

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

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DO
MOVIMENTO HUMANO**

**Efeito do Laser de Baixa Intensidade na Regeneração Muscular em
Modelo Experimental Desnutrido/Recuperado**

Maisa Cardoso da Silva

2017

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

MAISA CARDOSO DA SILVA

**EFEITO DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE
NA REGENERAÇÃO MUSCULAR EM
MODELO EXPERIMENTAL
DESNUTRIDO/RECUPERADO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências do Movimento Humano, da Universidade Metodista de Piracicaba, para obtenção do título de Mestre em Ciências do Movimento Humano.

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Pertille

PIRACICABA

2017

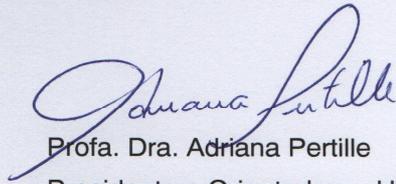
Ficha Catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da UNIMEP
Bibliotecária: Marjory Harumi Barbosa Hito CRB-8/9128

S586e	<p>Silva, Maisa Cardoso da Efeito do laser de baixa intensidade na regeneração muscular em modelo experimental desnutrido/recuperado / Maisa Cardoso da Silva. – 2017. 40 f. : il. ; 30 cm.</p> <p>Orientadora: Profa. Dra. Adriana Pertille Dissertação (mestrado) – Universidade Metodista de Piracicaba, Ciências do Movimento Humano, Piracicaba, 2017.</p> <p>1. Desnutrição. 2. Regeneração (Fenômenos Biológicos) - Músculos. 3. Terapia a Laser. I. Pertille, Adriana. II. Título.</p> <p>CDU – 612.748.5</p>
-------	---

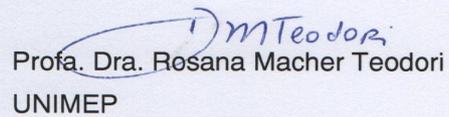
**EFEITO DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE NA REGENERAÇÃO MUSCULAR EM
MODELO EXPERIMENTAL DESNUTRIDO/RECUPERADO**

MAISA CARDOSO DA SILVA

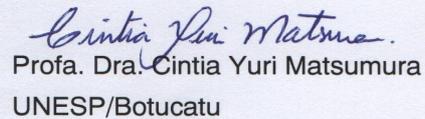
Dissertação de Mestrado defendida e aprovada em 21 de fevereiro de 2017, pela Banca Examinadora constituída pelos Professores:



Profa. Dra. Adriana Pertille
Presidente e Orientadora - UNIMEP



Profa. Dra. Rosana Macher Teodori
UNIMEP



Profa. Dra. Cintia Yuri Matsumura
UNESP/Botucatu

Agradecimento

Agradeço à Deus por estar concluindo mais essa etapa em minha vida.

À meus pais por todo o apoio durante esses dois anos.

À minha orientadora pela colaboração e conhecimento aplicados no desenvolvimento do trabalho.

Aos amigos que conheci no programa e que me apoiaram durante todo o período, me ajudando e dividindo seus conhecimentos.

A CAPES-PROSUP pelo apoio em concluir mais uma etapa importante em minha vida.

Aos componentes da banca examinadora, por aceitarem prontamente o convite e contribuírem para o enriquecimento deste trabalho. Muito obrigada!

RESUMO

A desnutrição é uma condição decorrente de um aporte insuficiente de nutrientes ou de um inadequado aproveitamento biológico dos alimentos ingeridos, que gera déficits importantes no metabolismo, comprometendo os sistemas, incluindo o musculoesquelético. Considerando que a ocorrência de lesões musculares é um fato comum, uma opção de tratamento para a recuperação é a terapia por laser de baixa intensidade (Low-Level Laser Therapy – LLLT), que diminui o tempo de cicatrização e garante melhor reparo da lesão. Assim, o objetivo do trabalho foi analisar os efeitos da LLLT na recuperação muscular de ratos submetidos à desnutrição e recuperação proteica, por meio de análises morfológicas e bioquímicas. Foram utilizados 40 ratos Wistar, recém-desmamados, divididos aleatoriamente em dois grupos (n=20): Grupo Controle (C) submetido somente a dieta normoproteica (14%) e o Grupo Desnutrido/ Recuperado (D) submetido a dieta hipoproteica (6%) por 45 dias e recuperados por mais 45 dias com ração normoproteica (14%). Ao completar a fase de recuperação nutricional, todos os animais foram submetidos à criolesão no músculo tibial anterior direito, e subdivididos nos grupos (n=5): Controle Lesão (C), Controle Laser (CL), Desnutrido/Recuperado Lesão (D) e Desnutrido/Recuperado Laser (DL). Após 24 h da lesão, os grupos CL e DL receberam tratamento com LLLT diodo AsGaAl 830nm, na forma contínua, potência de 30mW e densidade de energia de 20J/cm², durante 80 segundos, em dias intercalados. Ao término do protocolo os animais foram eutanasiados 7 ou 21 dias após a lesão dependendo do grupo experimental. O músculo tibial anterior direito (lesado) foi retirado, pesado e dividido transversalmente em duas partes iguais, sendo uma parte destinada à técnica de microscopia de luz (HE) e a outra à técnica de immunobloting (marcação da citocinas TNF- α , TGF- β 1 e proteína m-TOR). A avaliação dos resultados foi feita pelo teste ANOVA, com valor de $p \leq 0,05$ para significância estatística. Os resultados mostraram que os animais submetidos à dieta hipoproteica e recuperados apresentaram redução na massa corporal quando comparados aos animais submetidos à dieta normoproteica ($p \leq 0,05$). Aos 7 dias houve redução da inflamação e da TNF- α nos grupos controle e desnutrido 21 dias ($p \leq 0,05$), porém nos animais irradiados não houve esse resultado foi observado somente aos 21 dias, sem alteração nos valores de TNF- α . A Densidade de Área de Tecido Conjuntivo demonstrou o mesmo comportamento, porém os níveis de TGF- β 1 não foram influenciados pela LLLT. A Área de Secção Transversa e a m-Thor aumentaram com o tratamento por LLLT nas fases finais da regeneração. Com os resultados do presente estudo pode-se concluir que a terapia com laser de baixa intensidade (830 nm) favoreceu a regeneração muscular na fase tardia (21 dias) em modelo experimental de desnutrição proteica pós-natal com posterior recuperação.

Palavras-Chave: Desnutrição, Regeneração Muscular, terapia por luz de baixa intensidade

ABSTRACT

Malnutrition is a condition due to an insufficient supply of nutrients or an inadequate biological utilization of the food ingested, which generates important deficits in the metabolism, compromising the systems, including the musculoskeletal system. Considering that the occurrence of muscle injuries is a common fact, a treatment option for recovery is Low Level Laser Therapy (LLLT), which decreases healing time and ensures better injury repair. Thus, the objective of this work was to analyze the effects of LLLT on the muscle recovery of rats subjected to malnutrition and protein recovery, through morphological and biochemical analyzes. Wistar rats were randomly divided into two groups (n = 20): Control Group (C) submitted to the normoprotein diet (14%) and the Undernourished / Recovered Group (D) submitted to a hypoprotein diet (6 %) For 45 days and recovered for another 45 days with normoproteic diet (14%). At the end of the nutritional recovery phase, all animals were submitted to cryolesion in the right tibialis muscle and subdivided into groups (n = 5): Control Lesion (C), Laser Control (CL), Malnutrition / And Malnourished / Recovered Laser (DL). After 24 h of injury, CL and DL groups were treated with LLLT 830nm diode AsGaAl, in continuous form, 30mW power and energy density of 20J / cm², for 80 seconds, on interspersed days. At the end of the protocol the animals were euthanized 7 or 21 days after injury depending on the experimental group. The right (injured) anterior tibial muscle was removed, weighted and divided transversely into two equal parts, one part being dedicated to the light microscopy (HE) technique and the other to the immunoblotting technique (TNF- α cytokine, TGF- B1 and m-TOR protein). The ANOVA test was used to evaluate the results, with a value of $p \leq 0.05$ for statistical significance. The results showed that the animals submitted to the hypoproteic diet and recovered showed a reduction in body mass when compared to the animals submitted to the normoprotein diet ($p \leq 0.05$). At 7 days there was a reduction of inflammation and TNF- α in the control and malnourished groups for 21 days ($p \leq 0.05$), but in the irradiated animals, this result was observed only at 21 days, with no change in TNF- α values. Conjunctival Tissue Density demonstrated the same behavior, but TGF- β 1 levels were not influenced by LLLT. The Transverse Section Area and m-Thor increased with LLLT treatment in the final stages of regeneration. With the results of the present study, it can be concluded that low-intensity laser therapy (830 nm) favored muscle regeneration in the late phase (21 days) in an experimental model of postnatal protein malnutrition with subsequent recovery.

Key words: Malnutrition, Muscular Regeneration, Low-Level Laser Therapy

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. OBJETIVOS	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	
3.1 Nutrição	13
3.2 Grupos Experimentais	14
3.3 Procedimento de lesão muscular	14
3.4 Protocolo de Laserterapia de Baixa Intensidade	15
3.5 Eutanásia dos animais	15
3.6 Análise Histológica	16
3.7 Técnica de Immunoblotting	
3.7.1 Preparação Extrato Total	17
3.7.2 Eletroforese	17
3.7.3 Análise das Bandas imunorreativas	18
3.7.4 Anticorpos	18
3.8 Análise Estatística	19
4. RESULTADOS	20
4.1 Quantificação da Área de Inflamação/Regeneração e TNF- α	20
4.2 Quantificação da Área de Densidade de Tecido Conjuntivo (DATC) e TGF- β 1	22
4.3 Quantificação da Área de Secção Transversa (AST) e m-TOR	24
5. DISCUSSÃO	28
6. CONCLUSÃO	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
ANEXO I	40

1. INTRODUÇÃO

A desnutrição é uma condição decorrente de um aporte insuficiente de nutrientes e energia ou de um inadequado aproveitamento biológico dos alimentos ingeridos. Tal condição não se relaciona, necessariamente, à condição de fome do indivíduo, mas pode ser ocasionada também por desmame precoce, déficit nutricional de vitaminas e minerais, incidência repetida de infecções (MONTEIRO, 2003).

