------------------|----------------------------|------------------------------|----------------------------|--------------------------------|
| Tecido conjuntivo(%) | 4,3 ± 0,9 | 30,9 ± 0,8 ^a | 23,5 ± 1,3 ^{a,b} | 29,9 ± 1,4 ^a | 21,3 ± 1,3 ^{a,b} | 29,8 ± 1,5 ^a | 14,1 ± 1,8 ^{a,b,c} |

^a: difere do grupo controle; ^b: difere do respectivo grupo 3 dias; ^c: difere de todos os grupos

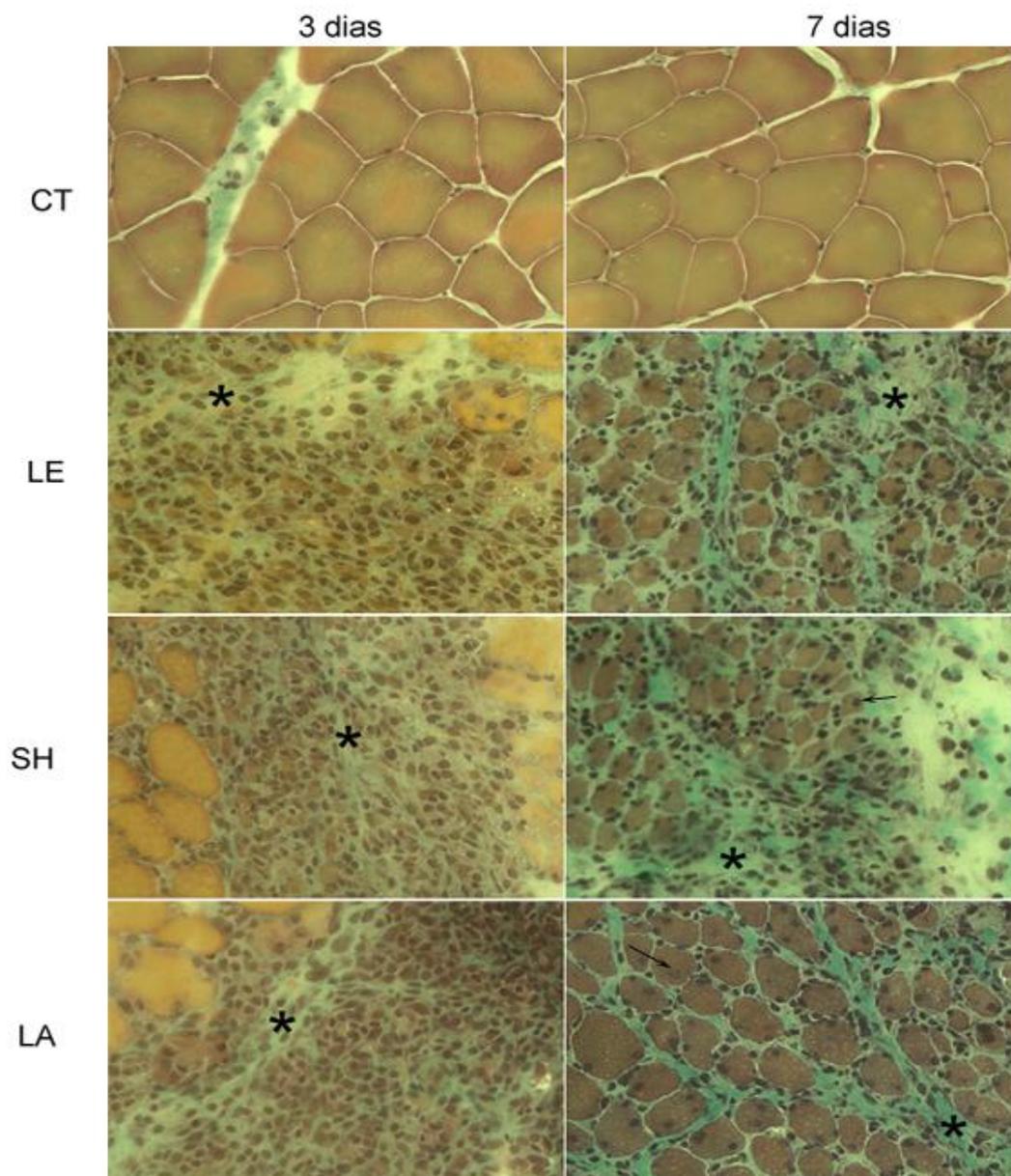


Figura 7 – Cortes transversais do músculo tibial anterior de ratos expostos à nicotina corados com Tricrômico de Masson, 3 e 7 dias após-tratamento. Nota-se o tecido conjuntivo em verde (*) e presença de fibras em regeneração nos grupos 7 dias, caracterizadas pela posição central do núcleo (seta). CT: controle; LE: lesão; SH: sham; LA: laser. Aumento de 28 x.

