

UNIVERSIDADE METODISTA DE PIRACICABA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

Avaliação da regeneração muscular em animais idosos após tratamento
com ultrassom e laser de baixa intensidade

Aline Barbosa Macedo

2012

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aline Barbosa Macedo

AVALIAÇÃO DA REGENERAÇÃO MUSCULAR
EM ANIMAIS IDOSOS APÓS TRATAMENTO
COM ULTRASSOM E 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
2012

Macedo, Aline Barbosa.

Avaliação da regeneração muscular em animais idosos após tratamento com ultrassom e laser de baixa intensidade / Aline Barbosa Macedo – Piracicaba, 2012.

58 f.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências da Saúde – Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia / Universidade Metodista de Piracicaba. Orientador (a): Profa. Dra. Adriana Pertille.

I. Envelhecimento. 2. Regeneração. 3. Terapia por ultrassom.

4. Terapia a laser de baixa intensidade. I. Pertille, Adriana. II. Título.

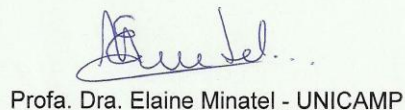
CDU: 615.8

Os membros da Banca Examinadora da Defesa de Dissertação de Mestrado de **ALINE BARBOSA MACEDO** apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia, em Sessão Pública realizada aos catorze dias do mês de fevereiro de 2012, consideraram o(a) candidato(a) aprovado(a).

BANCA EXAMINADORA:


Prof. Dra. Adriana Pertille - UNIMEP


Prof. Dra. Delaine Rodrigues Bigaton - UNIMEP


Prof. Dra. Elaine Minatel - UNICAMP

Pelo amor incondicional que me motiva e faz com que eu me sinta completa, dedico este trabalho à minha família.

AGRADECIMENTOS

Realizar um sonho é uma escolha árdua que requer muita dedicação, esforço e privações, porém ao longo do caminho encontramos pessoas que ajudam a tornar essa tarefa mais leve. Por isso tenho muito a agradecer.

A Deus e Nossa Senhora que guiam minha vida, iluminando meu caminho e minhas escolhas. Muito obrigada por esta e todas as outras graças alcançadas!

Ao meu pai, José Macedo, por nunca ter medido esforços para apoiar e proporcionar meus sonhos, mas sempre me ensinado a seguir os princípios morais na vida e valorizar o estudo. O que me incentiva é a vontade de lhe orgulhar e retribuir tudo o que fez e continua a fazer por nossa família. Obrigada por confiar em mim!

À minha mãe, amiga e revisora de textos, Maria Auxiliadora, pela sua dedicação extrema, sempre se esforçando para ajudar e estar presente, independente da distância. Obrigada por não deixar que eu me sinta sozinha!

Aos meus irmãos, Samuel e Saulo, por todo carinho, cumplicidade e proteção. Sou muito feliz em tê-los ao meu lado. Obrigada por cuidarem dos nossos pais mais de perto!

À Profª Drª Adriana Pertille por toda paciência, carinho e incentivo na orientação, não apenas desta pesquisa, mas da minha vida acadêmica. Agradeço a Deus por ter cruzado nossos caminhos. Foi uma honra ser sua primeira orientanda. Obrigada por tudo!

A Glaucio Azevedo, por todo companheirismo, desde aceitar o desafio de namorar a distância até estar ao meu lado nos momentos bons e ruins desses dois anos. Obrigada por me incentivar a seguir em frente!

A Cassio Pedro de Oliveira, por ter sido meus braços, direito e esquerdo, nesta jornada. Sua ajuda foi imprescindível, os domingos e feriados cuidando dos ratinhos se tornaram mais agradáveis com sua companhia.

Aos companheiros de mestrado, em especial, Elvyna, Lara, Carmelita, Michelle, Cesar, Ana Cláudia, Almir, Amanda, Elisabete e Thiago, pessoas tão diferentes, mas unidas por um objetivo comum. Agradeço desde a ajuda, o apoio, até as risadas e os lanches compartilhados que tornaram esse período menos saudosos e mais divertidos.

Ao Instituto de Biologia da UNICAMP, em especial à Prof^a Dr^a Maria Julia Marques, por disponibilizar os laboratórios e contribuir para a realização desta pesquisa.

À Prof^a Dr^a Elaine Minatel e Prof^a Dr^a Delaine Rodrigues Bigaton pela importante contribuição neste trabalho, através das considerações propostas na banca de qualificação.

Ao corpo docente do PPG-Ft por todo aprendizado durante as reuniões do Conselho de Curso. Foi enriquecedor poder participar e entender de perto o empenho de todos vocês em prol da qualidade e do crescimento deste curso.

RESUMO

O processo de envelhecimento, e as conseqüentes alterações morfofisiológicas dele decorrentes, desencadeiam a redução da habilidade regenerativa das células satélites, redução da vascularização tecidual e aumento da produção de fibroblastos, desenvolvendo-se, por fim, um ambiente celular desfavorável para a ativação e sustentação de um mecanismo regenerativo adequado. Nesse sentido, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito do tratamento com ultrassom e laser de baixa intensidade sobre a regeneração muscular de modelos experimentais idosos após contusão. Para o experimento foram utilizados 45 ratos Wistar, com 18 meses de idade, divididos em cinco grupos experimentais: G. controle (CT), cujos animais permaneceram sem nenhum tipo de intervenção; G. lesão (LE), os animais foram submetidos à contusão muscular e não receberam nenhum tipo de tratamento; G. ultrassom (US), que após a contusão recebeu tratamento com ultrassom pulsado de 1 MHz; G. laser (LA), cujos animais foram tratados com laser de baixa intensidade ($\lambda=830$ nm) após a contusão e, por fim, G. laser+ultrassom (LA+US), que receberam ambas as terapias após a contusão. Os animais foram submetidos à contusão não invasiva no músculo Tibial Anterior e as amostras coletadas após 7 e 21 sessões de tratamento. A análise da regeneração muscular foi realizada 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. Nos resultados obtidos a análise histológica demonstrou que após 21 dias de tratamento houve redução significativa na área de inflamação/regeneração nos grupos LA 21 e LA+US 21 comparados ao grupo LE 21. Com relação à área de secção transversal das fibras em processo de regeneração, nenhuma das terapias utilizadas foi capaz de melhorar a maturação das fibras musculares. A análise molecular evidenciou que o conteúdo de MyoD apresentou-se estatisticamente reduzido nos grupos LE 21 e US 7 em relação ao CT, enquanto que os demais grupos tiveram o conteúdo de MyoD semelhante ao do grupo CT. O conteúdo de Miogenina exibiu aumento no LE 21 em comparação ao CT, por fim o conteúdo de TGF- β 1 dos grupos LE 21 e LA+US 7 exibiu aumento em relação ao grupo CT. Conclui-se que, das terapias aplicadas e seus respectivos parâmetros, o laser demonstrou eficácia para a regeneração muscular em animais idosos somente através do seu efeito anti-inflamatório.

Palavras-chave: Envelhecimento, Regeneração, Terapia por ultrassom, Terapia a Laser de Baixa Intensidade.

ABSTRACT

The aging process and the morphophysiological changes resulting from it, triggering a reduction in regenerative ability of satellite cells, reducing vascular tissue and increasing production of fibroblasts, developing, finally, a cellular environment unfavorable for the activation and maintenance of a regenerative mechanism appropriate. Thus, the aim of this study was to evaluate the effect of pulsed ultrasound and low-level laser therapy treatment on muscle regeneration of the old experimental models after contusion. Wistar old rats with 18 months old were divided in five groups: G. control (CT), the animals received no treatment; G. injury (IN), the animals were submitted to muscle contusion and received no treatment; G. ultrasound (US), after the contusion the animals were treated with pulsed ultrasound 1 MHz; G. laser (LA), after the contusion the animals were treated with low-level laser therapy ($\lambda=830$ nm); and G. laser+ultrasound (LA+US), after the contusion the animals were treated with both therapies. The non-invasive contusion was induced in Tibialis Anterior muscle and the samples were collected after 7 and 21 sessions of treatment. The muscle regeneration was evaluated by Light Microscopy and Immunoblotting. The data were statistically analyzed by one-way ANOVA and Tukey's tests for data with normal distribution, and for data with non-normal distribution was used the Kruskal-Wallis and SNK tests. The histological analysis showed that after 21 days of treatment there was significant reduction in the area of inflammation/regeneration of LA 21 and LA+US 21 groups compared to IN 21 group. About the cross-sectional area of fibers in regeneration process, no therapies used were able to improve the maturation of muscle fibers. Molecular analysis showed that the content of MyoD was statistically reduced in IN 21 and US 7 groups compared to CT group, while another groups have similar content of MyoD to CT group. The contents of Myogenin showed increased in IN 21 group compared to CT group. Ultimately, the content of TGF- β 1 on IN 21 and LA+US 7 showed high compared to the CT group. The results of the present study suggest that the laser therapy demonstrated to be effective for muscle regeneration in old rats, however only through its anti-inflammatory effect.

Keywords: Aging, Regeneration, ultrasound therapy, Low-Level Laser Therapy.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 8 |
| 2 OBJETIVO | 15 |
| 2.1 Objetivo Geral | 15 |
| 2.2 Objetivos Específicos | 15 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | 16 |
| 3.1 Animais | 16 |
| 3.2 Grupos Experimentais | 16 |
| 3.3 Procedimento para Produção da Contusão | 17 |
| 3.4 Tratamento | 18 |
| 3.5 Sacrifício dos Animais | 20 |
| 3.6 Técnica de Microscopia de Luz | 21 |
| 3.7 Técnica de Immunoblotting | 21 |
| 3.7.1 Preparação de Extrato Total | 21 |
| 3.7.2 Eletroforese | 22 |
| 3.8 Anticorpos | 23 |
| 3.8.1 Anticorpos Primários | 23 |
| 3.8.2 Anticorpos Secundários | 23 |
| 3.9 Análise dos Resultados | 23 |
| 3.9.1 Análise morfológica | 23 |
| 3.9.2 Análise Bandas Imunoreativas | 24 |
| 3.10 Análise Estatística | 24 |
| 4 RESULTADOS | 25 |
| 5 DISCUSSÃO | 34 |
| 6 CONCLUSÃO | 44 |
| REFERÊNCIAS | 45 |
| ANEXO | 58 |

1. INTRODUÇÃO

A função muscular pode ser prejudicada em qualquer fase da vida, entretanto, segundo Silva et al. (2006), a prevalência de incapacidade e dependência funcional é maior em idosos e está intimamente associada à redução da massa muscular, que ocorre até mesmo em indivíduos saudáveis. A sarcopenia é uma das variáveis utilizadas para definição da síndrome da fragilidade, altamente prevalente em idosos, conferindo maior risco para quedas, fraturas, incapacidade, dependência, hospitalização recorrente e mortalidade.

O músculo esquelético possui importante potencial regenerativo graças a uma população de células especiais com grande capacidade mitogênica. Localizadas nas miofibrilas, sobrepostas à membrana plasmática e abaixo da lâmina basal, as células satélites naturalmente permanecem em estado mitoticamente quiescente. Quando ativadas, em resposta a estímulos fisiológicos, como o exercício, e em condições patológicas, como lesões e doenças degenerativas, são capazes de gerar novos mioblastos e reparar danos causados a eles (Lieber, 2002; Chargé e Rudnicki, 2004; Gayraud-Morel, Chretien e Tajbakhsh, 2009; Tedesco et al., 2010).