Dados do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) de 2010 apontam que a insegurança alimentar, ou seja, estar restrito à alimentação ou mesmo ter a possibilidade de que a restrição ocorra, está presente em 5,8% dos moradores de domicílios particulares, o que corresponde a 11,2 milhões de pessoas (IBGE, 2010).

Nos países em desenvolvimento a desnutrição é a segunda causa de morte mais frequente em crianças menores de 5 anos, sendo que nos casos de portadores de desnutrição grave, as taxas de mortalidade correspondem a cerca de 20 a 30% dos casos. Os fatores que colaboram para tais índices incluem uma reidratação inadequada levando à falência cardíaca, falta de conhecimento sobre as infecções que levam à septicemia e falhas no reconhecimento da vulnerabilidade de crianças desnutridas à hipoglicemia e à hipotermia (SCHOFIELD; ASWORT, 1996; WHO, 1996).

A desnutrição proteica leva a alterações no sistema imune, que incluem a perda de mediadores imunológicos plasmáticos, como por exemplo o TNF (*Tumor Necrosis Factor*), e a deficiência de carboidratos provoca distúrbios metabólicos que levam ao aumento na degradação intercelular de ácidos graxos (MULLER; KRAWINKEL, 2005). Além disso, a carência nutricional de proteínas leva a déficits importantes no metabolismo, já que as mesmas exercem papel significativo no ciclo vital do homem e suas funções estão ligadas à maior parte das reações homeostáticas do organismo, dentre as quais podemos citar a formação de enzimas, formação de anticorpos, formação de hormônios, equilíbrio ácido-básico, distribuição de líquidos no

organismo, transporte de substâncias, transporte de oxigênio, coagulação sanguínea e atividade muscular (NEIVA; GUERINO; MELLO, 1999).

As lesões musculares são comuns, bem como os traumas ortopédicos e doenças musculares. A incapacidade gerada por tais lesões está diretamente relacionada com as propriedades intrínsecas de recuperação do músculo, que envolve a presença de células satélites, que tem capacidade de proliferação e diferenciação, podendo gerar novas fibras; como resultado final à cascata de eventos para recuperação muscular há o acúmulo de matriz extracelular, composta principalmente por colágeno, resultando na formação da cicatriz. (MANN et al., 2011; SHIN et al., 2014; TIDBALL; VILLALTA, 2010).

O processo de reparação do tecido muscular passa por três fases: a primeira é a fase de destruição, caracterizada pela ruptura e necrose das fibras, formação de hematoma e reação inflamatória celular; em seguida vem a fase de reparação, onde há fagocitose do tecido necrosado e regeneração das fibras, com concomitante produção de tecido conjuntivo e crescimento de capilares na área lesada; por último vem a fase de remodelação, na qual ocorre a maturação das fibras regeneradas, contração e formação do tecido cicatricial e recuperação da capacidade funcional do músculo (KALIMO et al., 1997 apud JÄRVINEN et al., 2005).

Nos casos de desnutrição, há uma redução na disponibilidade de aminoácidos, carboidratos, lipídios, vitaminas e sais minerais, que são fundamentais para o acúmulo de fontes de energia, proliferação celular, resistência à tração em feridas e síntese de colágeno. A redução de proteínas também dificulta o processo de reparação tecidual, prolongando a fase de cicatrização, reduzindo o número de fibroblastos, diminuindo a resistência do tecido e aumentando as uniões não-cicatriciais. Com isso, as principais fases do processo de cicatrização são prejudicadas, devido a alterações no processo de síntese proteica e ao maior estímulo na lise das fibras colágenas organizadas (ARCHIBALD, 1976 apud MEIRELES et al., 2014; SILVEIRA, 1997).

Como opção de tratamento para a recuperação de lesões musculares, a terapia por laser de baixa intensidade (Low-Level Laser Therapy – LLLT)

apresenta uma série de vantagens quando comparada aos tratamentos convencionais. Além disso, o tratamento com laser é visto como uma alternativa para diminuir o tempo de cicatrização e garantir melhor reparo da lesão em pacientes que, por conta de alguma condição sistêmica, como a desnutrição, tem esse processo prejudicado (MEIRELES et al., 2014).

O efeito da LLLT se dá devido à absorção de luz pelos tecidos, gerando modificações no metabolismo celular. São os cromóforos receptores localizados nas células que absorvem a luz emitida, permitindo que a mesma module reações bioquímicas específicas no interior das células, além de estimular uma série de reações mitocondriais em cadeia, resultando na síntese de ATP (DORTBUDAK, 2000; STEIN et al., 2005).

Na fase inflamatória da lesão, onde há recrutamento de neutrófilos e macrófagos para o local, além de produção de citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-1A, IL-6 e IL-8) e enzimas proteolíticas responsáveis pela fagocitose das células e propagação da inflamação, o laser atua aumentando a reparação do tecido por meio de sua capacidade para limitar a resposta inflamatória e atenuar o dano oxidativo (JARVINEN et al., 2005; MANN et al., 2011). O laser demonstrou também ser mais efetivo que o fármaco diclofenaco sódico, potente anti-inflamatório não esteroideal que atua atando a via de inibidores da COX (BUTTERFIELD et al., 2006)

Outros fatores benéficos da aplicação da LLLT em lesões musculares incluem a redução no número de células inflamatórias e enzimas responsáveis pela liberação de fatores quimiotáticos nas fases iniciais da inflamação e a inibição da síntese de prostaglandinas e citocinas inflamatórias (CRESSONI et al., 2008; DOURADO et al., 2003; MESQUITA-FERRARI et al., 2011; RENNO et al., 2011).

Os efeitos da LLLT na reparação tecidual dependem diretamente dos parâmetros de irradiação e tratamento, como comprimento de onda, energia irradiada, área irradiada e tempo de aplicação, sendo calculada através desses parâmetros a dose total de energia irradiada. Para efeito de reparação, estudos apresentam doses variadas de irradiação, em um intervalo que varia entre 632,8 e 904 nm, com efeitos terapêuticos obtidos em exposições de 1J/cm² até

valores superiores a 300 J/cm². Outro fator variável é o número de dias e de sessões de tratamento (MANTINEO et al., 2014; PIVA et al., 2011; RAMOS et al., 2012).

A modalidade de aplicação do laser também é um fator importante a ser levado em consideração, podendo ocorrer de forma contínua ou pulsada. A maioria dos estudos utiliza a aplicação de forma contínua, principalmente para a recuperação do músculo esquelético. A forma pulsada oferece benefícios quando aplicada em casos de cicatrização de feridas e pós acidente vascular cerebral (HASHMI et al., 2010; MANTINEO et al., 2014).

Sabe-se que o laser aplicado na faixa do infravermelho gera uma indução de efeitos fotofísicos e fotoelétricos na membrana das células, gerando excitação de elétrons e vibração e rotação de uma parte ou mesmo de todas as moléculas, promovendo um aumento intracelular na síntese de ATP (COLLS, 1986 apud MEIRELES, 2014).

Diante da constante necessidade de ampliação dos conhecimentos do terapeuta quanto à aplicabilidade e efetividade de parâmetros dos recursos fisioterapêuticos como da LLLT, e visando maior conhecimento das etapas do processo de regeneração muscular em modelos experimentais desnutridos e recuperados, este estudo teve por objetivo analisar o efeito da LLLT em ratos, submetidos à criolesão e tratados com alta densidade de energia do laser de 830 nm.

Considerando que o tempo médio para a recuperação completa do músculo esquelético após lesão é de 21 dias (JÄRVINEN et al., 2005) e que LLLT pode favorecer o processo de reparo do tecido, com aumento da angiogênese e da formação de miotubos, a hipótese desse estudo é que a terapia com LLLT favorecerá a regeneração muscular nos animais submetidos ao protocolo de desnutrição e recuperação nutricional.

2. OBJETIVO

Avaliar os efeitos da terapia com laser de baixa intensidade (830 nm) na recuperação muscular de ratos submetidos à desnutrição e recuperação proteica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 40 ratos jovens da linhagem Wistar adquiridos na Anilab Paulínia/SP e mantidos no Biotério da Faculdade de Ciências da Saúde (FACIS-UNIMEP), sob temperatura ambiente de $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, submetidos a ciclo claro/escuro de 12h, com água e ração *ad libitum*. Em média foram alocados quatro animais em caixas de polietileno de tamanho médio.

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Metodista de Piracicaba (UNIMEP), sob o protocolo nº 03/2016 (Anexo I)

3.1 Nutrição

As dietas normoproteica (AN 93M - 14%) e hipoproteica (AN - 6%) comercializada por Prag Soluções Serviços e Comércio Ltda; CNPJ: 03.420.938/0001-59 / IE: 401.091.476.112-ME foram utilizadas (Tabela 1).

Tabela 1: Composição das dietas utilizadas pelos grupos experimentais (em gramas)

Ingredientes	Dieta AN 93 – 14% proteína	Dieta AN – 6% proteína
	(p/1 Kg)	(p/1 Kg)
Amido de milho	465,7	508,0
Caseína	140,0	66,0
Amido dextrinizado	155,0	166,5
Sacarose	100,0	121,0
Óleo de soja	40,0	40,0
Fibra (Cel. Microcrist.)	50,0	50,0
L-cistina	1,8	1,0
Cloreto colina	2,5	2,5
Mix mineral G	35,0	35,0
Mix vitamínico	10,0	10,0
Total	1000,0	1000,0

Fonte: Reeves, Nielsen e Fahey Jr (1993)

3.2 Grupos Experimentais

Os animais recém-desmamados foram divididos aleatoriamente em dois grupos:

- Grupo Controle (C, n=20): animais receberam a dieta normoproteica (AIN 93M – 14% de proteína) por 90 dias.