Mediante a predisposição do tecido exposto à nicotina para a formação de fibrose durante o processo de regeneração muscular, também se considerou importante verificar o conteúdo de uma citocina envolvida na formação de colágeno, o TGF- β 1.

Verificou-se que o grupo SH3 e SH7 apresentou o conteúdo de TGF- β 1 significativamente elevado em comparação aos demais grupos (Figura 8).

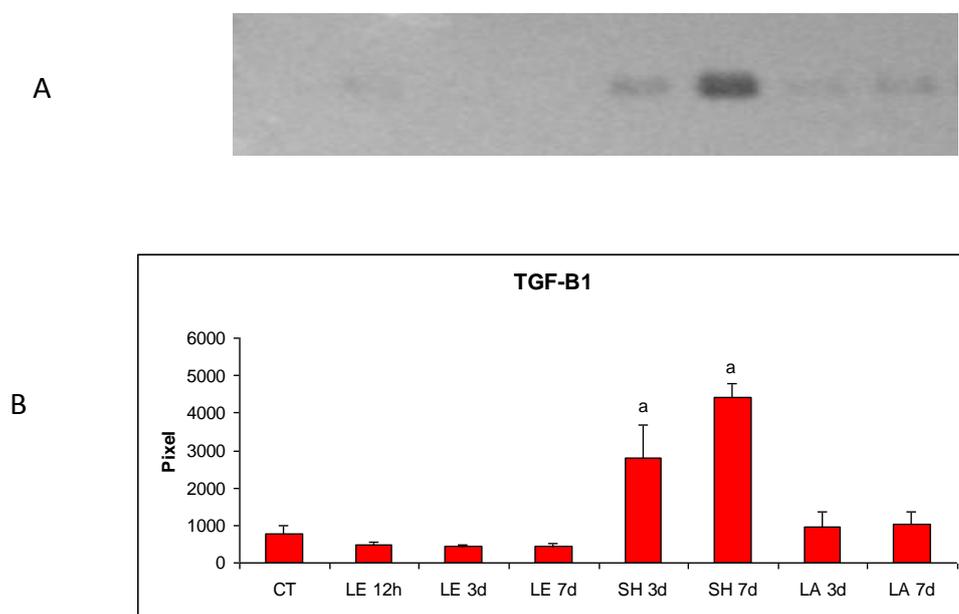


Figura 8 – Comparação do conteúdo de TGF- β 1 durante as fases da regeneração muscular em todos os grupos experimentais. A: bandas imunoreativas; B: quantificação em pixel. CT: controle; LE: lesão; SH: sham; LA: laser.

^a Grupos SH 3d e 7d diferem de todos os grupos ($p < 0,01$).

5. DISCUSSÃO

Dentre o tratamento proposto neste estudo, observou-se uma melhora significativa quanto a maturação das fibras da área de secção transversa nos grupos tratados com laser de baixa intensidade 3 e 7 dias após a lesão. A quantidade de tecido conjuntivo foi reduzida no grupo laser 7 dias (LA7), o que indica que o uso da LLLT favoreceu a regeneração muscular e manteve os níveis normais da citocina TGF- β 1 nos grupos LA3 e LA7.

Em relação ao desenvolvimento dos animais observou-se uma deficiência no ganho de peso dos ratos nos primeiros meses de ingestão de nicotina, entretanto não houve diferença estatística entre os grupos analisados. Sabe-se que o hábito de fumar pode promover leve perda de apetite, devido aos efeitos neuroquímicos, como a liberação de dopamina, noradrenalina e serotonina, o que pode se assemelhar aos efeitos de alguns medicamentos antidepressivos, que devido sua ação ante a ansiedade do indivíduo, promove a redução no apetite (Jones e Benowitz, 2002).