Ao serem ativadas, as células satélites percorrem por alguns estágios até chegar a miogênese e, em cada um deles, elas expressam diferentes marcadores da linhagem miogênica. Ainda no estado de quiescência são expressos Pax7, CD34 e moléculas de adesão NCAM e M-caderina. Como consequência da ativação, rapidamente iniciam-se as fases de proliferação e diferenciação, nas quais são expressos MyoD e Myf5. Por fim, em um estágio mais tardio ocorre o final da diferenciação e início da maturação dos mioblastos,

com a expressão de Miogenina e MLC3F-tg (Füchtbauer e Westphal, 1992; Koishi et al., 1995; Rantanen et al., 1995; Creuzet et al., 1998; Zammit, Partridge e Yablonka-Reuveni, 2006; Brack e Rando, 2007).

A manutenção do potencial regenerativo do músculo esquelético depende da idade do indivíduo (Renault et al., 2000; Charge, Brack e Hughes, 2002). As alterações morfofisiológicas que ocorrem nos tecidos em decorrência do envelhecimento, contribuem para o declínio da habilidade das células satélites em reparar o tecido lesado (Young et al., 2004). Pesquisas relatam sobre a diminuição na quantidade de células satélites em decorrência do envelhecimento (Gibson e Shultz, 1983; Shefer et al., 2006), entretanto o número de células satélites remanescentes no tecido muscular envelhecido é suficiente para a ativação e sustentação de um mecanismo regenerativo adequado, se não houver a associação de um ambiente celular desfavorável (Carosio et al., 2009).

A ineficiência na ativação e proliferação das células satélites decorrente do desequilíbrio nas vias de sinalização Notch e Wnt, lenta ativação de células inflamatórias, aumento da produção de fibroblastos, diminuição da vascularização, espessamento da lamina basal e redução no nível de IGF-1 são algumas das alterações provenientes do envelhecimento, que geram um ambiente celular desfavorável e conseqüentemente prejudicam a regeneração muscular (Burdzińska, Gala e Paczek, 2008; Silva e Conboy, 2008; Desaki, 2008; Carosio et al., 2009, Degens, 2010).

O sucesso da regeneração depende do indivíduo, da extensão e da natureza da lesão, porém em todas as situações o processo envolve três fases

sobrepostas: inflamação, proliferação e remodelação (Pinto e Castillo, 1999; Ferrari et al., 2005; Järvinen et al., 2005).

A grande incidência de lesões musculares tem ocasionado aumento de estudos relacionados não somente ao processo de regeneração muscular, mas também aos tratamentos fisioterapêuticos (Ferrari et al., 2005). Os recursos terapêuticos mais utilizados nesses casos são: gelo (Salvini et al., 1997; Merrick et al., 1999), terapia por ultrassom (Rantanen et al., 1999; Wilkin et al., 2004), terapia por laser (Oliveira, Parizotto e Salvini, 1999; Barbosa et al., 2008), agentes anti-inflamatórios (Thorsson et al., 1998; Lapointe, Frémont e Côté, 2003), mobilização (Järvinen e Lehto, 1993; Järvinen et al., 2000; Faria et al., 2008) e imobilização (Lehto, Duance e Restall, 1985; Venojärvi et al., 2004).

O ultrassom terapêutico é um recurso comumente aplicado nas disfunções do sistema musculoesquelético, tais como aceleração do reparo tecidual de lesões musculares (Dyson, 1987). Refere-se a ondas mecânicas longitudinais de alta frequência, capazes de produzir alterações celulares por desencadear movimento molecular no tecido irradiado (Warden, 2003). A possibilidade de serem utilizadas diferentes frequências entre 1 e 3 MHz é importante pois abrange a utilização em diversos tipos de tecidos, uma vez que frequências mais altas (3 MHz) são absorvidas com maior intensidade, sendo específicas para o tratamento de tecidos superficiais, enquanto as frequências mais baixas (1 MHz) possuem maior penetração, recomendadas para os tecidos mais profundos (Docker, 1987).

Rantanen et al. (1999) realizaram estudo sobre os efeitos do ultrassom de 3 MHz na regeneração de fibras musculoesqueléticas após lesão no músculo

Gastrocnêmio de ratos. Utilizando técnicas de imunohistoquímica e morfometria evidenciaram a proliferação significativa de células satélites (96%) com o uso do ultrassom pulsado, intensidade de $1,5 \text{ W/cm}^2$, durante os primeiros estágios do reparo. Em outro estudo semelhante (Piedade et al., 2008), analisando o mesmo músculo, porém utilizando ultrassom pulsado de 1 MHz com intensidade $0,57 \text{ W/cm}^2$, foi encontrado aumento na deposição de colágeno após 4 e 14 dias de tratamento, além da formação de mioblastos e miotubos evidenciada após 14 dias de tratamento.

Chan et al. (2010) também observaram o efeito do ultrassom de 1.5 MHz no modo contínuo (intensidade 30 W/cm^2 e aplicado durante 20 min) na regeneração muscular em estudo *in vitro* e *in vivo*. Na análise *in vitro* aplicaram ultrassom pulsado em mioblastos C2C12 e quantificaram a multiplicação celular nos períodos de 2, 4, 6 e 8 dias. A técnica de *Western blot* evidenciou aumento na proliferação das proteínas Miogenina e Actina nos mioblastos que receberam a terapia durante 6 e 8 dias. Na análise *in vivo* foi realizada incisão cirúrgica no músculo Gastrocnêmio de camundongos jovens e após 24 h da lesão passaram a receber a terapia ultrassom durante 7, 14, 21 e 28 dias consecutivos. A morfometria evidenciou maior número de fibras musculares com o núcleo centralizado, em regeneração, nos grupos tratados durante 21 e 28 dias. Os testes utilizados para verificar a força muscular tetânica demonstraram que não houve diferença significativa na propriedade contrátil muscular, entre os grupos tratados e controle.

Outros autores sugerem ainda que os efeitos benéficos do ultrassom podem ser obtidos utilizando-se baixa intensidade ($0,5 \text{ W/cm}^2$), com aplicação por volta de cinco e seis minutos (Enwemeka, Rodriguez e Mendosa, 1990), no modo

pulsado a 20% (Dyson, 1982) resultando em baixa produção de calor (Carvalho et al., 2006). Parâmetros semelhantes foram utilizados por Matheus et al. (2008), que analisaram as propriedades mecânicas de músculos tratados com ultrassom de 1 MHz e 3 MHz, não sendo observada diferença significativa entre os grupos.

Outro recurso utilizado na lesão muscular é o laser. A terapia laser de baixa intensidade (*Low-Level Laser Therapy* - LLLT) é um recurso fisioterapêutico que possui propriedades especiais, capaz de produzir efeitos bioquímicos e fisiológicos nos tecidos (Ortiz et al., 2001). Estudos sugerem que em tecidos irradiados, os primeiros eventos fotoquímicos e fotofísicos acontecem nas mitocôndrias, através da enzima Citocromo c oxidase, cujas alterações respiratórias são explicadas como resultado, tanto de mudanças estruturais, (Bakeeva et al., 1993; Manteifel, Bakeeva e Karu, 1997; Baratto et al., 2011) quanto de alterações químicas (metabólicas) nessa organela citoplasmática, podendo ocorrer no potencial da membrana (Passarella et al., 1988) e/ou em atividades enzimáticas (Pastore et al., 1996; Wilden e Karthein, 1998), todas contribuindo para a maior disponibilidade de energia para ser utilizada na atividade celular.

Nogueira (2006), observou as alterações causadas pela irradiação do laser de AsGa (660 nm) com dose de 2 J/cm^2 , no músculo Gastrocnêmio de ratos Wistar adultos, após lesão cirúrgica. Na análise histopatológica foi observada a presença de células inflamatórias, fibroblastos, vascularização e deposição de colágeno, entretanto não houve diferença significativa entre os grupos controle e laserterapia. O exame imunohistoquímico verificou ativação das células satélites através do marcador MyoD1 constatando aumento significativo no conteúdo de MyoD1 após 24 h da lesão, sendo seu pico alcançado em 48 h e decorridos 7

dias da lesão, o conteúdo já havia normalizado. Este estudo sugere que a terapia a laser proporciona aceleração do reparo muscular, através do aumento da ativação de células satélites na fase inicial do processo de regeneração.

A expressão de TNF- α e TGF- β no músculo Tibial Anterior de ratos adultos tratados com laser, após criolesão, foi estudada por Mesquita-Ferrari et al. (2011). Nesse estudo, por meio de laser de diodo de AsGalnP (660 nm), potência de 20 mW e densidade de energia de 5 J/cm² os grupos foram irradiados após 24h da lesão, com frequência de 3 vezes na semana. A remodelação do músculo foi analisada, através de PCR-Real time, 1, 7 e 14 dias após a lesão. Os resultados obtidos demonstram que o laser auxiliou no processo de reparo do músculo, pois foi capaz de amenizar o processo inflamatório, percebido através da redução de TNF- α , além de diminuir a quantidade de TGF- β evitando, assim, a formação de fibrose e déficit nas propriedades contráteis das fibras musculares.

Rennó et al. (2011) compararam os efeitos da aplicação do ultrassom de 1.5 MHz pulsado a 20% (intensidade média 30 W/cm² durante 20 min.) e do laser de baixa intensidade de 830 nm (potência 30 mW e densidade de energia 50 J/cm²) na regeneração muscular após criolesão. Ao término das seis sessões de aplicação das terapias, a análise histológica demonstrou que o grupo tratado com laser apresentou uma redução da resposta inflamatória mais significativa do que o grupo tratado com ultrassom. Enquanto que a imunohistoquímica demonstrou uma redução na expressão de COX-2 em ambos os grupos.

A aplicação de recursos terapêuticos em lesões musculares já é bem fundamentada na literatura, no entanto, a maior parte desses estudos é realizada em jovens ou adultos, principalmente os que utilizam animais. Porém, sabe-se

que o prejuízo da função muscular afeta sensivelmente a qualidade de vida do idoso, tornando difícil ou impossibilitando a execução de atividades de vida diária. A perda de funcionalidade e a conseqüente dependência podem acarretar também problemas psicológicos e emocionais, comprometendo a qualidade de vida do idoso (Lacorti e Marini, 2006).

A população de idosos vem aumentando consideravelmente nas últimas décadas. Segundo dados do Ministério da Saúde, a população brasileira de idosos em 1996 era de 7,8 milhões e, entre 1950 e 2020, crescerá 16 vezes o número de pessoas acima de 60 anos de idade no país (Matsudo, 1997). Aliada a essa projeção, é notório o número de pessoas idosas que frequentam clínicas de fisioterapia, para tratamento de lesões musculoesqueléticas.

Diante dessa nova realidade é imprescindível para a prática clínica que o fisioterapeuta esteja bem fundamentado quanto às especificidades do processo de regeneração muscular do idoso e a aplicabilidade e efetividade das modalidades terapêuticas a serem utilizadas, bem como suas respectivas dosimetrias. Desse modo, este estudo realizou uma análise do efeito das terapias ultrassom e laser em animais idosos, submetidos à lesão muscular através de contusão. Considerando o exposto quanto à utilização dos recursos terapêuticos, tem-se como hipótese que a aplicação de laser e ultrassom, utilizados de forma isolada e associada, favoreça o reparo tecidual mesmo com a disposição do processo de envelhecimento.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito do tratamento com ultrassom e laser de baixa intensidade sobre a regeneração muscular de modelos experimentais idosos após contusão.