- Grupo Desnutrido / Recuperado (D, n=20): animais receberam dieta hipoproteica (AIN – 6% de proteína) por 45 dias e, em seguida, foram recuperados com dieta normoproteica (AIN 93M – 14% de proteína) por 45 dias.

Ao completar 90 dias de dieta, os animais foram submetidos à criolesão e eutanasiados 7 ou 21 dias após a lesão conforme tabela 2.

Tabela 2. Grupos experimentais (n=5 por grupo)

Controle (C)	Desnutrido/Recuperados (D)
Lesão 7 dias (C7)	Lesão 7 dias (D7)
Lesão + LLLT por 7 dias (C7L)	Lesão + LLLT por 7 dias (D7L)
Lesão 21 dias (C21)	Lesão 21 dias (D21)
Lesão + LLLT por 21 dias (C21L)	Lesão + LLLT por 21 dias (D21L)

A massa corporal foi verificada após o primeiro dia da chegada dos animais ao biotério e repetida a cada sete dias, até o fim de todo período experimental, utilizando-se uma balança digital calibrada (GEHAKA, BG 1000).

3.3 Procedimento da Lesão Muscular

Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de uma mistura de cloridrato de cetamina (1,16 g/10 mL) e cloridrato de xilazina (2 g/100 mL), na proporção de 3:2, em dose de 0,09 e 0,06 mL/100g de massa corporal, respectivamente. Após apresentar sinais de anestesia, a região anterior do membro pélvico direito foi tricotomizada e o músculo tibial anterior exposto. Para a lesão foi utilizada uma barra metálica de 1 cm x 0,5 cm resfriada em nitrogênio líquido por 30 segundos. A haste metálica resfriada foi pressionada sobre o ventre muscular do músculo tibial anterior por 10 segundos; em seguida, foi imersa novamente em nitrogênio líquido por 30

segundos, e pressionada novamente no mesmo local por mais 10 segundos, segundo o protocolo de Miyabara et al. (2006). Após o procedimento de lesão a fáscia muscular e a pele foram suturadas e os animais foram alocados individualmente em gaiolas com ração e água *ad libitum* até sua recuperação pós cirúrgica. Posteriormente foram alocados em gaiolas coletivas com no máximo 4 animais por gaiola.

3.4 Protocolo de Laserterapia de Baixa Intensidade

Para o tratamento foi utilizado o laser de baixa intensidade de diodo AsGaAl na forma contínua, com comprimento de onda de 830 nm, potência de 30 mW e densidade de energia de 20 J/cm² (Pertille et al., 2012). Os animais foram submetidos às aplicações realizadas por meio da técnica pontual (em um único ponto) acima da área lesada durante 80 segundos, sendo os mesmos contidos manualmente por um pesquisador enquanto a aplicação do laser foi realizada por outro pesquisador. O tratamento iniciou-se 24 horas após a lesão, três vezes na semana, em dias intercalados. Os animais dos grupos 7 dias (C7L e D7L) receberam no total três sessões de tratamento e os animais dos grupos 21 dias (C21L e D21L) receberam nove sessões de tratamento.

3.5 Eutanásia dos Animais

Após o período experimental, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de uma mistura de cloridrato de cetamina (1,16 g/10 mL) e cloridrato de xilazina (2 g/100 mL), na proporção de 3:2, em dose de 0,09 e 0,06 mL/100g de massa corporal, respectivamente. Após sinais de anestesia geral, foi realizado pneumotórax para sacrifício do animal e, posteriormente, o músculo tibial anterior direito (lesado) foi retirado e dividido transversalmente em duas partes iguais, sendo uma parte destinada à técnica de microscopia de luz e a outra parte destinada à técnica de imunoblotting.

3.6 Análise Histológica

Parte dos músculos de cada animal foi fixada em suporte de madeira com tragacanth gum, imerso em isopentano à -90°C por 40 segundos e imediatamente colocado em nitrogênio líquido à -196°C e mantidos em tambores de nitrogênio. Para obtenção dos cortes, os músculos foram descongelados por aproximadamente 30 minutos até atingirem a temperatura de -23°C , e seccionados transversalmente utilizando um criostato (modelo HYRAX C 25 - Zeiss). Cortes transversais não seriados com espessura de 10 μm foram coletados para coloração de Hematoxilina e Eosina. Os cortes foram mantidos em álcool 70%. 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, e posteriormente iniciou-se a desidratação em álcool e a diafanização em xilol. As lâminas foram montadas com Entellan e utilizadas para mensuração da área de secção transversa (AST), da área de inflamação / regeneração (% Infl/Reg) e da densidade de área de tecido conjuntivo (DATC).

Dois cortes aleatórios de cada lâmina foram escolhidos para as medidas. Para a AST foram analisadas, por animal, 200 fibras em regeneração utilizando microscópio óptico com câmera acoplada, com objetiva de 20X e conectado a um computador com software Image Pro-Plus[®] 6.0 (Media Cybernetics).

A área de inflamação e regeneração foi caracterizada por apresentar intenso infiltrado inflamatório e fibras em estágio inicial de regeneração. Essas fibras possuem pequeno diâmetro, citoplasma escasso fortemente basófilo e núcleo central (MARQUES et al., 2008). Para esta análise foi utilizado microscópio óptico com câmera acoplada, com objetiva de 4X para realização das fotos de todo o corte transversal. Posteriormente as imagens foram montadas no Power Point e analisadas no programa Image J[®], calculando a área total do músculo (corte transversal) e a área com infiltrado inflamatório e com fibras em processo inicial de regeneração.

A mensuração da DATC foi realizada por meio do software Image Pro Express com imagens adquiridas através de vídeo câmera (Nikon Express Series), acoplada ao microscópio de luz (Nikon Eclipse E 400) com objetiva de

20X, onde foram analisadas 15 imagens por animal, e sobre as imagens foi sobreposta uma grade contendo 88 intersecções, onde foram contabilizadas quais estavam sobre o tecido conjuntivo, e posteriormente o resultado foi transformado em porcentagem.

3.7 Técnica de Immunoblotting

3.7.1 Preparação de Extrato Total

A outra parte dos músculos foi cortada em pequenos pedaços e homogeneizada em tampão específico, 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 a 4°C por 20 minutos e o sobrenadante utilizado para análise por extrato total.

3.7.2 Eletroforese

As amostras dos extratos protéicos foram tratadas com tampão Laemmli, 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 a 15% em aparelho para eletroforese da Bio-Rad (mini-Protean, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, EUA). Foram obtidos três extratos proteicos por grupo, resultando em 12 géis. 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 lavadas com solução basal e incubadas com 10 µg de anticorpo primário diluído em 10 mL de solução basal contendo 1% 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 1% 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).

Após obtenção de bandas, as membranas foram lavadas com solução basal e incubadas com 10 mL de *Stripping Buffer* (10mM Tris-HCl pH 7,5; β -*Mercaptoethanol* 0,1M; Uréia 8M) durante 1h, à 60° C. Posteriormente as membranas foram incubadas em Tris-HCl 1M pH 7,5 por 30 min para neutralizar o *stripping*, lavadas com solução basal e processadas conforme descrito previamente para marcação da proteína gliceraldeído 3-fosfato de hidrogenase (GAPDH). Esta é uma proteína de controle interno, pois a quantidade desta proteína não se altera em diferentes condições fisiológicas.

3.7.3 Análise das Bandas Imunorreativas

As bandas observadas foram digitalizadas para quantificação da densitometria óptica usando o programa Image J[®] (The National Institute of Health, EUA).

3.7.4 Anticorpos

Anticorpos Primários

- TGF- β 1 (*transforming growth factor beta*), mouse monoclonal, Sigma-Aldrich, T7039;
- TNF- α (*tumor necrosis factor alfa*), mouse monoclonal, Sigma, T0157;
- m-TOR (*mammalian target of rapamycin*), rabbit policlonal, Sigma, T2949;
- GAPDH (Glicealdeido 3-fosfato dehidrogenase), mouse monoclonal, Santa Cruz, SC-59540.

Anticorpos Secundários

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

3.8 Análise Estatística

A análise dos dados foi feita utilizando-se o software Bioestat versão 5.0. A normalidade foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk e a comparação entre os grupos avaliados foi realizada através do teste ANOVA One Way, não sendo realizado pós-teste. Para todos os testes foi considerado significativo um valor de $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

Após o desmame os animais apresentavam a mesma massa corporal nos grupos avaliados. Ao final dos primeiros 45 dias do protocolo, o grupo D apresentou redução estatisticamente significativa na massa corporal quando comparado ao C ($p < 0,05$), devido ao consumo da dieta hipoproteica. Na fase de recuperação nutricional, o grupo D aumentou a massa corporal, entretanto, não atingiu os valores do controle ($p < 0,05$), como observado na tabela 3.

Tabela 3: Média e desvio padrão da massa corporal (MC) em gramas, dos grupos avaliados no início do protocolo, ao final do período de desnutrição (45 dias) e ao final do protocolo (90 dias).

Grupo	MC inicial	MC 45 dias	MC 90 dias
Controle (C)	39,2 ± 3,46	293,5 ± 18,59	389,7 ± 33,01
Desnutrido/ Recuperado (D)	40,5 ± 2,62	53,0 ± 7,19 *	305,1 ± 20,45 *

* difere do respectivo grupo C; $p < 0,05$

4.1 Quantificação da Área de Inflamação/Regeneração e TNF- α

Os resultados referentes à porcentagem da área de inflamação / regeneração demonstraram que aos 7 dias o processo inflamatório foi similar entre os grupos C7 e D7, entretanto com o transcorrer do processo de regeneração houve redução estatisticamente significativa nos grupos C21 quando comparado ao C7, e D21 quando comparado ao D7 ($p < 0,01$). O mesmo comportamento foi observado na citocina TNF- α (Figuras 1 e 2).