No aspecto farmacológico, a nicotina exerce sua ação ligando-se a receptores colinérgicos nicotínicos (nAChR), os quais são compostos por diferentes combinações de cadeias de polipeptídios, presentes nos gânglios autonômicos, junção neuromuscular e sistema nervoso central. As combinações dessas subunidades estão dispostas na membrana celular formando um canal iônico, assim, a ligação da nicotina com esses receptores induz alterações conformacionais promovendo o influxo de cátions (Na^+ e Ca^{2+}). Em áreas específicas do sistema nervoso central, a nicotina ao interagir

com nAChRs pré-sinápticos localizados nos terminais dos axônios resulta no aumento da liberação de vários neurotransmissores (Picciotto et al., 2000).

O efeito da nicotina é decorrente da ativação de um substrato neurobiológico, o sistema dopaminérgico meso-corticolímbico e a sensibilização comportamental resulta de alterações moleculares desse sistema, que são induzidas pela exposição prolongada às drogas (Wise e Bozarth, 1987; Robinson e Berridge, 2001).

Sugere-se que haja ativação do sistema dopaminérgico meso-corticolímbico promovendo o circuito de recompensa, que tem como principais componentes a área tegmental ventral (sítio de corpos celulares de neurônios dopaminérgicos) e suas projeções para regiões do sistema límbico incluindo o núcleo acumbens, o tubérculo olfativo, a amígdala e o córtex frontal e límbico (Koob e Le Moal, 2001).

Importante salientar que estas áreas são responsáveis por emitir grupos neuronais que modificam o perfil de controle das funções cardíacas, e que podem promover as alterações na pressão arterial como as descritas neste trabalho.

O envolvimento do sistema mesolímbico foi demonstrado através de técnica de ressonância magnética, após a administração intravenosa de nicotina (0,75; 1,50 e 2,25 mg/70 kg). Os autores demonstraram que a nicotina ativa o núcleo acumbens, a amígdala, o tálamo límbico e o lobo cortical frontal e modifica o controle autonômico das funções cardíacas. Outro aspecto importante é que no circuito há liberação de dopamina, no núcleo acumbens trazendo bem estar, mascarando a sobrecarga do sistema cardiovascular (Green et al., 2002)

Com ênfase no sistema cardiovascular sugere-se que a nicotina atuando na via adrenérgica, via receptores colinérgicos nicotínicos, ativam gânglios autonômicos com subsequente liberação de noradrenalina pós-ganglionar e adrenalina da medula supra-renal. Este conjunto de efeitos clínicos se manifesta como taquicardia e hipertensão arterial (Franken et al., 1996), fato verificado e reiterado em nosso estudo.

Ainda é relatado o aumento da frequência cardíaca em tabagistas como resultado de vasoconstrição periférica e aumento da resistência periférica. Além disto, a nicotina, através de sua ação adrenérgica, predispõe à arritmias do tipo extrassístoles (Franken et al., 1980).

Considerando o efeito vasoconstritor periférico da nicotina e do possível aumento na síntese de colágeno provocado pela exposição à droga, este estudo teve como hipótese que a regeneração muscular nesses animais poderia estar comprometida, com o aumento da fibrose, e que o tratamento com a LLLT poderia reverter esse quadro.

Os resultados demonstram que a LLLT favoreceu a maturação das fibras em regeneração tanto 3 como 7 dias após a lesão muscular, pois os grupos tratados apresentaram aumento na quantidade de fibras musculares com maior área de secção transversa do que os outros grupos de período respectivo. Notou-se também uma redução de 53% e 40% na quantidade de tecido conjuntivo no grupo LA7 quando comparado aos grupos SH7 e LE7 respectivamente, sugerindo que o tratamento com a LLLT também favoreceu a redução da fibrose muscular. Entretanto, a área de inflamação/regeneração total não foi alterada com o tratamento.

No estudo de Ely et al. (2009), onde foi investigado o efeito da nicotina na viabilidade do retalho musculocutâneo abdominal em ratos, os animais receberam uma dose de nicotina de 2mg/kg, duas vezes ao dia, durante 28 dias de pré-operatório. Os animais foram submetidos ao procedimento de retalho na base caudal unilateral. Em avaliação feita por fotografias, 48 horas após o procedimento, notou-se uma área de necrose tecidual maior no grupo de animais que fizeram uso de nicotina. Os autores relacionam grande parte desta necrose à vasoconstrição no local. Raikin et al. (1998) atribui o efeito vasoconstritor da nicotina à estimulação de receptores nicotínicos nas paredes dos vasos sanguíneos e pelo efeito vasoconstritor de catecolaminas produzidas pela glândula adrenal em resposta à nicotina circulante.