2.2 Objetivos Específicos

- Verificar as particularidades da regeneração muscular de animais idosos;
- Comparar e associar a eficácia do tratamento de lesão muscular em animais idosos entre os recursos terapêuticos: ultrassom de 1 MHz e laser de baixa intensidade com comprimento de onda 830 nm;
- Analisar o conteúdo das proteínas MyoD, Miogenina e da citocina TGF- β 1 nos diferentes períodos de tratamento;
- Oferecer dados científicos para os profissionais Fisioterapeutas sobre a aplicação dos recursos terapêuticos na prática clínica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados 45 ratos da linhagem Wistar, com 18 meses de idade e peso corporal médio de $591,87 \pm 64.06$ g. Os animais foram adquiridos no Biotério Central da Universidade Metodista de Piracicaba e mantidos no Biotério da Faculdade de Ciências da Saúde (FACIS-UNIMEP), sob temperatura ambiente controlada, submetidos a ciclo claro/escuro de 12 h, com água e ração *ad libitum*. Em média foram alocados 3 animais por gaiolas de polietileno de tamanho grande. Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética na Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, através do protocolo nº 012/2010 (Anexo 1).

3.2 Grupos Experimentais

Os animais foram divididos aleatoriamente em 5 grupos experimentais:

I – *Grupo controle (CT)*: os animais deste grupo permaneceram no biotério sem sofrer contusão ou algum tipo de intervenção (n=5);

II – *Grupo lesão (LE)*: os animais foram submetidos à contusão e permaneceram no biotério, sem nenhum tipo de tratamento (n=10);

III – *Grupo ultrassom (US)*: os animais deste grupo iniciaram o tratamento com ultrassom de 1 MHz após 24 horas da contusão muscular (n=10);

IV – *Grupo laser (LA)*: os animais deste grupo foram tratados após 24 horas da contusão muscular, com sessões de aplicação de laser ($\lambda=830$ nm) (n=10);

V – *Grupo laser + ultrassom (LA+US)*: os animais foram tratados 24 horas após a contusão muscular, com aplicação de laser e, em seguida, ultrassom (n=10).

3.3 Procedimento para a Produção da Contusão

O equipamento utilizado para produção da contusão não-invasiva foi desenvolvido por Minamoto (1997). Os animais foram anestesiados via intramuscular com uma mistura de cloridrato de ketamina (0,09 mL/100 g) e cloridrato de xilazina (0,06 mL/100 g), sendo utilizado $\frac{3}{4}$ da dose indicada para a massa muscular do animal. Após apresentarem sinais de anestesia, os animais foram tricotomizados na região ântero-lateral da pata direita e a área referente ao músculo Tibial Anterior (TA) foi delimitada superficialmente com o auxílio de caneta. Em seguida, os animais foram posicionados em decúbito lateral, com a pata direita voltada para cima e em flexão plantar máxima de tornozelo, para que no momento da contusão o músculo estivesse alongado (Figura 1A). Os animais foram submetidos a carga de 284 g, liberada de uma altura de 35 cm, exercendo pressão de aproximadamente 2,45 N/cm² sobre o músculo TA (Figura 1B). Três impactos semelhantes e consecutivos foram realizados, com distribuição na região proximal-média e medial do músculo TA (Picchi, 2004).

Concluído o procedimento de contusão os animais foram avaliados, através de palpação e mobilização, para confirmação da ausência de fraturas ósseas.

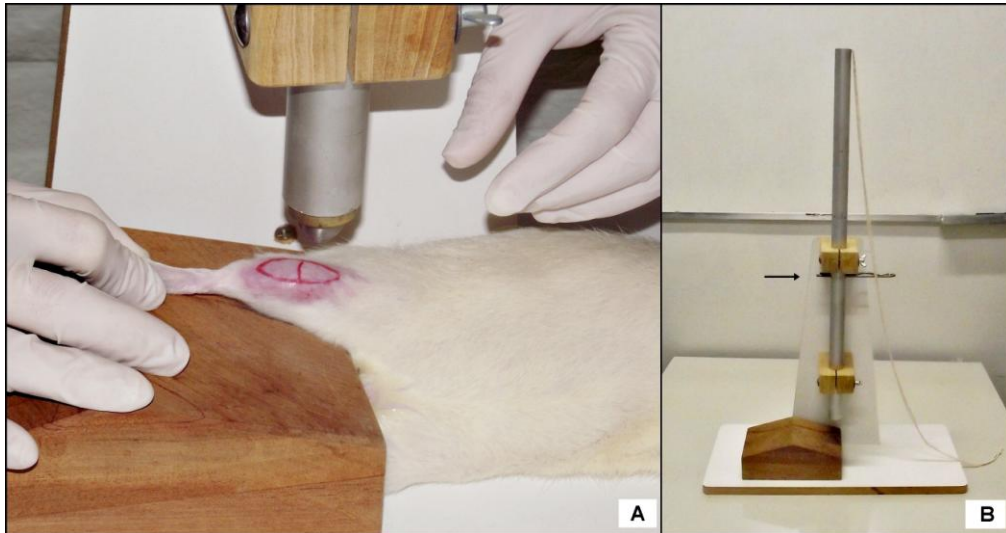


Figura 1 - Posicionamento do animal no momento da produção da contusão, com a área do músculo TA delimitada e a pata em flexão plantar (A), equipamento utilizado e altura da qual a carga foi liberada (seta) (B).

3.4 Tratamento

Os animais dos grupos LA, US e LA+US foram submetidos aos respectivos tratamentos 24 h após a contusão muscular. Cada um desses grupos foi subdividido (n=5) com a finalidade de avaliar diferentes fases da regeneração muscular e, por essa razão as terapias foram aplicadas durante 7 sessões de tratamento (LA 7, US 7 e LA+US 7) e durante 21 sessões de tratamento (LA 21, US 21 e LA+US 21). As aplicações ocorreram no período matutino, simulando o tratamento clínico diário com frequência de 5 vezes por semana e intervalo de 2 dias, de modo que fossem completadas 7 ou 21 sessões, de acordo com o grupo. Para aplicação dos recursos os animais foram contidos manualmente por um pesquisador, enquanto o outro realizava o procedimento.

- Grupo US: para o tratamento deste grupo foi utilizado ultrassom Sonopulse IBRAMED de 1 MHz, modo pulsado a 20% (2 ms *on* e 8 ms *off*), com frequência de 100 Hz, intensidade instantânea de $0,4 \text{ W/cm}^2$, resultando

em intensidade média de $0,08 \text{ W/cm}^2$ e cabeçote com área efetiva de radiação (ERA) de 1 cm^2 . Cada sessão teve duração de 5 minutos, utilizando como meio de contato o gel hidrossolúvel (Figura 2A). A seleção dos parâmetros utilizados preconizou o quadro inflamatório agudo após 24 h da lesão, tendo como referência o estudo de Matheus et al. (2008) que encontrou eficácia do ultrassom pulsado a 20% para regeneração muscular. O equipamento foi previamente calibrado em local adequado, através da balança de ultrassom Marte, modelo ASS 5500C Digital.

- Grupo LA: para o tratamento deste grupo foi utilizado laser de baixa intensidade Laserpulse IBRAMED, de diodo Arseneto de Gálio e Alumínio (GaAlAs), emissão contínua, com comprimento de onda 830 nm, potência 30 mW, densidade de energia 4 J/cm^2 , por meio da técnica pontual, distribuída em 2 pontos, com duração de 16 segundos cada, sendo um ponto realizado imediatamente sobre a lesão e o outro no terço distal do músculo, com distância de 1 cm entre os pontos (Figura 2B). Para a aplicação foi utilizado filme transparente de PVC envolvendo a caneta emissora de laser, visto que não ocorre perda significativa na transmissão do mesmo (Guirro et al., 2010). Os parâmetros utilizados foram selecionados com base no estudo de Nakano et al. (2009), que obteve efeitos benéficos do laser para a estimulação de células satélites ao utilizar doses menores de densidade de energia. O equipamento foi calibrado previamente pelo de medidor de potência laser (Modelo Laser Check, COHERENT).

- Grupo LA+US: a associação da aplicação de recursos terapêuticos na mesma sessão é comum na clínica, por essa razão no tratamento deste grupo foram associadas as duas técnicas descritas, iniciando com a aplicação do laser e em seguida o ultrassom. A ordem de aplicação das terapias foi previamente definida de maneira aleatória, por meio de sorteio.

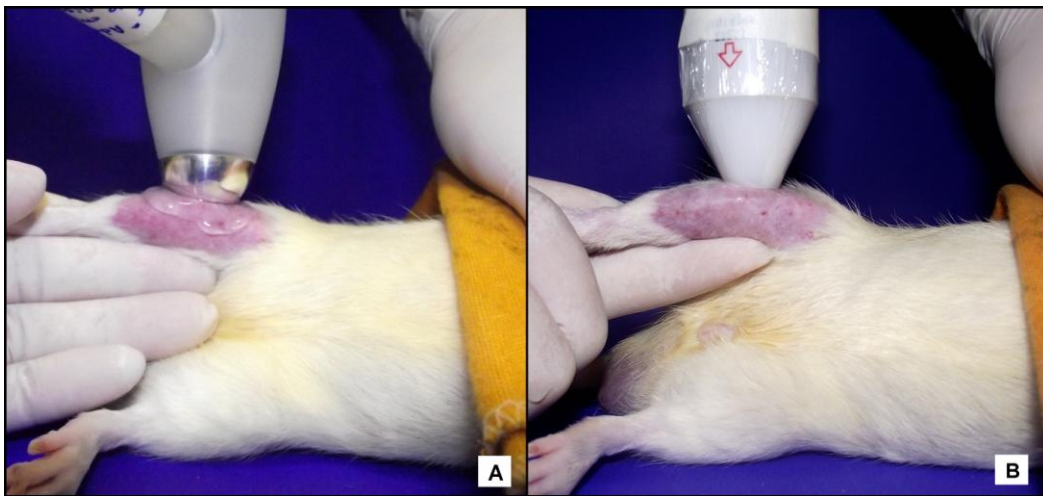


Figura 2 - Aplicação dos recursos terapêuticos ultrassom (A) e laser (B) no músculo TA.

3.5 Sacrifício dos Animais

Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de mistura de cloridrato de ketamina (0,09 mL/100 g) e cloridrato de xilazina (0,06 mL/100 g) com dose proporcional à massa muscular do animal. Ao apresentarem sinais de anestesia geral, os animais foram perfundidos com 60 mL de solução PBS (perfusão cardíaca) e, em seguida o músculo TA direito foi retirado, pesado e dividido em duas partes iguais, sendo uma parte destinada à técnica de Microscopia de luz e a outra parte destinada à técnica de Immunoblotting.

3.6 Técnica de Microscopia de Luz

Parte do músculo TA direito de cada animal foi fixada em suporte de madeira com tragacanth gum, imerso em isopentano à -80 °C por 60 segundos e imediatamente colocado em nitrogênio líquido à -159 °C. Os músculos foram retirados do nitrogênio e mantidos em Biofreezer à -70 °C ou em tambores de nitrogênio. Para confecção das lâminas os músculos foram descongelados por aproximadamente 30 minutos até atingirem a temperatura de -23 °C, seccionados transversalmente, com espessura de 8 µm, utilizando criostato (Microm-HS505E). Mediante a obtenção dos cortes as lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina (HE), para análise da área em processo de regeneração muscular e da área de secção transversal das fibras musculares.