Histologicamente observou-se que o grupo D21 apresentou uma área de inflamação e regeneração maior quando comparado ao C21 ($p < 0,01$, Figura 2), entretanto o conteúdo da citocina TNF- α foi similar entre os grupos, como observado na figura 3.

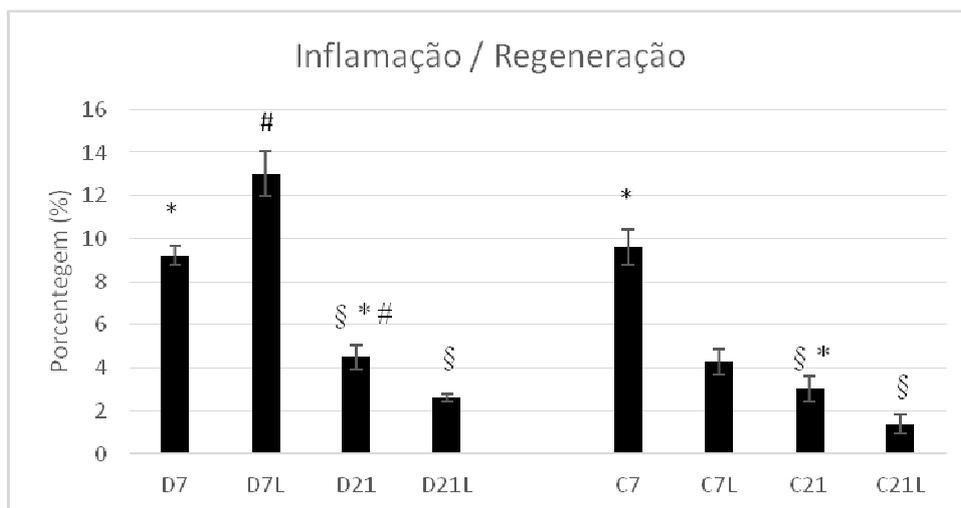


Figura 2: Média e desvio padrão da porcentagem de área de inflamação e regeneração do músculo tibial anterior lesado dos animais avaliados. C: controle; D: desnutrido / recuperado; L: grupo tratado com LLLT. § difere do respectivo grupo 7 dias; * difere do respectivo grupo L; # difere do respectivo grupo C; $p < 0,01$

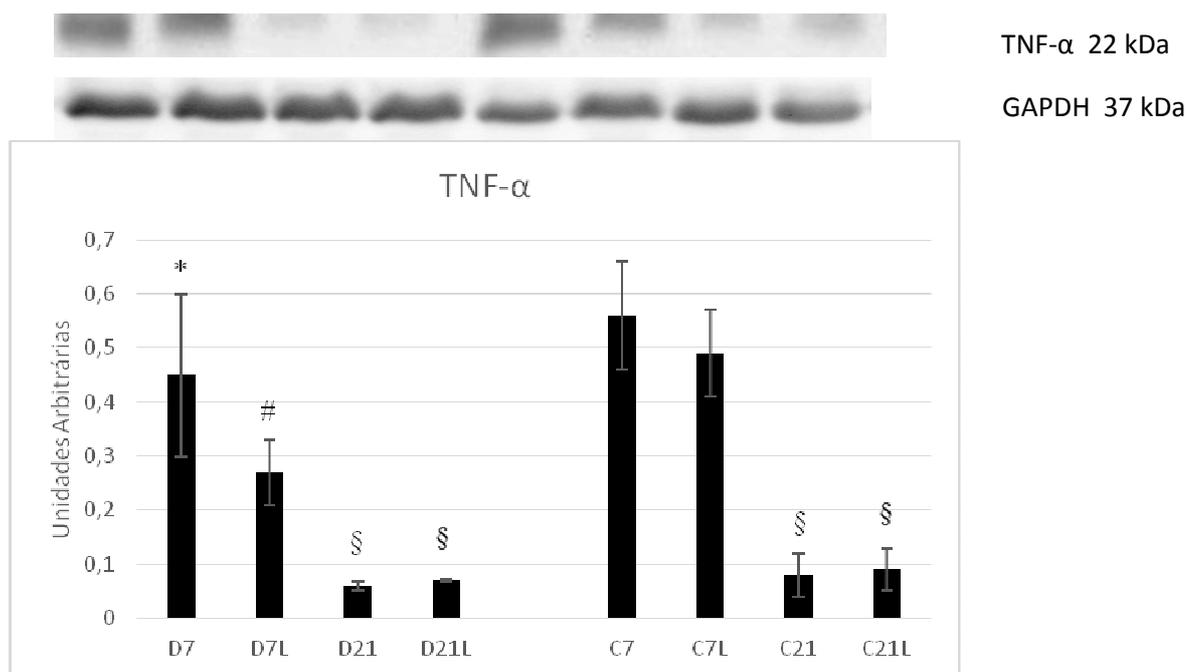


Figura 3: Média e desvio padrão do conteúdo da citocina TNF- α (em unidades arbitrárias TNF- α / GAPDH) do músculo tibial anterior lesado dos animais avaliados. C: controle; D: desnutrido / recuperado; L: grupo tratado com LLLT. § difere do respectivo grupo 7 dias; * difere do respectivo grupo L; # difere do respectivo grupo C; $p < 0,01$

Após 7 dias de tratamento com a LLLT houve redução estatisticamente significativa na área de inflamação/regeneração no grupo C7L quando

comparado ao seu controle C7 e ao grupo desnutrido D7L ($p < 0,01$). Além disso, observou-se aumento na área de inflamação/regeneração no grupo D7L quando comparado ao D7 ($p < 0,01$, Figura 2 e 8). Tais alterações histológicas não foram evidenciadas na avaliação do conteúdo da citocina TNF- α , onde houve diminuição da citocina no grupo D7L quando comparado ao C7L ($p < 0,01$, Figura 3).

Como esperado, após 21 dias da lesão houve redução da área de inflamação/regeneração e da citocina TNF- α em todos os grupos quando comparados aos respectivos controles 7 dias ($p < 0,01$, Figuras 2 e 3) e o tratamento com a LLLT apresentou diminuição no processo inflamatório nos grupos C21L e D21L quando comparados aos seus controles, C21 e D21 respectivamente ($p < 0,01$), como mostram as figuras 2 e 8, mas o tratamento com a LLLT não alterou o conteúdo da citocina TNF- α nesses grupos (Figura 3).

4.2 Quantificação da Densidade de Área de Tecido Conjuntivo (DACT) e TGF- β 1

Os dados histológicos demonstraram que aos 7 dias a porcentagem de DACT foi similar entre grupos C7 e D7, como observado também no conteúdo da citocina TGF- β 1 (figuras 4 e 5). Com o transcorrer do processo de regeneração houve redução estatisticamente significativa da DACT e de TGF- β 1 no grupo C21 quando comparado ao C7 ($p < 0,01$). Comparando os tipos de dieta, observou-se que houve redução na DACT no grupo C21 quando comparado ao D21 ($p < 0,01$), como mostrado nas figuras 4 e 8.

O tratamento com a LLLT demonstrou redução estatisticamente significativo da DACT no grupo C7L quando comparado ao grupo C7 ($p < 0,01$) e com o transcorrer da regeneração a LLLT teve efeito positivo na redução da DACT no grupo C21L quando comparado ao C7L, como também no grupo D21L quando comparado ao grupo D7L ($p < 0,01$). Nos grupos desnutridos o tratamento com a LLLT favoreceu a redução da DACT no grupo D21L quando comparado ao grupo D21 ($p < 0,01$, Figuras 4, 5 e 8).

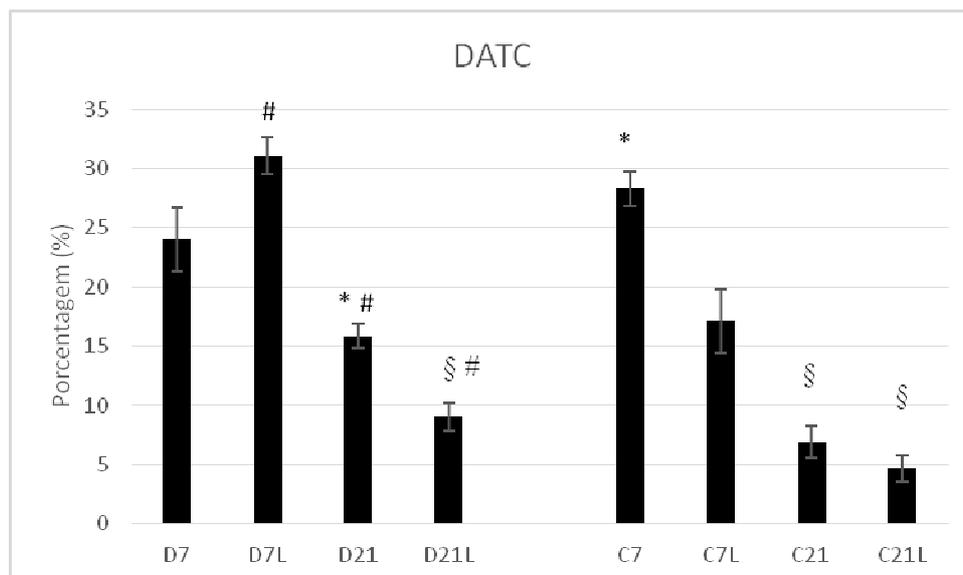


Figura 4: Média e desvio padrão da porcentagem da densidade de área de tecido conjuntivo do músculo tibial anterior lesado dos animais avaliados. C: controle; D: desnutrido / recuperado; L: grupo tratado com LLLT. § difere do respectivo grupo 7 dias; * difere do respectivo grupo L; # difere do respectivo grupo C; $p < 0,01$