Skinovsky (2000) analisou em anastomose do intestino delgado de ratos, que no grupo de animais onde foi administrada nicotina na dose de 2 mg/kg, duas vezes ao dia por 28 dias, observou-se redução na proliferação de fibroblastos no 7º dia de pós-operatório, redução na área ocupada por colágeno imaturo no 28º em relação ao grupo controle. Essa diminuição da síntese de colágeno pode pré-dispor a região em cicatrização à fibrose.

Medeiros et al. (2003) implantaram discos de nicotina (Nicotinell TTS ®) no espaço subcutâneo de ratos na dosagem de 5 mg/kg/dia em dias alternado, e disco de celulose em animais do grupo controle, ambos submetidos à cirurgia de laparotomia exploratória. O estudo demonstrou diminuição dentre os animais do grupo nicotina na tensão do oxigênio tecidual, analisado pela coleta de líquido seroso do tecido subcutâneo. Observou-se também diminuição na resistência à tração da camada musculoaponeurótica, além de uma redução

quantitativa na densidade de elementos da reação inflamatória, como os fibroblastos, neutrófilos, neovasos, tecido de granulação e colágeno.

No estudo de Wong et al. (2004), culturas celulares de fibroblastos embrionários sofreram alterações no seu citoesqueleto, quando expostas a uma quantidade de fumaça de cigarro equivalente a inalada por um fumante passivo. Essas alterações citoesqueléticas podem promover diminuição da migração dos fibroblastos. Além disso, no mesmo trabalho foram encontradas alterações da endomembrana com vacuolização do citosol, diminuição do complexo de Golgi e fragmentação do retículo endoplasmático.

Saldanha et al. (2004) em estudo feito com cães analisaram defeitos ósseos criados cirurgicamente na mandíbula dos animais, após administração de nicotina na dosagem de 2mg/Kg/dia durante 4 meses. O grupo nicotina demonstrou diminuição na densidade óssea do osso recém-formado em relação ao grupo controle, atribuída aos efeitos adrenérgicos da nicotina que age em pequenos vasos promovendo vasoconstrição, inibindo a angiogênese e diminuindo a atividade osteoblástica durante o período de revascularização da área que sofreu a fratura.

Em outro estudo, os animais submetidos à cirurgia do tendão do supra-espinal foram divididos em dois grupos, controle e nicotina. Os animais do grupo nicotina apresentaram alterações mecânicas no tendão, tendo este apresentado menor resistência no teste de força máxima. Também foi constatado aumento na quantidade de colágeno tipo III, considerado de baixa qualidade para a regeneração, pois é o tipo de colágeno de maior prevalência em casos de formação de fibrose (Galatz et al., 2006).

Mesmo com diversos estudos demonstrando que o uso da nicotina é um fator prejudicial ao processo de regeneração muscular, a terapia com laser foi efetiva nesta fase inicial da lesão. A LLLT com dose de 2,6 J/cm² e comprimento de onda de 685 nm durante 5 dias consecutivos no músculo tibial anterior foi suficiente para promover o aumento da enzima lactato desidrogenase (LDH), indicando ação de leucócitos, eritrócitos e miócitos, e da enzima citrato sintase (CS), que refere um aumento da densidade mitocondrial, o que favoreceu uma melhora da área de secção transversa nos animais tratados (Amaral, Parizotto e Salvini, 2001).

Outro estudo demonstrou que o laser HeNe irradiado a 31,2 J/cm² e comprimento de onda de 632,8 nm irradiados por 5 dias consecutivos, favoreceu a curto prazo a área de secção transversa, e após 14 e 30 dias a formação de miofibrilas no tecido muscular de rãs submetidas à criolesão (Bibikova e Oron, 1992). Em outro estudo com o mesmo modelo animal e protocolo foi constatado aumento da angiogênese mostrando que a LLLT acelerou o processo de revascularização do músculo lesionado (Bibikova e Oron, 1994).

Rodrigues (2009) analisou o padrão regenerativo do músculo após aplicação do laser de 830 nm e potência de 30 mW em animais jovens e idosos submetidos à criolesão, com densidade de energia de 30 J/cm², em um único ponto, diariamente durante 5 sessões de tratamento. A morfometria revelou que a área da lesão foi significativamente reduzida nos animais jovens em todos os parâmetros estudados.