3.7 Técnica de Immunoblotting

3.7.1 Preparação de Extrato Total

Os músculos retirados foram cortados em pequenos pedaços e homogeneizados em tampão Triton X-100 1%, tris-HCl 100 mM (ph 7,4), pirofosfato de sódio 100 mM, fluoreto de sódio 100 mM, ETDA 10 mM, ortovanadato de sódio 10 mM, PMSF 2 mM e 0,1 mg/mL de aprotinina, com volume variando entre 1000 a 2000 µl, a 4 °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 por 20 minutos a 4 °C e o sobrenadante utilizado para análise por extrato total. A determinação de proteína foi realizada pelo método colorimétrico através do bioreto.

3.7.2 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 em banho seco por 5 minutos. Em seguida, 50 µg de proteína foram aplicados em gel SDS-poliacrilamida de 12% em aparelho para eletroforese da Bio-Rad (mini-Protean, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, EUA). 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 10 mM, 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 (Super Signal West Pico Chemiluminescente, Pierce) por 5 minutos e, em seguida o sinal fluorescente capturado no equipamento G-Box (GeneSys).

A distribuição homogênea do carregamento das amostras foi verificada através da marcação com o corante Ponceau.

3.8 Anticorpos

3.8.1 Anticorpos Primários

- MyoD (m-318), rabbit policlonal, Santa Cruz: sc-760;
- TGF- β 1, mouse monoclonal, Sigma-Aldrich, T7039;
- Miogenin, mouse monoclonal, Sigma, M5815.

3.8.2 Anticorpos Secundários

- Goat anti-rabbit IgG-HRP, Santa Cruz: sc-2004;
- Goat anti-mouse IgG-HRP, Santa Cruz: sc-2005.

3.9 Análise dos Resultados

3.9.1 Análise morfológica

Para as lâminas coradas com HE, dois cortes aleatórios de cada lâmina foram analisados a fim de se obter as seguintes análises:

- *Área de inflamação/regeneração (Infl/Reg)* – Em decorrência da lesão foi quantificada a área do músculo em estágio de inflamação/regeneração, caracterizada por apresentar intenso infiltrado inflamatório e fibras em processo de regeneração. Os resultados foram obtidos calculando-se a proporção de quanto a área de Infl/Reg representava na área do corte do músculo inteiro e, expressos em porcentagem.
- *Área de secção transversal (AST)* – A mensuração da AST de fibras musculares em regeneração, apresentando núcleo centralizado, foi comparada com a de fibras musculares normais do grupo CT, com o intuito de verificar a maturação das fibras durante a regeneração. Para esta análise foram quantificadas, em cada corte, 400 fibras em regeneração nos

grupos experimentais que sofreram contusão e, quantificadas 200 fibras normais em cada corte do grupo controle. Posteriormente foi realizada a média dos valores obtidos.

As lâminas foram observadas ao microscópio óptico com câmera acoplada, utilizando objetiva de 4X para montagem dos cortes inteiros e posterior mensuração da Infl/Reg (%), além da objetiva de 20X para quantificação da AST das fibras. As análises foram feitas por meio do *software* Image Pro-Plus 6.2 (Media Cybernetics) em computador conectado ao microscópio.

3.9.2 Análise Bandas Imunoreativas

As bandas observadas na técnica de Immunoblotting foram salvas em computador para posterior quantificação da densitometria óptica, utilizando o programa Image J (*The National Institute of Health*, EUA).

3.10 Análise Estatística

Na análise estatística inicialmente utilizou-se o teste Shapiro-Wilk para verificar a normalidade da amostra, sendo obtidos dados com distribuições normal e não normal. Mediante a distribuição normal dos dados foi utilizado o teste ANOVA one-way seguido do teste Tukey para as devidas comparações entre os grupos, sendo os dados apresentados por meio de média e desvio padrão. Para os dados com distribuição não normal, foi utilizado o teste Kruskal-Wallis e posteriormente o teste Student-Newman-Keuls para comparações entre os grupos, nesse caso os dados são apresentados em mediana, primeiro quartil e

terceiro quartil. As análises foram processadas por meio dos *softwares* BioEstat 5.0 e SPSS 13.0, considerando-se significância de 5%.

4 RESULTADOS

A análise histológica possibilitou visualizar e quantificar a área da lesão, que por sua vez, apresentou-se restrita à superfície do músculo TA e caracterizada pelo intenso infiltrado inflamatório, além de fibras em regeneração. No estágio inicial da regeneração, as fibras musculares apresentaram pequeno diâmetro, citoplasma escasso e fortemente basófilo, núcleo centralizado e aumentado em decorrência da intensa síntese protéica. Com o avanço na reparação, essas fibras passaram a exibir aumento aparente da proporção citoplasma/núcleo, núcleo com tamanho próximo ao normal, menor AST quando comparadas as fibras normais e redução de infiltrado inflamatório ao seu redor (Grounds e Torrisi, 2004; Grounds et al., 2005, Marques et al., 2008).

A comparação da área de inflamação/regeneração muscular entre os grupos que receberam 7 sessões de tratamento, LA 7, US 7 e LA+US 7, demonstrou semelhança ao grupo LE 7, que sofreu apenas contusão, o que indica que na fase aguda nenhuma das terapias utilizadas foi eficiente para reduzir o processo inflamatório e acelerar a regeneração muscular em rato idoso (Tabela 1).

Com relação à fase mais avançada da regeneração, 21 sessões de tratamento após a contusão, os grupos LA 21 e LA+US 21 exibiram redução significativa da área de inflamação/regeneração quando comparados ao grupo LE 21. Tal resultado demonstra que com o aumento na quantidade de sessões de

tratamento, o laser revelou efeito anti-inflamatório eficaz para regeneração muscular, quando aplicado isolado ou em associação com o ultrassom (Figura 3).

A análise intragrupo evidenciou a eficácia do laser, pois os grupos LA 7 e 21 sessões demonstraram redução significativa na área da lesão, enfatizando o avanço da regeneração muscular após 21 sessões de tratamento. Entretanto, apesar do grupo US 21 também ter apresentado redução da área de inflamação/regeneração, essa não foi significativa quando comparada com o grupo LE 21 (Tabela 1).

Tabela 1: Valores referentes às áreas em processo de inflamação/regeneração muscular nos grupos LE, LA, US e LA+US.

| Grupo | Área em processo de regeneração muscular | |
|----------------------|--|---------------|
| | Mediana | Q1 - Q3 |
| Lesão 7 | 22,61 | 21,66 – 22,61 |
| Lesão 21 | 33,33 | 6,27 – 33,33 |
| Laser 7 | 15,11‡ | 12,34 – 17,69 |
| Laser 21 | 3,66* | 3,53 – 5,82 |
| Ultrassom 7 | 10,76 | 9 – 37,27 |
| Ultrassom 21 | 8,81 | 0,80 – 11,61 |
| Laser + Ultrassom 7 | 13,75 | 7,81 – 17,50 |
| Laser + Ultrassom 21 | 5,25* | 5 – 5,25 |

*Diferem do grupo Lesão 21 ‡Difere do grupo Laser 21

Outro parâmetro de avaliação da regeneração muscular possibilitado pela histologia foi a quantificação da área de secção transversal (AST) das fibras em processo de regeneração, com o intuito de acompanhar o processo de maturação das fibras mediante a utilização dos recursos terapêuticos.

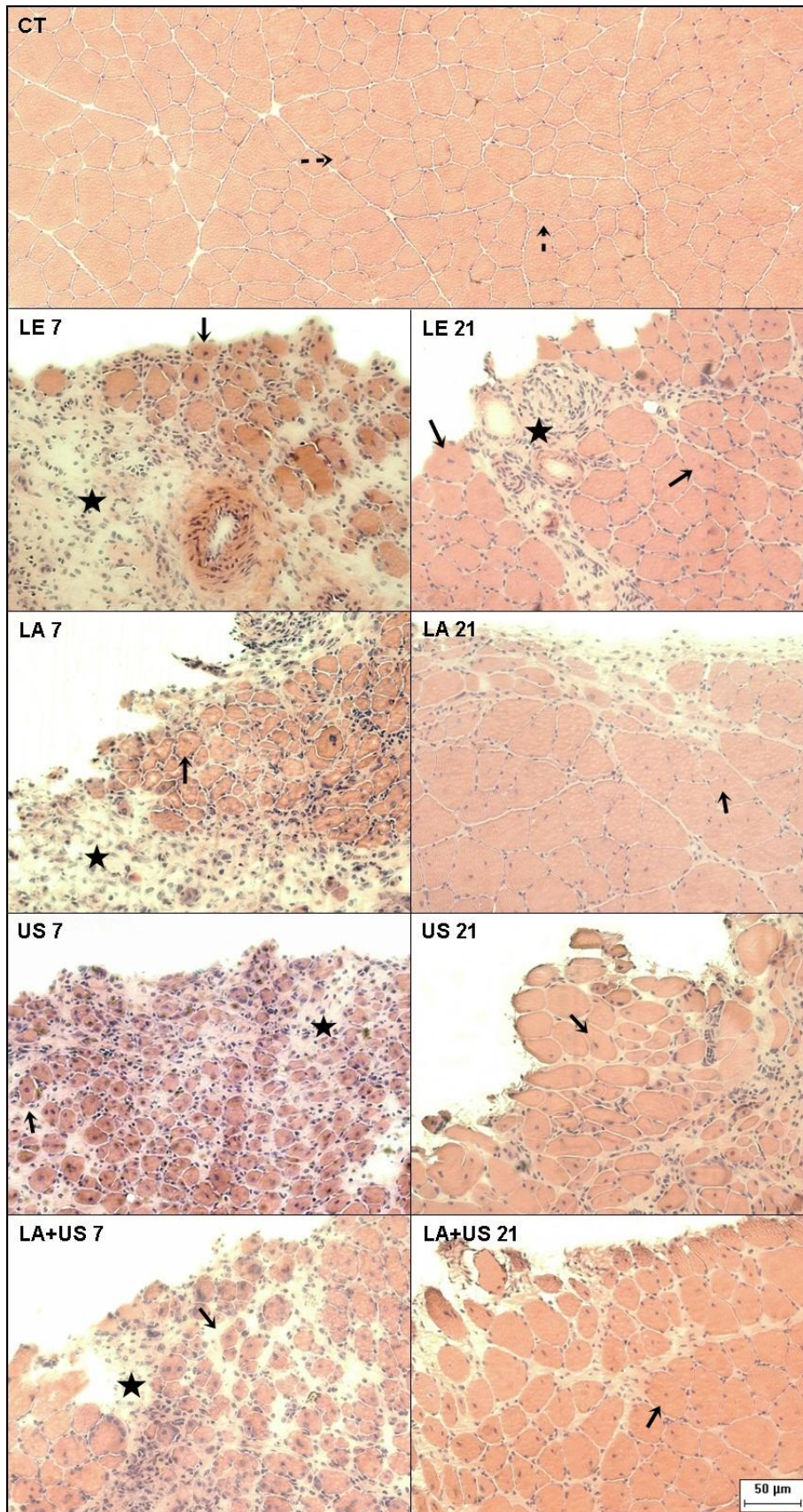


Figura 3 - Análise histológica do processo de regeneração muscular em todos os grupos experimentais. É possível visualizar núcleos periféricos em fibras íntegras (->), intenso infiltrado inflamatório (★), além de núcleos centralizados nas fibras em regeneração (→).