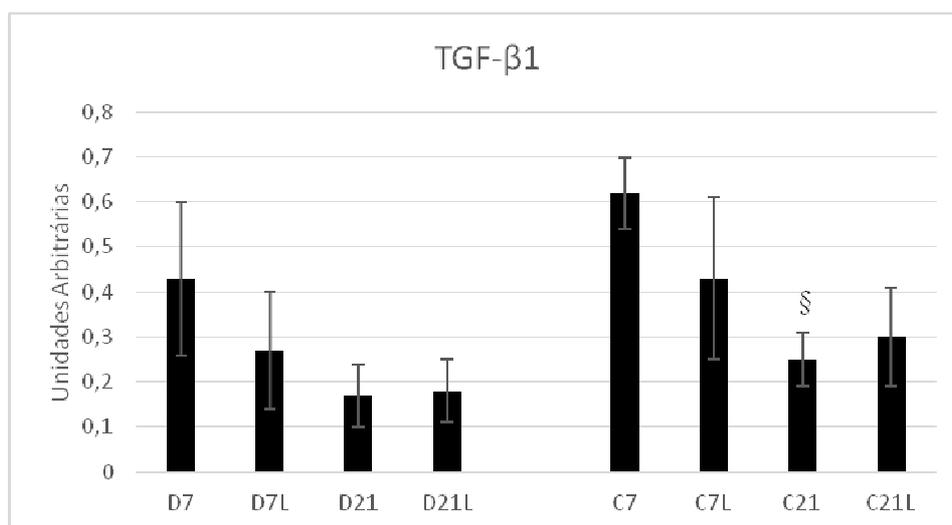


Figura 5: Média e desvio padrão do conteúdo da citocina TGF-β1 (em unidades arbitrárias TGF-β1 / GAPDH) do músculo tibial anterior lesado dos animais avaliados. C: controle; D: desnutrido / recuperado; L: grupo tratado com LLLT. § difere do respectivo grupo 7 dias; $p < 0,01$

Comparando os tipos de dietas, observou-se aumento estatisticamente significativo da DACT no grupo D7L quando comparado ao C7L ($p < 0,01$). No que se refere a citocina TGF- β 1, o tratamento com a LLLT não interferiu no seu conteúdo (Figura 5).

4.3 Quantificação da Área de Secção Transversa (AST) e m-TOR

Nas fibras musculares do tibial anterior lesado observou-se aumento estatisticamente significativo ($p < 0,01$) da AST durante o processo de regeneração muscular nos grupos controle 21 dias (C21 comparado ao C7; C21L comparado ao C7L). No grupo desnutrido tal fato ocorreu apenas nos animais tratados com a LLLT, onde o grupo D21L apresentou aumento estatisticamente significativo da AST quando comparado ao grupo D7L e D21 ($p < 0,01$; Figura 6 e 8).

O uso da LLLT favoreceu o aumento da AST das fibras musculares na fase final da regeneração em ambos os grupos, onde observou-se aumento estatisticamente significativo entre o grupo C21L quando comprado ao C21, e entre o grupo D21L quando comparado ao D21 ($p < 0,01$), entretanto observou-se que o período de desnutrição interferiu nas fibras musculares, pois houve redução estatisticamente significativa no grupo D21L quando comparado ao C21L ($p < 0,01$), como observado nas figuras 6 e 8.

Tais resultados referentes ao grupo controle foram similares no conteúdo da proteína m-TOR, evidenciando o aumento da proteína no grupo C21L quando comparado aos grupos C21, C7L e D21L ($p < 0,01$), como observado na figura 7.

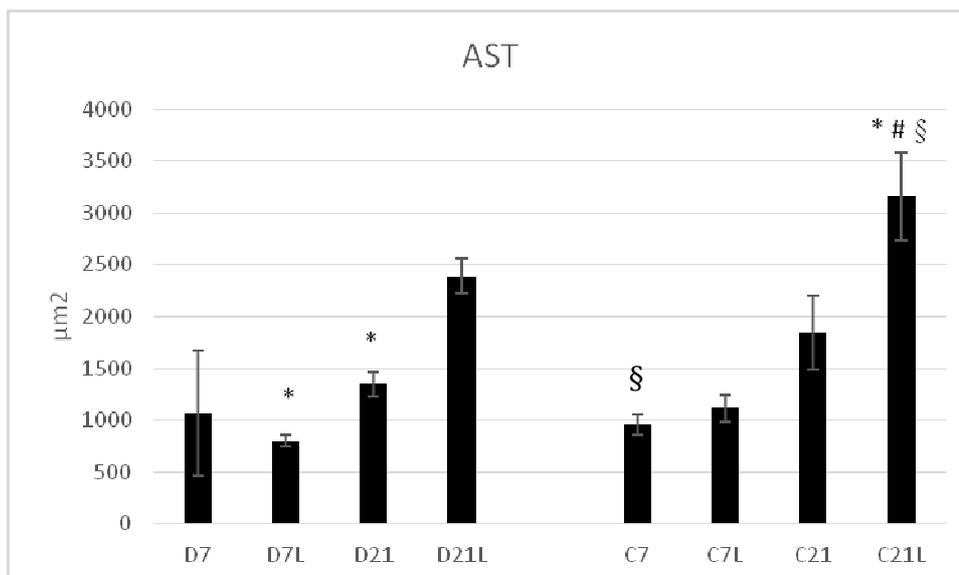


Figura 6: Média e desvio padrão área de secção transversa (AST) do músculo tibial anterior lesado dos animais avaliados. C: controle; D: desnutrido / recuperado; L: grupo tratado com LLLT.

* difere do grupo D21L; # difere do grupo C7L; § difere do grupo C21; $p < 0,01$

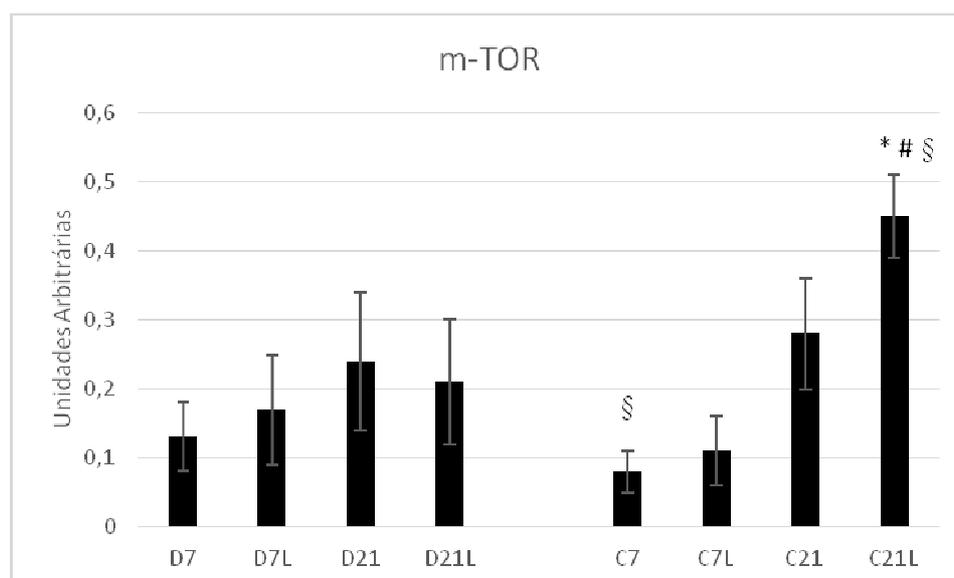
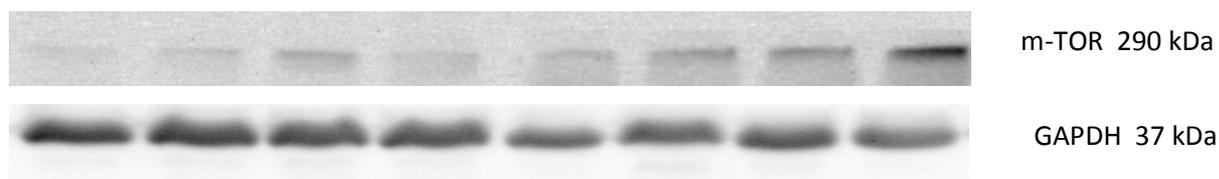


Figura 7: Média e desvio padrão do conteúdo da proteína m-TOR (em unidades arbitrárias m-TOR / GAPDH) do músculo tibial anterior lesado dos animais avaliados. C: controle; D: desnutrido / recuperado; L: grupo tratado com LLLT.

* difere do grupo D21L; # difere do grupo C7L; § difere do grupo C21; $p < 0,01$

Na figura 8 é possível observar os cortes histológicos do músculo tibial anterior lesado. Nos grupos 7 dias verifica-se grande infiltrado inflamatório e tecido conjuntivo, principalmente no grupo D7L, com a presença de pequenas fibras musculares no estágio inicial da regeneração. No grupo C7L observa-se a redução do infiltrado inflamatório e tecido conjuntivo. Nos grupos 21 dias observa-se o aumento da AST das fibras regeneradas (com núcleo centralizado) em todos os grupos, principalmente no grupo C21L.