Estudos demonstram que a terapia com LLLT promove sobre a lesão muscular efeitos como o aumento da síntese de colágeno, da proliferação de

fibroblastos, da atividade mitocôndrial, na formação de miotubos, neovaso e miofibrilas, alinhamento das fibras de colágeno, redução na quantidade de radicais livres e o aumento da angiogênese (Bibikova e Oron, 1992; Bibikova e Oron, 1994; Amaral, Parizotto e Salvini, 2001; Galatz et al., 2006; Rodrigues, 2009; Rennó et al., 2011; Assis et al., 2012).

O sucesso da terapia com laser de baixa intensidade depende do tipo, dosagem, do comprimento de onda, da frequência e da técnica de aplicação para que assim sejam atingidos os efeitos biomoleculares desejados sobre o tecido irradiado (Bibikova e Oron, 1994; Ortiz et al., 2001; Rodrigues, 2009).

No estudo de Pertille, Macedo e Oliveira (2012) a terapia com laser de diodo GaAlAs com comprimento de onda de 830nm foi efetiva no tratamento de ratos idosos submetidos a contusão muscular do músculo tibial anterior, pois os grupos tratados com laser por 21 dias demonstraram melhora quanto a área de secção transversa, área de inflamação/regeneração total, e quanto aos conteúdos de MyoD, Miogenina e TGF- β 1.

Associado ao comprimento de onda de 830nm foi utilizada a potência de 30 mW, e dose 20J/ cm². Protocolo adaptado do estudo de Rennó et al. (2011) onde foi comparado o efeito do LLLT (comprimento de onda de 830 nm, potência de 30mW e dose de 50 J/ cm²) com o do ultrassom pulsado, onde o grupo de animais tratados com laser apresentou melhora significativa na regeneração muscular em relação ao ultrassom após criolesão.

O fator de crescimento TGF- β 1 é uma citocina que tem como característica acelerar a proliferação dos fibroblastos devido suas propriedades fibrogênicas, e é visto como um fator responsável pela indução de fibrose em diversos tecidos lesionados (Crawford et al., 1998).

Essa citocina exerce função sobre o estado de repouso das células satélites, podendo assim atrapalhar a resposta fisiológica das mesmas durante a regeneração muscular, principalmente no processo de preservação da arquitetura do músculo e sua função (Cohn et al., 2007).

O maior conteúdo de TGF- β 1 encontrado nos grupos Sham 3 e 7 dias, pode estar relacionado com estresse do manuseio dos animais e ao fator fagocitário do cortisol, pois a elevação brusca do nível de cortisol durante a regeneração muscular desregula a proliferação linfocitária, e após o momento de estresse eleva o número de neutrófilos (Costa Rosa e Vaisberg, 2002).

Com base nos resultados obtidos neste estudo, sugere-se que sejam realizadas novas pesquisas utilizando este modelo experimental, envolvendo grupos de animais submetidos à ingesta de nicotina, criação e tratamento com LLLT em períodos mais longos, como 14 e 21 dias, utilizando o mesmo protocolo de aplicação. Além disso, foi observada a necessidade de um grupo de animais submetidos ao mesmo protocolo, porém sem uso de nicotina para comparação de resultados.

6. CONCLUSÃO

Conclui-se que poucos dias de uso de nicotina são suficientes para provocar alterações hemodinâmicas, como o aumento da pressão arterial e uma sobrecarga cardíaca. Para este modelo experimental o tratamento com a LLLT após criolesão foi efetivo, favorecendo a maturação das fibras musculares em processo de regeneração nos períodos de 3 e 7 dias, além de reduziu a quantidade de tecido conjuntivo no grupo irradiado por 7 dias, assim promovendo uma regeneração muscular mais eficiente.

Nota-se a necessidade de conhecer os hábitos de vida do paciente que procura por atendimento fisioterapêutico, pois fatores como envelhecimento e o fumo podem interferir no processo de regeneração do músculo esquelético.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abood LG, Reynolds DT, Booth H, Bidlack JM. Sites and mechanisms for nicotine's action in the brain. *Neurosci Biobehav Rev.* 1981; 5: 479-86.

Aimbire F, Albertini R, Pacheco MT, et al. Low-level laser therapy induces dose-dependent reduction of TNF alpha levels in acute inflammation. *Photomed Laser Surg.* 2006; 24: 33-7.

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

Asencio AF, Martinez, SF. Stimulation of healing of Experimental Colon Anastomose by low power lasers. *British Journal Surgery.* 1988; 75; 125-7.