As fibras musculares dos grupos em fase inicial de regeneração, LE 7, LA 7, US 7 e LA+US 7 apresentaram AST semelhantes entre si e significativamente reduzidas em comparação as fibras do grupo CT. Tal resultado indica que as células de todos estes grupos, tratados ou não, estavam em fase inicial de regeneração e não atingiram valores próximos à normalidade. Sendo assim, nenhuma das terapias utilizadas neste estudo, em 7 sessões de tratamento, foram capazes de acelerar a maturação das fibras musculares, visto que os valores da AST das fibras dos grupos LA 7, US 7 e LA+US 7 apresentaram-se próximas as do grupo LE 7, não havendo diferença estatística entre elas (Tabela 2).

A respeito da fase tardia do processo de regeneração, após 21 sessões de tratamento, apesar da AST das fibras musculares apresentarem valores próximos ao normal, não houve diferença estatística entre os grupos LA 21, US 21 e LA+US 21 em relação ao grupo LE 21.

A comparação intragrupo demonstrou diferença na AST das fibras musculares do grupo LA 7 e 21 sessões e entre o grupo LA+US 7 e 21 sessões de tratamento, sugerindo a maturação das fibras musculares ao longo do tempo. Entretanto, não houve diferença estatística quando comparados com os respectivos tempos do grupo LE, sugerindo que a regeneração ocorreu de forma espontânea e não acelerada pelo tratamento (Tabela 2).

Tabela 2: Valores referentes às AST das fibras com núcleo centralizado nos grupos LE, LA, US e LA+US, comparadas às fibras com núcleo periférico do grupo CT.

| Área das fibras com núcleo periférico (μm^2) | | |
|---|-----------|-------------------|
| Grupo | Mediana | Q1 - Q3 |
| Controle | 2913,39 | 2462,95 – 2920,24 |
| Área das fibras com núcleo centralizado (μm^2) | | |
| Lesão 7 | 836,78* | 836,78 – 870,37 |
| Lesão 21 | 1424,28 | 1424,28 – 1668,98 |
| Laser 7 | 1066,87*‡ | 820,79 – 1270,73 |
| Laser 21 | 2633,21 | 1747,21 – 3300,47 |
| Ultrassom 7 | 1230,66* | 858,83 – 1480,54 |
| Ultrassom 21 | 1859,36 | 1160,40 – 2149,75 |
| Laser + Ultrassom 7 | 1100,41*§ | 1046 – 1397,68 |
| Laser + Ultrassom 21 | 1944,41 | 1944,41 – 1971,96 |

*Diferem do grupo CT; ‡Difere do grupo LA 21; §Difere do grupo LA+US 21

Na tentativa de elucidar os mecanismos envolvidos no processo de regeneração, em especial no ambiente celular alterado pelo envelhecimento, realizou-se neste estudo a análise molecular por meio de marcadores expressados pelas células satélites durante a regeneração muscular e pelo TGF- β 1.

Um marcador peculiar à fase de ativação e proliferação das células satélites é a expressão de MyoD. Os achados demonstram que os grupos LE 21 e US 7 apresentaram o conteúdo de MyoD reduzido em relação ao grupo controle. Visto que nenhum dos grupos experimentais apresentaram conteúdo de MyoD elevado em relação grupo CT, sugere-se que a regeneração muscular dos grupos experimentais já havia passado da fase de ativação e proliferação das células satélites, dessa maneira o conteúdo de MyoD já estava normalizado (Figura 4).

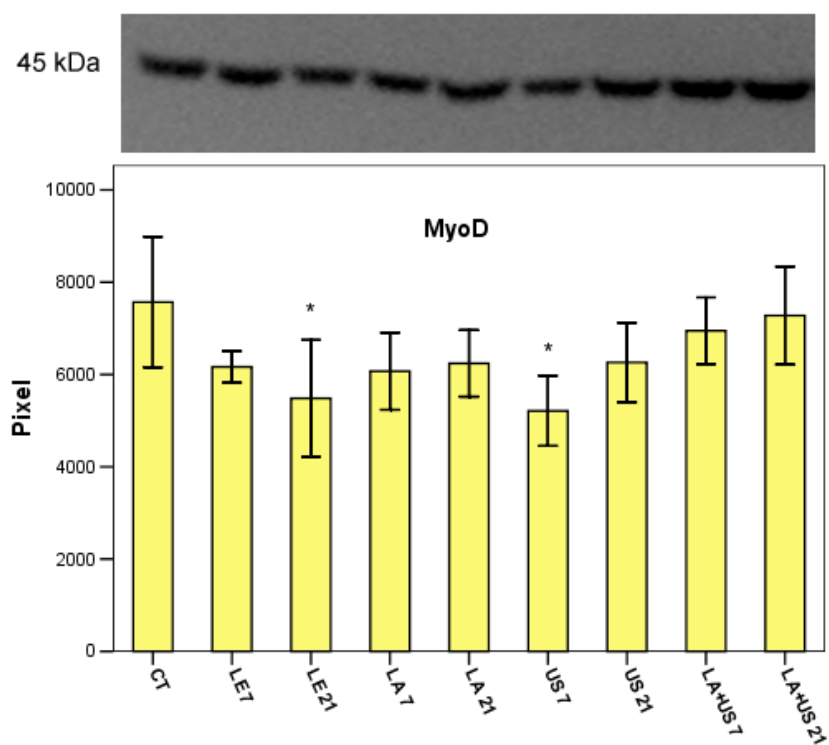


Figura 4 – Comparação do conteúdo de MyoD durante as fases da regeneração muscular em todos os grupos experimentais. Grupos LE 21 e US 7 diferem do CT (*).

Ainda com relação à análise da expressão de marcadores de células satélites, foi analisado também o conteúdo de Miogenina, um marcador característico da fase de diferenciação das células satélites em fibras musculares durante o processo de regeneração.

Após 7 sessões de tratamento os grupos experimentais que receberam as terapias e o grupo LE 7 exibiram conteúdos de Miogenina semelhantes ao grupo CT. Logo, nesse primeiro momento, a regeneração parece ter acontecido de forma espontânea, não havendo contribuição das terapias (Figura 5).

A análise realizada após 21 sessões de tratamento demonstrou aumento significativo do conteúdo de Miogenina no grupo LE 21 em relação ao grupo CT. Enquanto que os grupos que foram tratados com laser e ultrassom apresentaram-se semelhantes ao grupo CT. Tais resultados podem sugerir retardo na regeneração muscular do grupo LE 21, uma vez que os grupos LA 21, US 21 e LA+US 21 exibiam conteúdo reduzido de Miogenina provavelmente por terem passado da fase de diferenciação celular, diferentemente do grupo LE 21 que ainda encontrava-se nessa fase. Porém, não é possível afirmar eficácia dos tratamentos propostos, já que não houve diferença entre os grupos tratados e lesão (Figura 5).

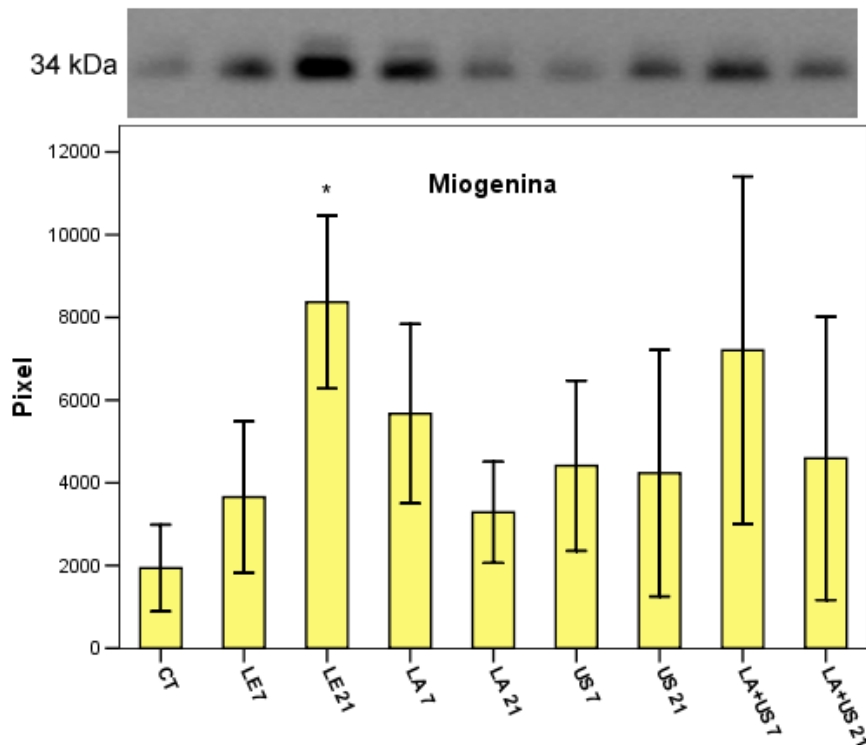


Figura 5 - Comparação do conteúdo de Miogenina durante as fases da regeneração muscular em todos os grupos experimentais. Grupo LE 21 difere do CT (*).

Mediante a predisposição do ambiente celular envelhecido 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 LE 21 apresentou o conteúdo de TGF- β 1 significativamente elevado em comparação ao grupo CT. Além disso, o grupo LA+US 7 também diferiu do grupo CT devido ao aumento no conteúdo de TGF- β 1. Contudo, com o aumento na quantidade de sessões de tratamento, o grupo LA+US 21 apresentou conteúdo reduzido em relação ao LA+US 7, sugerindo que

nessa fase inicial da regeneração a associação dos recursos terapêuticos pode ter influência na formação de fibrose (Figura 6).

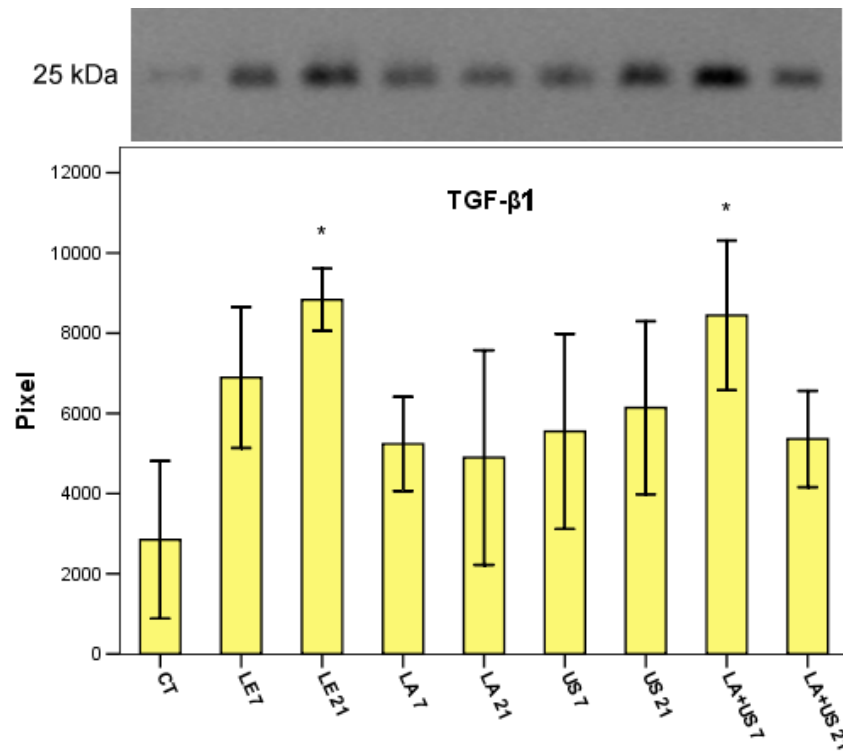


Figura 6 – Comparação do conteúdo de TGF- β 1 durante as fases da regeneração muscular em todos os grupos experimentais. Grupos LE 21 e LA+US 7 diferem do CT (*).