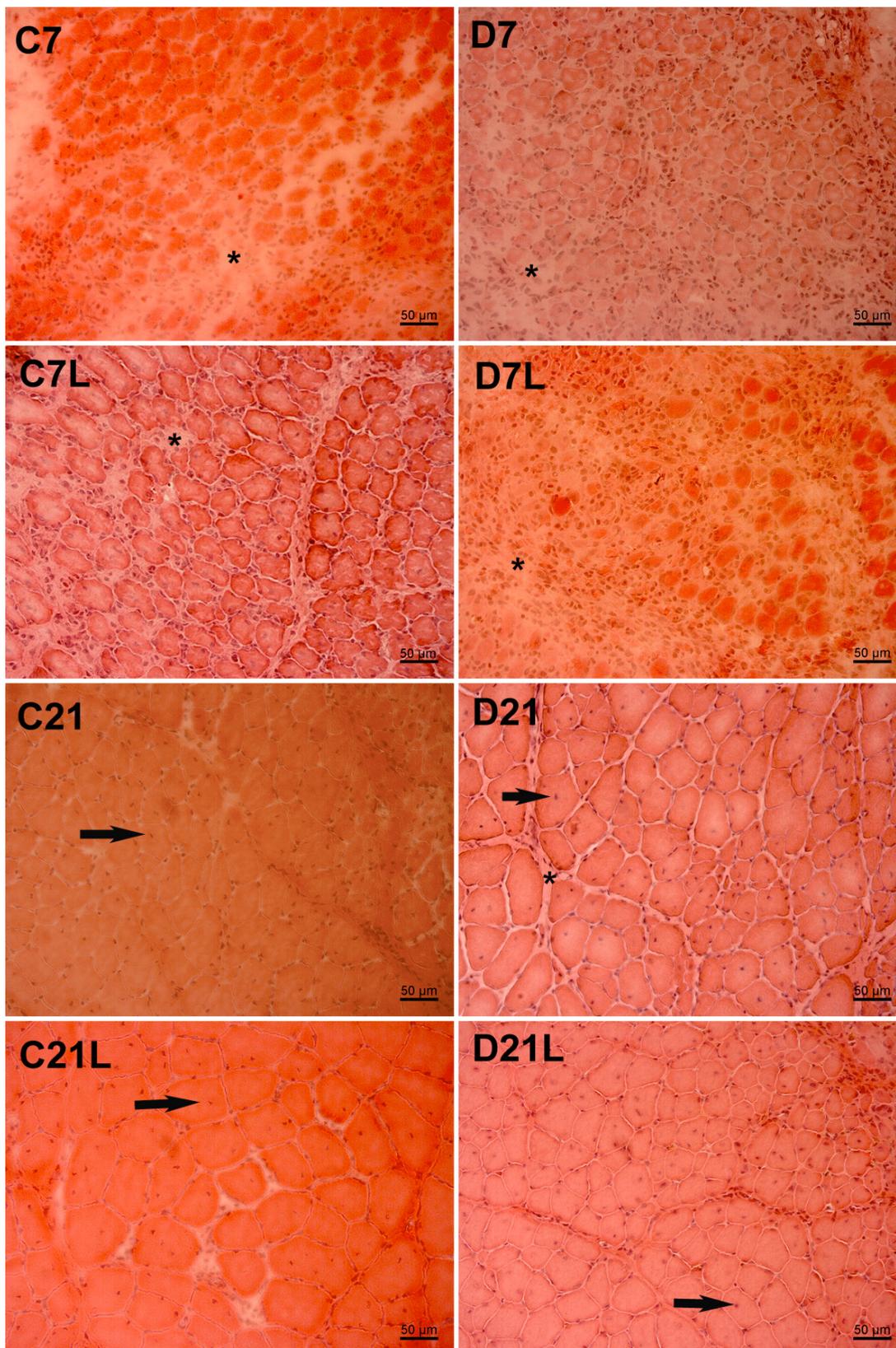


Figura 8. Cortes transversais histológicos corados com HE do músculo tibial anterior lesado dos grupos avaliados. Notar o infiltrado inflamatório e aumento do tecido conjuntivo nos grupos 7 dias. Aumento da AST nas fibras com núcleo centralizado nos grupos 21 dias. * infiltrado inflamatório e tecido conjuntivo;

→ fibra muscular regenerada com núcleo centralizado. Barra 50 µm.

5. DISCUSSÃO

No presente estudo, o protocolo de desnutrição pós-desmame utilizado foi eficaz, pois comprometeu o desenvolvimento do animal, evidenciado pela redução da massa corporal do grupo D quando comparado ao grupo C. Estes resultados estão de acordo com Escriva et al. (1991), que afirmam que a redução da massa corporal de ratos jovens submetidos a uma dieta hipoproteica por 4 semanas é uma consequência de alterações funcionais da insulina nos tecidos.

Ihemelandu (1985) confirma esses achados, afirmando que a desnutrição afeta de forma significativa o crescimento e a diferenciação das células, e que quanto mais precoce ocorrer, maiores serão os comprometimentos gerados aos órgãos e tecidos. O autor afirma ainda que danos ao sistema muscular, como a redução no aporte de proteínas por desnutrição são um fator fundamental para a diminuição do peso corporal na fase adulta.

O estudo de Alves et al. (2014) observou que tanto o peso corporal quanto o peso do músculo tibial anterior dos animais desnutridos com dieta de 8% de proteína foram estatisticamente menores do que os valores encontrados nos grupos controle.

Durante o período de recuperação nutricional, o grupo D aumentou gradativamente a massa corporal, entretanto, ao final do protocolo, não conseguiu alcançar os valores do grupo controle, se mantendo estatisticamente inferior a ele, o que difere do estudo de Pertille et al. (2016) que utilizou o mesmo protocolo de desnutrição (45 dias dieta 6% de caseína) e recuperação (45 dias dieta 14% caseína), observando que o tempo de recuperação foi suficiente para que o grupo desnutrido / recuperado alcançasse os valores da massa corporal do controle. Tal fato pode estar relacionado às características metabólicas de cada ninhada.

Na fase aguda do processo de regeneração muscular após a criolesão (7 dias), observou-se que os grupos C7 e D7 apresentaram o mesmo comportamento em relação ao processo inflamatório e ao conteúdo da citocina TNF- α no músculo, entretanto na fase crônica da regeneração, os dados histológicos evidenciam a presença de uma área de inflamação maior no grupo

D21, sugerindo um atraso na regeneração dos animais desnutridos e recuperados. O aumento da área de inflamação e regeneração também foi observado por Pertille et al. (2016) aos 14 dias após criolesão.

Os resultados da área de inflamação/regeneração e do conteúdo de TNF- α destacam que a LLLT favoreceu a redução da área de inflamação, entretanto não ficou evidenciada a interferência do tipo de dieta neste contexto.

Renno et al. (2014), avaliaram a regeneração muscular de ratos submetidos à criolesão através do uso de laser AsGaAl nos parâmetros de 808 nm, 50 mW e densidades de energia de 10 J/cm² e 50 J/cm². Os autores observaram que os animais irradiados com ambas as densidades de energia apresentaram áreas com menor infiltrado celular e áreas com menores zonas de lesão quando comparados ao grupo controle após 13 dias de lesão, sendo a densidade de energia de 50 J/cm² mais benéfica para a recuperação da lesão.

O TNF- α é uma das principais citocinas relacionadas ao processo inflamatório e imune, sendo secretado por macrófagos, linfócitos e monócitos. Sua função é promover a resposta imune e inflamatória através do recrutamento e ativação de neutrófilos e monócitos para o local da infecção (VITALE; RIBEIRO, 2007).

Zhevago e Samoilova (2006) concluíram em seus estudos com humanos que a diminuição do teor plasmático de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , é o principal mecanismo responsável pelos efeitos anti-inflamatórios da LLLT.

Aimbire et al. (2006) observaram em ratos com lesão pulmonar que a LLLT (AsGaAl, com potência de 1.0, 2.5 e 5 mW e comprimento de onda de 650nm) reduziu de forma significativa os níveis séricos de TNF- α nos animais que receberam a irradiação quando comparados ao grupo controle, sendo o efeito dose dependente.

No presente estudo foi avaliado o conteúdo muscular do TNF- α , o que não representa o conteúdo plasmático da citocina avaliado na maioria dos trabalhos, o que pode explicar a divergências dos resultados.

Em relação a quantificação do tecido conjuntivo, na fase inicial da regeneração, a LLLT favoreceu a redução da DACT apenas no grupo C7L. O conteúdo da citocina TGF- β 1 foi similar entre todos os grupos 7 dias, como também observado no estudo de Pertille et al. (2016), que utilizou o mesmo

protocolo de desnutrição e recuperação, não encontrando diferenças entre os tipos de dieta.

O efeito positivo da LLLT ficou evidente no grupo D21L, com a redução da DACT. Entretanto, o conteúdo da citocina TGF- β 1 apresentou redução apenas no grupo C21.

O TGF- β 1 é uma citocina com ampla função sobre vários tipos de células, regulando o crescimento celular, diferenciação, produção de matriz extracelular e apoptose (HELDIN et al., 1997).

A LLLT induz a atividade dos fibroblastos, através do estímulo da produção do fator de crescimento fibroblástico (FGF), que tem capacidade para induzir a proliferação e diferenciação fibroblástica, além de afetar as células imunes que secretam citocinas e outros fatores regulatórios do crescimento para fibroblastos. Além disso, a maturação e a locomoção dos fibroblastos pela matriz celular também são influenciadas pelo laser (WALSH, 1997).

Alguns estudos evidenciam a eficácia do laser no reparo tecidual de animais desnutridos, fato observado também no presente estudo, aos 21 dias de irradiação. Pinheiro et al. (2004) avaliaram a cicatrização de feridas cutâneas em animais nutrido e desnutridos, nos parâmetros de 635 nm e 40 mW, e doses de 20 J/cm² e 40 J/cm², observando que a irradiação foi mais efetiva nos animais desnutridos, além disso, os autores encontraram uma maior quantidade de fibras colágenas depositadas nesse grupo, e maior grau de maturação das mesmas, no período de 7 dias.

Pinheiro et al. (2009) utilizaram o mesmo protocolo de tratamento para comparação do processo de cicatrização de animais nutridos e desnutridos, porém com comprimentos de onda diferentes, sendo utilizados o laser de 780 nm, na faixa do infravermelho e o laser vermelho de 635 nm. Os autores observaram que ambos os comprimentos de onda foram mais eficientes nos animais desnutridos, porém nos grupos que receberam irradiação com o laser vermelho a 20 J/cm² os efeitos benéficos foram maiores. O laser na faixa do infravermelho apresentou maiores benefícios quando utilizado o comprimento de onda de 40 J/cm².

A AST e o conteúdo da proteína m-TOR foram similares entre os todos durante o processo inicial de regeneração, entretanto após 21 dias da lesão a

interferência da dieta hipoproteica ficou evidente nos grupos desnutridos, pois apenas o grupo C21 apresentou maior AST e aumento no conteúdo da m-TOR. A LLLT favoreceu o aumento da síntese proteica (AST e conteúdo de m-TOR) no grupo C21L.