Assis L, Moretti AI, Abrahao TB, de Souza HP, Hamblin MR, Parizotto NA. Low-level laser therapy (808 nm) contributes to muscle regeneration and prevents fibrosis in rat tibialis anterior muscle after cryolesion. *Lasers Med Sci.* 2012; 10: 1120-83.

Balbani AP, Montovani JC. Methods for smoking cessation and treatment of nicotine dependence. *J Braz Otorhinolaryngol.* 2005; 71: 820-47.

Balboni GC, Brandi ML, Zonefrati R, Repice F. Effects of He-Ne/I.R. laser irradiation on two lines of normal human fibroblasts in vitro. *Arch Ital Anat Embriol.* 1986; 91:179-88.

Beckers S, Camu F. The anesthetic risk of tobacco smoking. *Acta Anaesthesiol Belg.* 1991; 42: 45-56.

Benowitz NL. Clinical pharmacology of inhaled drugs of abuse: Implications in understanding nicotine dependence. In: Chiang CN, Hawks RL. *Research Findings on Smoking of Abused Substance.* Washington DC. NIDA Res Monogr. 1990; 12: 1159-67.

Benowitz NL. Cigarette smoking and nicotine addiction. *Med Clin North Am.* 1992; 76: 415-37.

Benowitz NL. Pharmacologic aspects of cigarette smoking and nicotine addiction. *New England J Med.* 1988; 318: 1330-34.

Benowitz NL. Pharmacodynamics of nicotine, implication for rational treatment of nicotine addiction. *Br J Addict.* 1991; 86: 495-9.

Benowitz NL. Pharmacology of nicotine: Addiction and Therapeutics. *Annu. Rev. Pharmacology Toxicol.* 1996; 36: 597-613.

Bibikivoa A, Oron U. Attenuation of the process of muscle regeneration in the toad gastrocnemius muscle by low energy laser irradiation. *Lasers Surg Med.* 1994; 14(4): 352-60.

Bibikova A, Oron U. Promotion of muscle regeneration in toad (*Bufo viridis*) gastrocnemius muscle by low-energy laser irradiation. *The Anatomical Record.* 1992; 235: 374-80.

Caram LMO, Ferrari VR, Tanni SE, Coelho LS, Godoy I, Santos MR. Perfil de fumantes atendidos em serviço público para tratamento do tabagismo. *J Bras Pneumol.* 2009; 35(10): 980-5.

Cohn RD, Van Erp C, Habashi JP, Soleimani AA, Klein EC, Lisi MC, Gamradt M, Rhys CM, Holm TM, Loeys BL, Ramirez F, Judge DP, Ward CW, Dietz HC, Angiotensin II type 1 receptor blockade attenuates TGF-beta-induced failure of muscle regeneration in multiple myopathic States. *Nat Med.* 2007; 13: 204-10.

Costa Rosa LF, Vaisberg MW. Influência do exercício na resposta imune. *Rev Bras Med Esporte.* 2002; 8: 167-72.

Crawford SE, Stellmach V, Murphy-Ullrich JE, Ribeiro SMF, Lawler J. Thrombospondin-1 is a major activator of TGF- β 1 in vivo. 1998; 93: 1159-70.

Cruães JC. *La Terapia Laser. hoy.* Barcelona, Centro Documentation laser the Meditec. 1984: 164.

De Assis EM, Pimenta LG, Costa e Silva E, Souza PE, Horta MC. Stromal myofibroblasts in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2012; 17(5): 733-38.

Ely PB, Kobayashi LA, Campos JHO, Gomes HC, Juliano Y, Ferreira, LM. Nicotine on rat TRAM flap. *Acta Cir Bras*. 2009; 24(3): 216-20.

Ferrari RJ, Picchi LD, Botelho AP, Minamoto V. Processo de regeneração na lesão muscular: uma revisão. *Fisioterapia em Movimento*. 2005; 18 (2): 63-71.

Fillipin LI, Mauriz JL, Vedovelli K, Moreira AJ, Zettler CG, Lech O, Marroni NP, Gonzalez-Gallego J. Low-level laser therapy (LLLT) prevents oxidative stress and reduces fibrosis in rat traumatized Achilles tendon. *Lasers Surg Med*. 2005; 37: 3300-2.

Franken RA, Martinez EE, Sasso SW. Histoquímica da fibra muscular cardíaca de ratos jovens e senis sob a influência da nicotina. *Arq Bras Cardiol*. 1980; 34: 289-93.