Para garantir a confiabilidade dos dados correspondentes às bandas encontradas na técnica de Immunoblotting, realizou-se a marcação da membrana com corante Ponceau para a visualização do carregamento das proteínas (Figura 7).

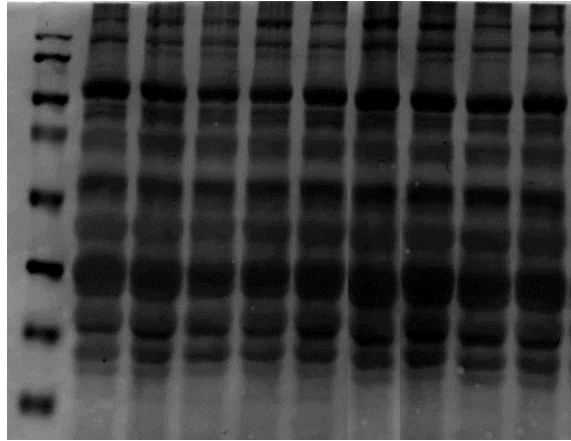


Figura 7 – Visualização das bandas de proteína coradas com Ponceau.

5 DISCUSSÃO

De acordo com o que foi previamente proposto neste estudo, os resultados expõem que apenas o tratamento com laser de GaAIs (830 nm), aplicado com densidade de energia 4 J/cm², demonstrou propriedade para reduzir o processo inflamatório da lesão, após 21 sessões de tratamento em modelo experimental idoso. No estudo das proteínas MyoD, Miogenina e TGF-β1, não foi observado influência na regeneração muscular dos grupos que receberam as terapias laser e/ou ultrassom.

A lesão do tipo contusão selecionada para esta pesquisa é semelhante às lesões originadas por traumas de força compressiva, que ocorrem no decorrer da vida principalmente durante a prática de esportes, sendo assim, de extrema relevância clínica (Järvinen et al., 2005). O músculo Tibial Anterior foi eleito para receber a contusão pela sua localização superficial, facilitando o acesso da lesão.

Ao estudar regeneração muscular em animais idosos é preciso considerar a instalação do processo de envelhecimento e o efeito que este desencadeia na regeneração. O declínio na quantidade de células satélites quiescentes no músculo esquelético, somado ao conjunto de fatores que prejudicam sua ativação e proliferação, resulta no comprometimento da funcionalidade dessas células e, conseqüentemente, na deficiência da capacidade regenerativa do músculo esquelético de indivíduos idosos (Vignaud et al., 2003; Brack e Rando 2007; Denges, 2010).

A alteração no potencial miogênico das células satélites em ambiente celular envelhecido também foi visualizada por Beccafico et al. (2007). Em cultura celular *in vitro* proveniente de indivíduos jovens (idade média de 30 anos) e idosos (idade média de 83 anos) após 7 dias de diferenciação demonstrou que, a quantidade de células satélites não foi significativamente diferente entre os grupos, apesar de se apresentar reduzida no idoso. Entretanto, a análise do índice de fusão (IF), estabelecido como a pontencialidade dos mioblastos mononucleados fundirem-se em miotubulos multinucleados, visualizaram que o IF foi significativamente reduzido nas células musculares de idosos comparadas com os jovens. Tais resultados sugerem que o déficit da capacidade regenerativa do músculo em virtude do envelhecimento, não ocorre apenas pela redução na quantidade de células satélites quiescentes, mas provavelmente, pelo comprometimento durante a fase de diferenciação.

Marcadores-chave característicos do processo de regeneração muscular foram estudados por van Der Poel et al. (2011) e comparados entre animais jovens, adultos e idosos. As análises realizadas durante 12, 24, 36, 48 e 72 h após a lesão verificaram que os níveis basais de citocinas inflamatórias (TNF α , IL-6, IL-1 β , INF γ , CD18 e IL-18) eram elevados nos animais idosos, quando comparados com animais jovens e adultos, além de que essas citocinas permaneceram aumentadas nos animais idosos mesmo após 72 h da lesão. Apesar do presente estudo não ter quantificado citocinas inflamatórias, essa desregulação oriunda do envelhecimento também pode ser observada através da morfometria, uma vez que o grupo LE 21 exibiu intenso infiltrado inflamatório, mesmo após longo período da lesão.

Estudos envolvendo regeneração muscular em animais jovens podem favorecer o entendimento da fase inflamatória prolongada em virtude do envelhecimento. Winkler et al. (2011) realizaram lesão no músculo Sóleo de animais jovens e observaram que após 4 semanas da lesão não havia inflamação no local, apenas tecido fibroso denso em desenvolvimento, diferentemente do que foi observado neste estudo.

O processo de regeneração muscular desencadeia a ativação das células satélites, e com elas são expressos marcadores específicos em cada fase que percorrem. A fase inicial de ativação e proliferação das células é caracterizada pela expressão de MyoD, a qual exibe aumento 3 h após a lesão, atingindo seu pico em 12 h e depois desse período volta a se normalizar (Srikuea et al., 2010; Corbu et al., 2010). No presente estudo as amostras foram coletadas após 7 e 21 sessões de tratamento, o que justifica o conteúdo de MyoD estar semelhante ou até mesmo reduzido nos grupos experimentais em comparação ao grupo CT.

Com o avançar da regeneração é expressa a Miogenina, um marcador peculiar da fase de diferenciação das células satélites para reparo ou formação de novos mioblastos. Em animais jovens seu conteúdo apresenta aumento por volta do 3º dia após a lesão, atingindo seu pico no 7º dia e normalizando-se em seguida (Srikuea et al., 2010; Corbu et al., 2010). Em contrapartida, esses dados não foram semelhantes aos achados do presente estudo, uma vez que o conteúdo de Miogenina do grupo LE 21 exibiu aumento significativo em comparação ao grupo CT, mesmo após 4 semanas da lesão muscular. Tal fato pode ser atribuído ao retardo no processo de diferenciação celular em virtude do envelhecimento no modelo experimental utilizado.

Os grupos que receberam tratamento, apesar de apresentarem o conteúdo de Miogenina semelhante ao do grupo CT, não diferiram do grupo LE, dessa maneira, não é possível afirmar os benefícios do laser e do ultrassom, nos parâmetros utilizados, para promover a regeneração muscular de animais idosos.

Os mesmos marcadores miogênicos foram observados por van Der Poel et al. (2011), nos quais a expressão de MyoD em animais jovens e adultos apresentou aumento significativo após 72 h da lesão, enquanto que no mesmo período esse aumento não foi visualizado nos animais idosos. Com relação à Miogenina, após 7 dias da lesão não foi detectável aumento significativo em sua expressão nos animais idosos, entretanto nesse mesmo período houve aumento de 90% nos animais jovens e adultos.

Conforme as descrições com relação ao período de expressão da MyoD e da Miogenina é possível perceber que elas possuem comportamento distintos nos animais jovens, de modo que quando uma delas está elevada, a outra está reduzida (Srikuea et al., 2010). No presente estudo, o grupo LE 21 apresentou conteúdo reduzido de MyoD, enquanto que a Miogenina estava elevada, indicando novamente o retardo no processo de diferenciação do mesmo. Nos demais grupos observou-se o comportamento contrário, com o aumento no conteúdo de MyoD e redução da Miogenina, entretanto não é possível afirmar a eficácia das terapias, pois não houve diferença significativa entre os grupos tratados e lesão.

O Fator de Transformação de Crescimento Beta (TGF- β 1) é uma citocina caracteristicamente expressa durante a formação de fibras colágenas, sendo assim, comumente utilizada para investigar a formação de fibrose.

Contudo, esta citocina também exerce influência sobre o estado de quiescência das células satélites, como foi verificado por Rathbone et al. (2011). A adição de TGF- β 1 durante as primeiras 48 h de cultura de células satélites de ratos adultos foi capaz de reduzir a quantidade de MyoD, demonstrando que o TGF- β 1 interfere na ativação celular fazendo com que as células permaneçam em estado de quiescência. Nesse sentido, o aumento no conteúdo de TGF- β 1 observado no grupo LE 21, também pode ter contribuído para o retardo no processo de regeneração.

A comum utilização do laser de baixa intensidade e do ultrassom como recursos terapêuticos é importante de ser estudada, visto que o laser desencadeia a produção de ATP (Reddy, 2004), a angiogênese e potencializa a entrada de células satélites quiescentes no ciclo celular (Shefer et al., 2002). As ondas mecânicas promovidas pelo ultrassom são capazes de alterar a permeabilidade da membrana celular, modificando o fluxo de nutrientes para o interior da célula (van der Windt, et al., 1999). Estes efeitos são eficazes para tornar a regeneração muscular mais eficiente, reduzindo seu tempo e melhorando sua qualidade.

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, uma vez que, é essa propriedade que define a profundidade de penetração do laser no tecido irradiado (Vladimirov, Osipov e Klebanov, 2004). A densidade de energia estabelecida foi de 4 J/cm² por ponto por ser indicada para processo inflamatório agudo (Kitchen, 2003).

Assim como no presente trabalho a efetividade da terapia laser (633 nm) aplicada com baixa dose foi verificada por Yomasa et al. (2009) que utilizou 5 J/cm² e 10 J/cm² de laser HeNe após contusão no músculo TA de gerbilos jovens. Após o tratamento durante 7 dias consecutivos visualizaram aumento da atividade mitocondrial nas fibras musculares, aumento de fibroblastos e macrófagos e estímulo da angiogênese, sugerindo efetividade de ambas as doses utilizadas para a regeneração muscular. A efetividade do laser para redução do processo inflamatório também foi visualizada no presente estudo, contudo, com a diferença de que esse efeito foi evidente após 21 sessões de tratamento, podendo esse retardo ser atribuído ao envelhecimento ou até mesmo ao parâmetro utilizado (4 J/cm²).

Rodrigues (2009) também analisou o padrão regenerativo do músculo após aplicação do laser de 830 nm e potência de 30 mW em animais jovens e idosos, entretanto, utilizou 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, entretanto, a quantificação dos capilares sanguíneos e a expressão gênica de MyoD e VEGF (fator angiogênico importante no desenvolvimento vascular), também apresentou aumento significativo nos animais idosos. Esses achados demonstram que utilizando alta densidade energia (30 J/cm²) é possível visualizar os efeitos do laser, o que sugere que 4 J/cm² utilizado no presente estudo, mesmo que em maior quantidade de sessões de tratamento, não foi suficiente para acelerar a regeneração muscular.

O parâmetro de aplicação proposto para ultrassom foi com frequência de 1 MHz para atingir a profundidade do tecido muscular, modo pulsado a 20%

para preconizar o efeito mecânico e pela indicação do uso em lesão muscular na fase aguda (Dyson, 1982), visto que o tratamento teve início 24 h após a lesão. Com base em estudo desenvolvido por Matheus et al. (2008) que aplicou ultrassom no modo pulsado a 20% e intensidade de 0,5 W/cm² preconizou-se por utilizar a terapia com intensidade instantânea de 0,4 W/cm², resultando em intensidade média de 0,08 W/cm² durante 5 minutos.