A m-TOR é responsável por regular uma série de processos que contribuem para o crescimento celular, incluindo a iniciação da tradução do RNAm, síntese de ribossomos, expressão do metabolismo de genes, autofagia e reorganização citoesquelética (KIM et al., 2002).

Ihemelandu (1985) afirma que ocorre uma perda de fibras musculares em animais desnutridos, e que as proteínas são necessárias para a síntese de actina e miosina após a fusão dos mioblastos.

O efeito da LLLT na massa muscular também foi observado em outros trabalhos. Oliveira et al. (1999) avaliaram o efeito do laser AsGa na regeneração do músculo tibial em ratos submetidos à lesão por injeção intramuscular e tratados durante cinco dias pela LLLT, com 31 e 10 J/cm², e concluíram que o grupo que recebeu 10 J/cm² apresentou aumento da massa muscular.

A aplicação do laser de AsGa também foi avaliada por Iyomasa et al. (2009), que aplicaram doses de 5 J/cm² e 10 J/cm², e observaram aumento na atividade mitocondrial, na ação de fibroblastos e de macrófagos e na angiogênese do músculo tibial anterior de ratos submetidos à contusão.

Alves et al. (2014) observaram que a LLLT promove efeitos benéficos na reparação de lesões, iniciando-se na fase aguda. No presente estudo concluímos que esse efeito positivo ficou mais evidente nos animais que não passaram pelo processo de desnutrição, sugerindo que mesmo após a recuperação nutricional, o processo de regeneração muscular fica deficitário.

No presente estudo observou-se nos animais controle (com dieta normoproteica) a resposta gradativa do processo regeneração, com redução do TNF- α muscular e TGF- β 1 e aumento da proteína m-TOR, sendo favorecido pela irradiação da LLLT. Os resultados dos grupos desnutridos sugerem que o processo de regeneração acontece de forma mais lenta, com acúmulo de tecido conjuntivo e restrição na recuperação da AST das fibras musculares regeneradas, que são minimizadas com a irradiação da LLLT.

Há uma variedade de parâmetros e tipos de laser utilizados para recuperação de lesão muscular, como também há diferentes protocolos de desnutrição (intra-uterina, durante a amamentação e pós-desmame) que dificultam a comparação dos resultados do presente estudo com a literatura.

A hipótese do presente estudo foi confirmada parcialmente, pois a LLLT favoreceu a recuperação do músculo tibial anterior após 21 dias da criolesão. Entretanto, observa-se que a resposta foi menor quando comparado ao grupo nutrido.

Novos estudos com a dosagem sérica de TNF- α e interleucinas, como também a aplicação de outras intervenções suplementos nutricionais ou exercício físico previamente a lesão podem ser realizados para o melhor entendimento do efeito da desnutrição e recuperação nutricional no músculo esquelético.

Cabe destacar também o importante fato de as avaliações terem acontecido até os 21 dias após a criolesão no presente estudo, já que grande parte da literatura apresenta dados apenas durante os 13 primeiros dias após a lesão.

6. CONCLUSÃO

Com os resultados do presente estudo pode-se concluir que a terapia com laser de baixa intensidade (830 nm) favoreceu a regeneração muscular na fase tardia (21 dias) em modelo experimental de desnutrição proteica pós-natal com posterior recuperação nutricional.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIMBIRE, F. et al. Low-level laser therapy induces dose-dependent reduction of TNFalpha levels in acute inflammation. **Photomed Laser Surg.** V. 24, n. 1, p. 33-37, 2006.

ALVES, A.N. et al. Effects of low-level laser therapy on skeletal muscle repair – a systematic review. **Am. J. Phys. Med. Rehabil.** V. 92, n. 12, p. 1073-1085, 2014.

ARCHIBALD, J. **Traumatologia canina.** Zaragoza: Acribia, 1976

BATISTA, F.M., RISSIN, A. A transição nutricional no Brasil: tendências regionais e temporais. **Cad Saúde Pública.** V.19 (Suppl 1), p.S181-91, 2003.

BERMUDEZ, O.I., TUCKER, K.L., Trends in dietary patterns of Latin American populations. **Cad Saúde Pública.** v.19 (Suppl 1), p.S87-99, 2003.

BUTTERFIELD, T.A., BEST, T.M., MERRICK, M.A. The dual roles of neutrophils and macrophages in inflammation: A critical balance between tissue damage and repair. **J Athl Train.** v 41, p. 457-465, 2006.

CAMELO, F.P. Avaliação clínica do efeito da irradiação pós-operatória do laser de baixa intensidade na cicatrização de gengivoplastias em humanos **[Dissertação]. Natal: Universidade Federal do Rio Grande do Norte; 2007**

CAPITANIO, M. et al. Two independent mechanical events in the interaction cycle of skeletal muscle myosin with actin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 103, n. 1, p. 87-92, 2006.

CORNELISON, D.D, et al. MyoD(-/-) satellite cells in single-fiber culture are differentiation defective and MRF4 deficient. **Dev Biol.** v.224, n.2, p.122-37, 2000.

COLLS, J. **La terapia laser, hoy.** Centro Documentación Laser, Barcelona, p. 30-70, 1986.

CRESSONI, M.D., et al. The effects of a 785-nm AlGaInP laser on the regeneration of rat anterior tibialis muscle after surgically-induced injury. **Photomed Laser Surg.** v. 26, n. 5, p. 461–466, 2008.

CREUZET, S., et al. MyoD, myogenin and desmin-nls-lacZ transgene emphasize the distinct patterns of satellite cell activation in growth and regeneration. **Exp.Cell Res.** v.243, p.241-253, 1998.

DOURADO, D.M., et al. Effects of the Ga–As laser irradiation on myonecrosis caused by Bothrops moojenisnake venom. **Lasers Surg Med.** v. 33, n.5, p. 352–357, 2003.

DORTBUDAK, O. Biostimulation of bone marrow cells with a diode soft laser. **Clin. Oral Implants Res.** v. 11, p. 540–545, 2000.

ESCRIVA, F., et al. Increased insulin action in the rat after protein malnutrition early in life. **Diabetologia.** v.34, n.8, p.559-564, 1991.

FERRARI, R.J., et al. Processo de regeneração na lesão muscular: uma revisão. **Rev.Fisiot Mov.** v.18, n. 2, p.63-71, 2005.

FISHER, B.D.; RATHGABER, M. Denervation does not change the ratio of collagen I and collagen III mRNA in the extracellular matrix of muscle. **J Phys Ther Sci.** v. 18, n. 1, p. 57-66, 2006.

FOCK, R.A., et al. Protein-energy malnutrition decreases the expression of TLR- 4/MD-2 and CD14 receptors in peritoneal macrophages and reduces the synthesis of TNF-alpha in response to lipopolysaccharide (LPS) in mice. **Cytokine.** v.40, n.2, p.105-14, 2007.

FUCHTABUER, E.M.; WESTPHAL, H. MyoD and Myogenin are coexpressed in regenerating skeletal muscle of the mouse. **Dev. Dynam.** v.193, p.34- 39, 1992.

FUKUDA, T.Y. MALFATTI, C.A. Análise da dose do laser de baixa potência em equipamentos nacionais. **Rev. Bras. Fisioter.** v. 12, n. 1, p. 70-74, 2008.

HASHMI, J.T., et al. Effect of pulsing in low-level light therapy. **Lasers Surg. Med.** v. 42, n. 6, p. 450–466, 2010.

HELDIN, C.H.; MIYAZONO, K.; DIJKE, P. TGF- β signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. **Nature.** v.390, p.465-71, 1997.

HUARD, J.; LI, Y.; FU, F.H. Muscle injuries and repair: current trends in research. **J Bone Joint Surg Am.** v. 84, p. 822–32, 2002.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009: antropometria e estado nutricional de crianças adolescentes e adultos no Brasil. Rio de Janeiro, 2010.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Insegurança Alimentar Diminui, mas ainda atinge 30,2% dos domicílios brasileiros. 2010. Disponível em: <http://saladeimprensa.ibge.gov.br/noticias?id=1&idnoticia=1763&view=noticia>. Acesso em: 10/03/2016.

IHEMELANDU, E.C. Fibre number and sizes of mouse soleus muscle in early postnatal protein malnutrition. **Acta anat.** v. 121, p. 89-93, 1985.

JARVINEN, T.A., et al. Muscle strain injuries. **Curr Opin Rheumatol.** v.12, n.2, p.155-61, 2005

JÄRVINEN, T.A., et al. Muscle Injuries: Biology and Treatment. **Am J Sports Med.** v. 33, n. 5, p. 745-764, 2005.

KALIMO, H., RANTANEN, J., JÄRVINEN, M. Muscle injuries in sports. Baillieres **Clin Orthop**. v. 2 p. 1-24, 1997.

KIM, D.H. et al. mTor interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. **Cell**. v. 110, p. 163-175, 2002.

LIEBER, R.L. **Skeletal muscle structure, function & plasticity: The physiological basis of rehabilitation**. 2 ed. Baltimore-USA, Williams & Wilkins, 2002.

LOPES-MARTINS R.A., et al. Effect of low-level laser (Ga-Al-As 655 nm) on skeletal muscle fatigue induced by electrical stimulation in rats. **J Appl Physiol**. v. 101, p. 283 – 88, 2006.

MANN, C.J., et al. Review: Aberrant repair and fibrosis development in skeletal muscle. **Skelet Muscle**. V. 101, n. 1, p. 1-21, 2011.

MANTINEO, M. PINHEIRO, J.P.MORGADO, A.M. Low-level laser therapy on skeletal muscle inflammation: evaluation of irradiation parameters. **J Biomed Opt**. v. 19, n. 9, p. 1-12, 2014.

MARTORELL R, et al. Long-term consequences of growth retardation during early childhood. In: Hernandez M, Argente J, editors. Human growth: basic and clinical aspects. Amsterdam: Elsevier; 1992. p. 143-9.