Franken RA, Nitrini G, Franken M, Fonseca AJ, Leite JCT. Nicotina: Ações e Interações. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 1996; 66(6): 261-7.

Fрати AC, Iniestra F, Ariza CR.: Acute effect of cigarette smoking on glucose tolerance and other cardiovascular risk factors. *Diabetes Care* 1996;19:112-18.

Galatz LM, Sandell LJ, Rothermich SY, et al. Characteristics of the rat supraspinatus tendon during tendon-to-bone healing after acute injury. *J Orthop Res.* 2006; 24(3): 541-50.

Gavish L, Perez L, Gertz SD. Low-level laser irradiation modulates matrix metalloproteinase activity and gene expression in porcine aortic smooth muscle cells. *Lasers Surg Med.* 2006; 38: 779-86.

Green TA, Crooks PA, Bardo MT, Dwoskin LP. Contributory Role for Nicotine in Nicotine Neuropharmacology: Nicotine-Evoked [³H]Dopamine Overflow from Rat Nucleus Accumbens Slices *Biochem. Pharmacol.* 2002; 15(12): 1597-603.

Grounds MD, Torrisi J. Anti-TNF α (Remicade) therapy protects dystrophic skeletal muscle from necrosis. *FASEB J.* 2004; 18: 676-82.

Grounds MD, Davies M, Torrisi J, Shavlakadze T, White J, Hodgetts S. Silencing TNF α activity by using Remicade or Enbrel blocks inflammation in whole muscle grafts: an in vivo bioassay to assess the efficacy of anti-cytokine drugs in mice. *Cell Tissue Res.* 2005; 320(3): 509-15.

Ichinose R, Sano H, Kishimoto K N, Sakamoto N, Sato M, Itoi E. Alteration of the material properties of the normal supraspinatus tendon by nicotine treatment in a rat model. *Acta Orthop.* 2010; 81: 634-8.

Instituto Nacional de Câncer. Inquérito domiciliar sobre comportamento de risco e morbidade referida de doenças e agravos não transmissíveis.

Brasil, 15 capitais e Distrito Federal. 2002-2003.

Jaques TA. Impasses e estratégias : convenção-quadro e controle do tabagismo no Brasil (1986-2005) [Mestrado]. Rio de Janeiro Fundação Oswaldo Cruz. 2010; 130.

Järvinen TA, Kääriäinen M, Järvinen M, Kalimo H. Muscle strain injuries. *Curr Opin Rheumatol*. 2005; 12(2): 155 - 61.

Jones RT, Benowitz NL. Therapeutics for nicotine addiction. *Neuropsychopharmacology: The fifth generation of progress*. 2002; 107: 1533-43.

Koob GF, Le Moal M. Drug Addiction, Dysregulation of Reward, and Allostasis. *Neuropsychopharmacology*. 2001; 24(2): 97-129.

Krege JH, John SW, Langenbach LL, Hodgin JB, Hagaman JR, Bachman ES, Jennette JC, O'Brien DA, Smithies O. Male-female differences in fertility and blood pressure in ACE-deficient mice. *Nature*. 1995; 375: 146-148.

Larsson L, Orlander J, Ansved T, Edstrom L. Effects of chronic nicotine exposure on contractile enzyme-histochemical and biochemical properties of

fast- and slow-twitch skeletal muscles in the rat. *Acta Physiol Scand.* 1988; 134: 519-27.

Marques MJ, Machado RV, Minatel E, Santo Neto H. Disodium cromoglycate protects dystrophin-deficient muscle fibers from leakiness: studies in mdx sternomastoid, diafragma and tibialis anterior. *Muscle Nerve.* 2008; 37(1): 61-7.

Martinez AET, Silvério KG, Rossa J C, Efeito da nicotina na viabilidade e morfologia de fibroblastos – estudo in vitro. *Pesq Odontol Bras.* 2002; 16(3): 234-8.

Medeiros AC, Lima FP, Dantas Filho AM, Melo NMC, Azevedo IM. A nicotina atua como efeito deletério na reparação da parede abdominal. *Acta Cir Bras.* 2003; 18(1): 19-23.

Moreira OSM. Efeito do laser de baixa intensidade sobre a regeneração do músculo esquelético em camundongos através da análise de expressão gênica com branched de DNA [tese de doutorado]. Universidade Federal de São Carlos. 2008.

Musk AW, De Klerk NH. History of tobacco and health. *Respirology* 2003; 8: 286-90.

Ortiz MCS, Carrinho PM, Santos AAS, Gonçalves RC, Parizotto NA. Laser de baixa intensidade: princípios e generalidades. Parte 1. Fisioterapia Brasil. 2001; 2: 221-40.

Oshida Y, Yamanouchi IK, Hayamizu S, Sato Y. Longterm mild jogging increases insulin action despite no influence on body mass index or VO2 max. J Appl Physiol. 1989; 66: 2206-10.

Pertille A, Macedo AB, Oliveira CP.

Picciotto MR, Calderone BJ, King SL, Zachariou V. Nicotine Receptors in Brain: Links between Molecular Biology and Behavior. Neuropsychopharmacology. 2000; 22: 451-64.

Pinto SS, Castilho AA. Lesão muscular: fisiopatologia e tratamento. Rev Fisioter Mov. 1999; 12(2): 23-6.

Porter M. Therapeutic lasers. Equine Veterinary Science. 1992; 12: 49-56.

Price TB, Krishnan-sarin S, Rothman DL. Smoking impairs muscle recovery from exercise. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2003; 285: 116-22.

Raikin SM, Landsman JC, Alexander VA, Froimson MI, Plaxton NA. Effect of nicotine on the rate and strength of long bone fracture healing. Clin Orthop. 1998; 353: 231-37.

Rennó ACM, Toma RL, Feitosa SM, Fernandes K, Bossini PS, De Oliveira P. Comparative effects of low-intensity pulsed ultrasound and low-level laser therapy on injured skeletal muscle. *Photomed Laser Surg*; 2011; 29(1): 5-10.

Robinson TE, Berridge KC. Incentive-Sensitization and Addiction. 2001; 96: 14 - 103.

Rodrigues NC . Ação da laserterapia de baixa intensidade (830nm) na regeneração muscular de ratos idosos. [Mestrado] Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2009.

Rosemberg J. Nicotina: Droga Universal. São Paulo: SES/CVE. 2003: 52-174.

Rothman DL, Shulman RG, Shulman GI. ³¹P NMR measurements of muscle glucose-6-phosphate. Evidence for reduced insulin dependent muscle glucose transport or phosphorylation activity in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest*. 1992; 89: 1069-75.

Saldanha JB, Pimentel SP, Casati MZ, Sallum EA, Barbieri D, Moreno HJ. Guided bone regeneration may be negatively influenced by nicotine administration: a histologic study in dogs. *J Periodontol* . 2004; 75: 565-71.

Skinovsky JA. A influência da nicotina na cicatrização de anastomoses do intestino delgado em ratos [Dissertação]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná. 2000.

Silverstein P, Smoking and wound healing. American Journal of Medicine.1992; 93: 22-24.

Taylor P. Agentes que Atuam na Junção Neuromuscular e nos Gânglios Autônomos, em: Goodman & Gilman - As Bases Farmacológicas da Terapêutica. Rio de Janeiro: McGraw Hill. 1996; 9: 131-45.

Vladimirov YA, Osipov AN, Klebanov GI. Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation. Biochemistry. 2004; 69(1): 103-13.

Wise RA, Bozarth MA. A Psychomotor Stimulant Theory of Addiction. Psychol Rev. 1987; 94: 469-92.

Wong B C, Jiang XH, Lin M C, Tu SP, Cui JT, Jiang SH, Wong WM, Yuen MF, Lam SK, Kung HF. Cyclooxygenase-2 inhibitor (SC-236) suppresses activator protein-1 through c-Jun NH2-terminal kinase. Gastroenterology. 2004; 126: 136-47.

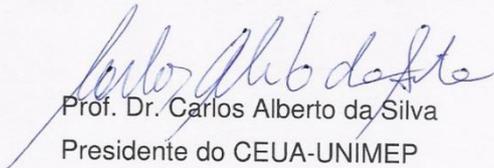
Piracicaba, 16 de maio de 2012

Para: Profa. Adriana Pertille
De: Comissão de Ética no Uso de Animais
Ref.: Aprovação do protocolo de pesquisa nº 02/12

Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Metodista de Piracicaba **APROVOU** o protocolo de pesquisa nº **02/12** intitulado “*Avaliação da regeneração muscular de ratos expostos a nicotina tratados com Laser*” analisado por esta comissão.

Atenciosamente,



Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva
Presidente do CEUA-UNIMEP

Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva
Presidente do CEUA-UNIMEP