Neste estudo, apesar do tratamento com ultrassom ter demonstrado influência na regeneração, seus efeitos não foram significativos para as variáveis estudadas. Parâmetros semelhantes foram utilizados por Markert et al. (2005), que embora tenham utilizado ultrassom contínuo de 3 MHz, optaram por intensidade média de 0,1 W/cm² para prevenir o surgimento do efeito térmico, o que resultou em intensidade média semelhante à utilizada no presente estudo (intensidade média de 0,08 W/cm²). O protocolo foi composto por contusão realizada no músculo Gastrocnêmio de animais jovens e tratamento, durante 4 sessões, com aplicação de ultrassom e treinamento de caminhada em esteira, ambos realizados de forma isolada e associada. A análise histológica, incluindo a quantificação da AST das fibras musculares, não demonstrou diferença entre os grupos que receberam tratamento e o grupo que sofreu apenas contusão.

Ultrassom de 1 MHz no modo pulsado a 50%, aplicado com baixa intensidade (0,57 W/cm²) e por 5 minutos também foi utilizado por Piedade et al. (2008) no músculo Gastrocnêmio, após laceração. A análise demonstrou maior quantidade de fibras em estágio inicial de regeneração, além de um aumento na deposição de fibras colágenas após 7 dias de tratamento no grupo que recebeu a terapia, porém após 14 dias de tratamento a quantidade de colágeno não sofreu aumento, mantendo-se constante. Tais resultados assemelham-se ao presente

estudo, uma vez que, o grupo LA+US após 7 sessões de tratamento apresentou significativo aumento no conteúdo de TGF- β 1 em relação ao grupo CT, entretanto após 21 sessões de tratamento esse conteúdo atingiu os valores do controle.

A comparação entre laser e ultrassom para a regeneração muscular também foi realizada por Pinto et al. (2008) que induziram a lesão em animais jovens por meio da aplicação de bupivacaina no músculo TA. Os grupos foram divididos entre 2 e 7 sessões de tratamento para ambas as terapias, sendo utilizado laser AsGa (904 nm), potência 150 mW com densidade de energia 60 J/cm² e ultrassom de 1 MHz no modo pulsado com intensidade de 0,3 W/cm². A análise morfológica evidenciou efeito anti-inflamatório de ambas as terapias após 7 sessões de tratamento, entretanto o laser demonstrou-se mais eficaz que o ultrassom. Os parâmetros do ultrassom assemelham-se ao utilizado no presente estudo, assim como a pouca efetividade do recurso, o que sugere que o ultrassom pulsado quando utilizado com intensidade média muito baixa, pode não ser o suficiente para estimular o tecido.

Oliveira et al. (2008) também comparou os efeitos do ultrassom e do laser em diferentes parâmetros, mas com aplicação em cultura de fibroblastos L929. As células foram estimuladas 24 h, 48 h e 72 h e multiplicação celular analisada logo após a aplicação das terapias. Para o ultrassom de 1 MHz foram testadas as intensidades 0,2 W/cm² de ultrassom nos modos pulsados a 10% e 20%, e intensidade 0,6 W/cm² de ultrassom nos modos pulsados a 10% e 20%, enquanto o laser de 904 nm foi analisado com densidade de energia de 6 J/cm² e 50 J/cm². Apesar de ambos os recursos terem demonstrado influência na multiplicação celular, a irradiação com laser, em doses altas e baixas, exibiram aumento significativo na cultura de fibroblastos, sugerindo que nas primeiras

fases do reparo o laser demonstrou-se mais eficaz que o ultrassom. Esses achados demonstram que, até mesmo em cultura de células, o ultrassom quando aplicado com intensidade muito baixa não consegue promover o estímulo celular adequado.

Apesar da frequente utilização desses recursos na clínica, ainda não há uma padronização na literatura com relação aos parâmetros ideais a serem utilizados para a regeneração muscular. Nesse estudo preconizou-se por aplicar as terapias diariamente, utilizando-se baixas dosagens (laser com densidade de energia 4 J/cm^2 e ultrassom com intensidade instantânea $0,4 \text{ W/cm}^2$) visando o acúmulo dos efeitos ao longo do período de tratamento composto por 7 e 21 sessões.

Contudo, levando em consideração os achados de outros estudos e o atraso natural da regeneração durante o envelhecimento, sugere-se que os parâmetros utilizados neste estudo, não foram suficientes para estimular o tecido de forma efetiva, tendo em vista que preconizou-se a utilização de baixas dosagens. No que se refere aos parâmetros do ultrassom a aplicação ocorreu na modalidade pulsada a 20%, dessa forma a intensidade média que chegava ao tecido correspondia à 20% do valor da intensidade instantânea, resultando em $0,08 \text{ W/cm}^2$, o que provavelmente influenciou nos resultados desta pesquisa. E ainda, apesar do laser ter demonstrado efeito anti-inflamatório, o mesmo só pode ser visualizado após 21 sessões de tratamento, diferentemente dos achados encontrados por estudos que utilizaram doses altas (Pinto et al., 2008; Rodrigues, 2009). Com isso, sugere-se que novos estudos sejam realizados utilizando doses mais altas, tanto do ultrassom quanto do laser, mas mantendo-se a análise dos

resultados em um período mais longo após a lesão, em virtude do atraso na regeneração que ocorre com o envelhecimento.

Durante a realização deste estudo foram constatadas limitações como: a fragilidade dos animais idosos ao anestésico; a extensão da lesão no músculo variou conforme o peso corporal do animal; além de que, por serem animais com alto índice corporal, as amostras coletadas apresentavam grande volume, o que prejudicou o congelamento das mesmas. Constatou-se também, grande variabilidade nas doses utilizadas pelos estudos para ambas as terapias e ainda, a respeito da aplicação do ultrassom na modalidade pulsada a maioria das pesquisas não esclarece se o valor da intensidade é referente a intensidade média ou instantânea, o que tem influência direta nos resultados.

Outro fator relevante a ser abordado é a escassez de literatura sobre os recursos terapêuticos na regeneração de tecidos envelhecidos, tanto em ensaios clínicos quanto em estudos experimentais. Uma possível justificativa para este fato é que a mudança do padrão de envelhecimento da população é recente, em que cada vez mais as pessoas buscam alternativas para alcançar um envelhecimento ativo e conseqüente qualidade de vida.

Com base nos resultados obtidos neste estudo, sugere-se que sejam realizadas novas pesquisas envolvendo os recursos terapêuticos, laser e ultrassom, na regeneração muscular durante o envelhecimento, com o intuito de estabelecer parâmetros mais eficazes. Além disso, foi observada a necessidade de realizar análise das amostras com menor tempo após a lesão, como 3 e 14 dias, bem como investigar marcadores inflamatórios como TNF- α e hormônios que estão diminuídos no envelhecimento como IGF-1.

6 CONCLUSÃO

Considerando-se as análises morfológicas e moleculares realizadas, assim como os parâmetros utilizados, conclui-se que das terapias aplicadas neste estudo, apenas o laser demonstrou eficácia para a regeneração muscular em animais idosos, somente através do seu efeito anti-inflamatório, tendo em vista que o tratamento não influenciou no conteúdo das proteínas estudadas.

REFERÊNCIAS*

Bakeeva LE, Manteifel VM, Rodichev EB, Karu TI. Formation of gigantic mitochondria in human blood lymphocytes under the effect of an He-Ne laser. *Mol Biol.* 1993; 27(3): 608-17.

Baratto L, Calzà L, Capra R, Gallamini M, Giardino L, Giuliani A, et al. Ultra-low-level laser therapy. *Lasers Med Sci.* 2011; 26: 103-12.

Barbosa AM, Villaverde AB, Guimarães-Souza L, Ribeiro W, Cogo JC, Zamuner SR. Effect of low-level laser therapy in the inflammatory response induced by *Bothrops jararacussu* snake venom. *Toxicon.* 2008; 51(7): 1236-44.

Beccafico S, Puglielli C, Pietrangelo T, Bellomo R, Fanò G, Fulle S. Age-dependent effects on functional aspects in human satellite cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2007; 1100:345-52.

Brack AS, Rando TA. Intrinsic changes and extrinsic influences of myogenic stem cell function during aging. *Stem Cell Rev.* 2007; 3(3): 226-37.

Burdzińska A, Gala K, Pączek L. Myogenic stem cell. *Folia Histochem Cytobiol.* 2008; 46(4): 401-12.

Carosio S, Berardinelli MG, Aucello M, Musarò A. Impact of ageing on muscle cell regeneration. *Ageing Res Rev.* 2009; 10(1): 35-42.

Carvalho PDET, Silva IS, Reis FA, Belchior AC, Aydos RD, Facco GG, et al. Histological study of tendon healing in malnourished wistar rats treated with ultrasound therapy. *Acta Cir Bras.* 2006; 4: 13-7.

Chan YS, Hsu KY, Kuo CH, Lee SD, Chen SC, Chen WJ, et al. Using low-intensity pulsed ultrasound to improve muscle healing after laceration injury: An in vitro and in vivo study. *Ultrasound Med Biol.* 2010; 36(5): 743-51.

Charge SB, Brack AS, Hughes SM. Aging-related satellite cell differentiation defect occurs prematurely after Ski-induced muscle hypertrophy. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002; 283(4): 1228-41.

Chargé SBP, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev.* 2004; 84: 209-38.

[Corbu A](#), [Scaramozza A](#), [Badiali-DeGiorgi L](#), [Tarantino L](#), [Papa V](#), [Rinaldi R](#), et al. Satellite cell characterization from aging human muscle. *Neurol Res.* 2010; 32(1): 63-72.

Creuzet S, Lescaudron L, Li Z, Fontaine-Pérus J. MyoD, myogenin and desmin-nls-lacZ transgene emphasize the distinct patterns of satellite cell activation in growth and regeneration. *Exp Cell Res.* 1998; 243: 241-53.

Degens H. The role of systemic inflammation in age-related muscle weakness and wasting. *Scand J Med Sci Sports.* 2010; 20: 28-38.

Desaki, J. Regeneration of muscle fibers in the extensor digitorum longus muscle of the aged rat. *J Electron Microsc.* 2008; 57(2): 59-66.

Docker MF. A review of instrumentation available for therapeutic ultrasound. *Physiotherapy.* 1987; 73(4): 154-5.

Dyson M. Non-thermal cellular effects of ultrasound. *Br J Cancer Suppl.* 1982; 5: 165-71.

Dyson M. Mechanisms involved in therapeutic ultrasound. *Physiotherapy.* 1987; 73(3): 116-20.

Enwemeka CS, Rodriguez O, Mendosa S. The biomechanical effects of low-intensity ultrasound on healing tendons. *Ultrasound Med Biol.* 1990; 16(8): 801-7.

Faria FE, Ferrari RJ, Distefano G, Ducatti AC, Soares KF, Montebelo MI, et al. The onset and duration of mobilization affect the regeneration in the rat muscle. *Histol Histopathol.* 2008; 23(5): 565-71.

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

Füchtbauer EM, Westphal H. MyoD and Myogenin are coexpressed in regenerating skeletal muscle of the mouse. *Dev Dyn.* 1992; 193: 34-9.

Gayraud-Morel B, Chretien F, Tajbakhsh S. Skeletal muscle as a paradigm for regenerative biology and medicine. *Regen Med.* 2009; 4: 293-319.

Gibson MC, Schultz E. Age-related differences in absolute numbers of skeletal muscle satellite cells. *Muscle Nerve.* 1983; 6: 574-80.

Grounds MD, Torrisi J. Anti-TNFalpha (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.