MARQUES, M.J.; et al. Disodium cromoglycate protects dystrophin-deficient muscle fibers from leakiness. **Muscle Nerve**. v. 37, n.1, p.61-7, 2008.

MEIRELES, G.C.S. , et al. A efetividade da fototerapia laser no reparo tecidual em portadores de desordem funcional sistêmica. **Rev. Eletr. Fainor**. v. 7, n. 2, p. 71-84, 2014.

MESQUITA-FERRARI, R.A., et al. Effects of low-level laser therapy on expression of TNF-alpha and TGF-beta in skeletal muscle during the repair process. **Lasers Med Sci**. v. 26, n. 3, p. 335–340, 2011.

MICHAEL K. Relationship of Skeletal Muscle Atrophy to Functional Status: A Systematic Research Review. **Biol. Res. Nurs**. v. 2, n.2, p. 118-131, 2000.

MIYABARA, E.H., et al. Overexpression of inducible 70 kDa heat shock protein in mouse attenuates skeletal muscle damage induced by cryolesioning. **Am J Physiol Cell Physiol**, v.290, n.4, p. C1128-38, 2006.

MONTE, C.M.G. Atendimento à criança desnutrida em ambulatório e comunidade. Temas de Nutrição em Pediatria, [S.I.]: Departamento Científico de Nutrição da Sociedade Brasileira de Pediatria, v. 2, p. 13-23, 2002. Disponível em: http://www.sbp.com.br/img/departamentos/temas_nutricao.pdf

MONTEIRO, C.A. A dimensão da pobreza, da desnutrição e da fome no Brasil. **Estud. Av.** v. 17, n. 48, p. 7-20, Aug. 2003 .

MULLER, O. KRAWINKEL, M. Malnutrition and health in developing countries. **CMAJ.** v. 173, n. 3, p. 279-286, 2005.

NASCIMENTO O.J. et al. Considerações sobre o músculo estriado na desnutrição protéica. **Arq Neuropsiquiatr.** v. 48, p. 395-402, 1990.

NEIVA, C.M.; GUERINO, M.R.; MELLO, M.A.R. Análise dos efeitos da desnutrição protéico-calórica sobre as respostas ao exercício agudo (single section) parâmetros metabólicos. **Motriz**, v.1,n.1, p.32-43, 1999

NUNES, M.L. et al. Effects of early malnutrition and nutrition rehabilitation in rats. **J. Pediatr.** v.77, p.39-44, 2002.

OLIVEIRA NM, PARIZZOTTO NA, SALVINI TF. GaAs (904-nm) laser radiation does not affect muscle regeneration in mouse skeletal muscle. **Lasers Surg Med.** v. 25, n. 1, p. 13-21, 1999.

OMS – Organização Mundial da Saúde. Global database on child growth and malnutrition. Geneva: WHO; 1997.

PERTILLE, A.; MACEDO, A.B.; OLIVEIRA, C.P. Evaluation of muscle regeneration in aged animals after treatment with low-level laser therapy. **Rev Bras Fisioter.** v. 16, n.6, p.495-501, 2012.

PERTILLE, A. et al. Evaluation of skeletal muscle regeneration in experimental model after malnutrition. **Braz. J. Biol.** V. 77, n. 1, p. 83-91, 2016

PELLETIER, D.L. The relationship between child anthropometry and mortality in developing countries: implications for policy and future research. **Ithaca (NY): Cornell University;** V. 124, 10 suppl, 2047-2081, 1991.

PELLETIER D, FRONGILLO Jr. A, HABICHT, J.P. Epidemiologic evidence for a potentiating effect of malnutrition on child mortality. **Am J Public Health.** v.83, p.1130-3, 1993.

PINHEIRO, A.L.B. et al. Phototherapy improves healing of cutaneous wounds in nourished and undernourished wistar rats. **Photomed. And Laser Surg. Braz. Dent. J.** v. 15 (Special issue): SI-21-SI-28, 2004.

PINHEIRO, A.L.B. et al. Biomodulative effects of visible and IR laser light on the healing of cutaneous wounds of nourished and undernourished wistar rats. **Photomed. and Laser Surg.** v. 27, n. 6, p. 947-957, 2009.

PIVA, J.A.C., et al. Effect of low-level laser therapy on the initial stages of tissue repair: basic principles. **An. Bras. Dermatol.**, v. 86, n. 5, p. 947-954, 2011.

PUGLIESE L.S., et al. The influence of low-level laser therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers. **Pesqui Odontol Bras.** v. 17, n. 4, p.307-313, 2003.

PIVA, J.A.C., et al. Ação da terapia com laser de baixa potência nas fases iniciais do reparo tecidual: princípios básicos. **An. Bras. Dermatol.** v. 86, n. 5, p. 947-954, 2011.

RAMOS,L., Jet al. Infrared (810 nm) low-level laser therapy in experimental model of strain-induced skeletal muscle injury in rats: effects on functional outcomes.Photochem. **Photobiol.** v. 88, n. 1, p. 154–160, 2012.

RANTANEN, J., et al. Satellite cell proliferation and the expression of myogenin and desmin in regenerating skeletal muscle: evidence for two different populations of satellite cells. **Lab Invest.** v.72, n.3, p.341-7, 1995.

REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY Jr., G.C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J Nutr.** v.123, n.11, p.1939-51, 1993.

RENNO, A.C., et al. Comparative effects of low-intensity pulsed ultrasound and low-level laser therapy on injured skeletal muscle. **Photomed Laser Surg.** v. 29, n. 1, p. 5–10, 2011.

RENNO, A.C., et al. The effects of low level laser therapy on injured skeletal muscle. **Braz. Arch. Biol. Technol.** v. 57, n. 1, p. 48–54, 2014.

ROCHA, R. et al. Desnutrição protéico-calórica e crescimento corporal. Influência do exercício na recuperação nutricional de ratos. **Alim. Nutr.** v. 8, p. 7-16, 1997.

SAYEGH, M., LIMA, M.C. Os distúrbios nutricionais e seus efeitos sobre o desenvolvimento motor. **Pleiade.** v. 2, n. 1, p. 115-125, jan./jun. 2008.

SHIN, E.H., CATERSON, E.J., JACKSON, W.M., NESTI, L.J. Quality of healing: defining, quantifying, and enhancing skeletal muscle healing. **Wound Repair Regen.** v. 22, p. 18–24, 2014.

SILVEIRA, I. S.; RAISER, A. G.; POLYDORO, A. S. Efeitos da dieta protéica na cicatrização de fraturas distais de fêmur imobilizadas com pinos intramedulares em cão. **Acta Cirurg. Bras.** v. 12, n. 3, p. 178-81, 1997

SCHOFIELD, C., ASHWORTH, A. Why have mortality rates for severe malnutrition remained so high? **Bulletin of the World Health Organization.** v. 74. N.2. p. 223-229, 1996.

STEIN, A., BENAYAHU, D., MALTZ, L., ORON, U. Lowlevel laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. Photomed. **Laser Surg.** v. 23, p. 161–166, 2005.

TIDBALL, J.G., VILLALTA, S.A. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** v. 298 p. 1173–1187, 2010.

TOMKINS, A., WATSON, F. Malnutrition and infection: a review. Geneva: Administrative Committee on Coordinator/Subcommittee on Nutrition. 1989. **(ACC/ SCN State-of-Art Series, Nutrition Policy Discussion, Paper 5).**

TOSCANO, A.E., AMORIM, M.A. et al. Do malnutrition and fluoxetine neonatal treatment program alterations in heart morphology. **Life Sci.** v.82, n.21-22, May 23, p.1131-6. 2008.

VITALE, R.F., RIBEIRO, F.A. The role of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in bone resorption present in middle ear cholesteatoma. **Braz. J. Otorhinolaryngol.** v. 73, n. 1, p. 117-121, 2007.

WALSH, L.J. The current status of low level laser therapy in dentistry. Part 1. Soft tissue applications. **Austr Dental J.** v.42, p.247-25, 19974.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global burden of protein-energy malnutrition in the year 2000. 2000. Disponível em: http://www.who.int/healthinfo/statistics/bod_malnutrition.pdf. Acesso em: 12/03/2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). The world health report 1995: bridging the gaps. 1996. Disponível em: http://www.who.int/whr/1995/en/whr95_en.pdf?ua=1. Acesso em: 12/03/2016.

YABLONKA-REUVENI, Z.; RUDNICKI, M.A.; RIVERA, A.J.; PRIMIG, M.; ANDERSON, J.E.; NATANSON, P. The transition from proliferation to differentiation is delayed in satellite cells from mice lacking MyoD. **Dev Biol.** v.210, n.2, p. 440-455, 1999.

YAMAGUCHI, A, et al. The effect of nutrition on the size and proportion of muscle fibre types during growth. **J Anat.** v.182, n.1, p.29–36, 1993.

YOMASA DM, GARAVELO I, IYOMASA MM, WATANABE IS, ISSA JP. Ultrastructural analysis of the low level laser therapy effects on the lesioned anterior tibial muscle in the gerbil. **Micron.** v. 40, n.4, p. 413-418, 2009.

ZHEVAGO, N.A. SAMOILOVA, K.A. Pro- and Anti-inflammatory Cytokine Content in Human Peripheral Blood after Its Transcutaneous (*in Vivo*) and Direct (*in Vitro*) Irradiation with Polychromatic Visible and Infrared Light. **Photomed Laser Surg.** v. 24, n. 2, p. 129-139, 2006.

ANEXO I

Universidade Metodista de Piracicaba
Comissão de Ética no Uso de Animais



Piracicaba, 18 de maio de 2016

Para: Profa. Adriana Pertille
De: Comissão de Ética no Uso de Animais
Ref.: Aprovação do protocolo nº 03/2016

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 nº 03/2016 intitulada "*Efeito do laser de baixa intensidade na regeneração muscular em modelo experimental desnutrido/recuperado*" analisada por esta comissão.

Atenciosamente,

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