Guirro RRJ, Guirro ECO, Martins CC, Nunes FR. Analysis of low-level laser radiation transmission in occlusive dressings. *Photomed Laser Surg.* 2010; 28(4): 459-63.

Iyomasa DM, Garavelo I, Iyomasa MM, Watanabe L, Issa JPM. Ultrastructural analysis of the low level laser therapy effects on the lesioned anterior tibial muscle in the Gerbil. *Micron.* 2009; 40: 413–18.

Järvinen MJ, Lehto MU. The effects of early mobilisation and immobilisation on the healing process following muscle injuries. *Sports Med.* 1993; 15(2): 78-89.

Järvinen TA, Kääriäinen M, Järvinen M, Kalimo H. Muscle strain injuries. *Curr Opin Rheumatol.* 2000; 12(2): 155-61.

Järvinen TAH, Järvinen TLN, Kääriäinen M, Kalimo H, Järvinen M. Muscle injuries: Biology and treatment. *Am J Sports Med.* 2005; 33(5): 745-64.

Kitchen S. Eletroterapia: Prática baseada em evidências. Barueri: Manole; 2003. 348p.

Koishi K, Zhang M, McLennan IS, Harris AJ. MyoD protein accumulates in satellite cells and is neurally regulated in regenerating myotubes and skeletal muscle fibers. *Dev Dyn*. 1995; 202: 244-54.

Lacourt MX, Marini LL. Decréscimo da função muscular decorrente do envelhecimento e a influência na qualidade de vida do idoso: uma revisão de literatura. *Rev Bras Cien Env Hum*. 2006; 3: 114-21.

Lapointe BM, Frémont P, Côté CH. Influence of nonsteroidal anti-inflammatory drug treatment duration and time of onset on recovery from exercise-induced muscle damage in rats. *Arch Phys Med Rehabil*. 2003; 84(5): 651-5.

Lehto M, Duance VC, Restall D. Collagen and fibronectin in a healing skeletal muscle injury. An immunohistological study of the effects of physical activity on the repair of injured gastrocnemius muscle in the rat. *J Bone Jt Surg Br*. 1985; 67(5): 820-8.

Lieber RL. Skeletal muscle structure, function & plasticity: The physiological basis of rehabilitation. 2. ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 2002. 448p.

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

Markert CD, Merrick MA, Kirby TE, Devor ST. Nonthermal ultrasound and exercise in skeletal muscle regeneration. *Arch Phys Med Rehabil*. 2005; 86: 1303-10.

Matheus JPC, Oliveira FB, Gomide LB, Milani JGPO, Volpon JB, Shimano AC. Efeitos do ultrassom terapêutico nas propriedades mecânicas do músculo esquelético após contusão. *Rev Bras Fisioter*. 2008; 12(3): 241-7.

Manteifel V, Bakeeva L, Karu T. Ultrastructural changes in chondriome of human lymphocytes after irradiation with He-Ne laser: Appearance of giant mitochondria. *J Photochem Photobiol B*. 1997; 38(1): 25-30.

Matsudo SMM. Envelhecimento e atividade física: Atividades Físicas para a Terceira Idade, Brasília, 1997: 22-36.

Merrick MA, Rankin JM, Andres FA, Hinman CL. A preliminary examination of cryotherapy and secondary injury in skeletal muscle. *Med Sci Sports Exerc.* 1999; 31(11): 1516-21.

Mesquita-Ferrari RA, Martins MD, Silva Jr JA, Silva TD, Piovesan RF, Pavesi VCS, et al. Effects of low-level laser therapy on expression of TNF- α and TGF- β in skeletal muscle during the repair process. *Lasers Med. Sci.* 2011; 26: 335-40.

Minamoto VB. Um modelo de contusão no músculo soleus de rato: lesão e regeneração após trauma único e recorrente [dissertação]. São Carlos: UFSCAR; 1997.

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

Nogueira DGM. Efeito do laser de baixa intensidade no processo de cicatrização muscular e células satélites [dissertação]. Franca: UNIFRAN; 2006.

Oliveira NM, Parizotto NA, Salvini TF. GaAs (904 nm) laser radiation does not affect muscle regeneration in mouse skeletal muscle. *Lasers Surg Med.* 1999; 25(1): 13-21.

Oliveira RF, Oliveira DAAP, Monteiro W, Zangaro RA. Comparison between the effect of low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasonic irradiation in vitro. *Photomed Laser Surg.* 2008; 26(1): 6-9.

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

Passarella S, Ostuni A, Atlante A, Quagliariello E. Increase in the ADP/ATP exchange in rat liver mitochondria irradiated in vitro by helium-neon laser. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988; 156(2): 978-86.

Pastore D, Di Martino C, Bosco G, Passarella S. Stimulation of ATP synthesis via oxidative phosphorylation in wheat mitochondria irradiated with helium-neon laser. *Biochem Mol Biol Int.* 1996; 39 (1): 149-57.

Picchi LD, Facio FA, Sestare THI, Minamoto VB. Análise histológica dos padrões de lesão muscular de ratos, a curto e longo prazo, pós contusão muscular. In: XIX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental; 2004. Águas de Lindóia.

Piedade MC, Galhardo MS, Battlehner CN, Ferreira MA, Caldini EG, De Toledo OM. Effect of ultrasound therapy on the repair of gastrocnemius muscle injury in rats. *Ultrasonics*. 2008; 48(5): 403-11.

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

Pinto MVM, Costa DA, Rocha LLV, Santos HR, Silva ALS, Barbosa LG, et al. Comparative Study of the Effects of the Ga-As (904 nm, 150mW) Laser and the Pulsed Ultrasound of 1 MHz in Inflammation of Tibialis Muscle of Wistar Rats. *Braz. Arch. Biol. Technol*. 2008; 51:225-30.

Rantanen J, Hurme T, Lukka R, Heino J, Kalimo H. Satellite cell proliferation and the expression of myogenin and desmin in regenerating skeletal muscle: Evidence for two different populations of satellite cells. *Lab Invest*. 1995; 72(3): 341-7.

Rantanen J, Thorsson O, Wollmer P, Hurme T, Kalimo H. Effects of therapeutic ultrasound on the regeneration of skeletal myofibers after experimental muscle injury. *Am J Sports Med*. 1999; 27(1): 54-9.

Rathbone CR, Yamanouchi K, Chen XK, Nevoret-Bell CJ, Rhoads RP, Allen RE. Effects of transforming growth factor-beta (TGF- β 1) on satellite cell activation and survival during oxidative stress. *J Muscle Res Cell Motil.* 2011; 32: 99–109.

Reddy GK. Photobiological basis and clinical role of low-intensity lasers in biology and medicine. *J Clin Photomed Laser Surg.* 2004; 23: 289-94.

Renault V, Piron-Hamelin G, Forestier C, Didonna S, Decary S, Hentati F, et al. Skeletal muscle regeneration and the mitotic clock. *Exp Gerontol.* 2000; 35(6): 711-9.

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

Rodrigues NC. Ação da laserterapia de baixa intensidade (830 nm) na regeneração muscular de ratos idosos [dissertação]. São Carlos: UFSCAR; 2009.

Salvini TF, Morini CC, Perez SEA, Ferreira Filho P. The effect of cryotherapy and treadmill exercise on the mouse soleus muscle damage. *Rev Bras Fisioter.* 1997; 2(2): 77-86.

Shefer G, Partridge TA, Heslop L, Gross JG, Oron U, Halevy O. Low-energy laser irradiation promotes the survival and cell cycle entry of skeletal muscle satellite cells. *J Cell Sci.* 2002; 115(7): 1461-9.

Shefer G, Van De Mark DP, Richardson JB, Yablonka-Reuveni Z. Satellite cell pool size does matter: Defining the myogenic potency of aging skeletal muscle. *Dev Biol.* 2006; 294: 50-66.

Silva H, Conboy IM. Aging and stem cell renewal. [livro na internet]. Cambridge: Harvard Stem Cell Institute; 2008 [acesso 2010 Jun 14]. Disponível em: <http://www.stembook.org>.

Silva TAA, Frisoli JA, Pinheiro MM, Szejnfeld VL. Sarcopenia associada ao envelhecimento: aspectos etiológicos e opções terapêuticas. *Rev Bras Reumatol.* 2006; 46(6): 391-7.

Srikuea R, Pholpramool C, Kitiyanant Y, Yimlamai T. Satellite cell activity in muscle regeneration after contusion in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2010; 37(11): 1078-86.

Tedesco FS, Dellavalle A, Diaz-Manera J, Messina G, Cossu G.

Repairing skeletal muscle: Regenerative potential of skeletal muscle stem cells. J Clin Invest. 2010; 120(1): 11-9.

Thorsson O, Rantanen J, Hurme T, Kalimo H. Effects of nonsteroidal antiinflammatory medication on satellite cell proliferation during muscle regeneration. Am J Sports Med. 1998; 26(2): 172-6.

van Der Poel C, Gosselin LE, Schertzer JD, Ryall JG, Swiderski K, Wondemaghen M et al. Ageing prolongs inflammatory marker expression in regenerating rat skeletal muscles after injury. J Inflamm. 2011; 8(1): 41.

van der Windt DAWM, van der Heijdenb GJMG, van den Bergc SGM, ter Rietd G, Wintera AF, Boutera LM. Ultrasound therapy for musculoskeletal disorders: a systematic review. Pain. 1999; 81: 257–71.

Venojärvi M, Kvist M, Atalay M, Jozsa L, Kalimo H. Recovery from immobilisation: responses of fast-twitch muscle fibres to spontaneous and intensive exercise in rat calf muscles. Pathophysiology. 2004; 11(1): 17-22.

Vignaud A, Noirez P, Besse S, Rieu M, Barritault D, Ferry A. Recovery of slow skeletal muscle after injury in the senescent rat. *Exp Gerontol.* 2003; 38: 529–37.

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

Warden SJ. A new direction for ultrasound therapy in sports medicine. *Sports Med.* 2003; 33(2): 95-107.

Wilden L, Karthein R. Import of radiation phenomena of electrons and therapeutic low-level laser in regard to the mitochondrial energy transfer. *J. Clin Laser Med. Surg.* 1998; 16 (3): 159-65.

Wilkin LD, Merrick MA, Kirby TE, Devor ST. Influence of therapeutic ultrasound on skeletal muscle regeneration following blunt contusion. *Int J Sports Med.* 2004; 25(1): 73-7.

Winkler T, von Roth P, Matziolis G, Schumann MR, Hahn S, Strube P, et al. Time course of skeletal muscle regeneration after severe trauma. *Acta Orthop.* 2011; 82(1):102-11.

Young HE, Duplaa C, Romero-Ramos M, Chesselet MF, Vourc'h P, Yost MJ, et al. Adult reserve stem cells and their potential for tissue engineering. *Cell Biochem Biophys*. 2004; 40(1): 1-80.

Zammit PS, Partridge TA, Yablonka-Reuveni Z. The skeletal muscle satellite cell: The stem cell that came in from the cold. *J Histochem Cytochem*. 2006; 54(11): 1177-91.

ANEXO



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

Parecer da Comissão de Ética em Experimentação Animal nº 011/2010

Protocolo nº. 012/2010

A Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos - CEEA/UFSCar **APROVOU** o projeto sob título *“Avaliação da regeneração muscular em animais idosos após tratamento com ultra som e laser de baixa intensidade”* elaborado pela pesquisadora Adriana Pertille

São Carlos, 13 de abril de 2010.

Profa. Dra. Keico Okino Nonaka

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal