

UNIVERSIDADE METODISTA DE PIRACICABA

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

Efeito da aplicação da laserterapia em comparação com a laserpuntura no
tratamento da lesão muscular em tibial anterior de ratos Wistar

Maria Cecília Ribeiro Bruning

2020

TESE DE DOUTORADO
MARIA CECÍLIA RIBEIRO BRUNING

**EFEITO DA APLICAÇÃO DA LASERTERAPIA
EM COMPARAÇÃO COM A LASERPUNTURA
NO TRATAMENTO DA LESÃO MUSCULAR EM
TIBIAL ANTERIOR DE RATOS WISTAR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências do Movimento Humano da Universidade Metodista de Piracicaba, para obtenção do título de Doutor em Ciências do Movimento Humano

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Pertille

PIRACICABA

2020

Ficha Catalográfica

Ficha Catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da UNIMEP

Bibliotecária: Joyce Rodrigues de Freitas - CRB-8/10115.

B896e	<p>Bruning, Maria Cecília Ribeiro</p> <p>Efeito da aplicação da laserterapia em comparação com a laserpuntura no tratamento da lesão muscular em tibial anterior de ratos Wistar/ Maria Cecília Ribeiro Bruning. – 2020.</p> <p>65 f. : il. ; 30 cm</p> <p>Orientadora: Profa. Dra. Adriana Pertille.</p> <p>Tese (Doutorado) – Universidade Metodista de Piracicaba, Ciências do Movimento Humano, Piracicaba, 2020.</p> <p>1. Terapia a laser de baixa intensidade. 2. músculo esquelético. 3. Regeneração. I. Bruning, Maria Cecília Ribeiro. II. Título.</p> <p>CDD – 615.83</p>
-------	--

AGRADECIMENTOS

Agradecer não é algo simples, pois podemos não ser justos com todos aqueles que estiveram juntos na caminhada que se iniciou há quatro anos.

O primeiro agradecimento é a Deus, sem ele esta jornada não seria possível, esta força nos conduz pelo caminho, nos faz optar por escolhas certas sempre nos encaminhando para nossa missão.

Agradeço a minha família, alicerce mais forte de minha vida, sempre me permitindo correr atrás de meus sonhos, compreendendo os vários momentos de ausência, em especial meus filhos e marido que sempre me incentivaram com palavras de entusiasmo e com a compreensão, me apoiando todas as vezes que imaginava em desistir. Essa conquista vem da importância que fazem em minha vida.

Aos professores da Unioeste, Gladson (que foi meu professor na graduação e atuou como co-orientador neste trabalho), professora Lucinéia que me auxiliou nas análises histológicas, as acadêmicas Alana, Ana Luiza, Camila, Jéssica, Juliana que auxiliaram nas avaliações e nos cuidados dos animais da pesquisa.

A Unimep por receber-me como aluna do doutorado me acolhendo através de funcionários, docentes, alunos de mestrado e doutorado todas as vezes que estava distante de meu lar.

A minha orientadora professora Doutora Adriana Pertille que me apoiou nesse projeto e que em muitos momentos quando pensava em desistir foi meu esteio para continuar, a cada análise, a cada parte da elaboração do trabalho final sempre esteve presente me norteando para o melhor caminho, pelos ensinamentos passados.

A Capes, o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

RESUMO

Introdução: As lesões musculares são comuns durante a prática esportiva ou de atividade física e pesquisas na área de fisioterapia visam esclarecer o processo de regeneração do músculo esquelético após a aplicação de recursos terapêuticos. A laserterapia de baixa intensidade de forma convencional ou laserpuntura tem se mostrado eficaz na regeneração muscular, sendo importante considerar o tipo de *laser*, os parâmetros de radiação, o período avaliado e o tempo de aplicação.

Objetivo: O objetivo do presente estudo foi avaliar o processo de regeneração muscular em ratos tratados com *laser* convencional ou laserpuntura.

Materiais e métodos: Foram utilizados 40 ratos Wistar, com dois meses de idade, randomizados em quatro grupos (n=10 cada): controle (C), lesão sem tratamento (L), lesão tratado com laserterapia convencional (LLLT) e lesão tratado com laserpuntura (LP). A criolesão foi realizada no ventre do músculo tibial anterior direito e após 24 horas os grupos LLLT e LP receberam 10 sessões de laser de baixa intensidade de diodo AsGa na forma contínua, com comprimento de onda de 830 nm, potência de 30 mW. Os animais foram submetidos às aplicações por meio da técnica pontual, em dois pontos sobre o ventre muscular, no grupo LLLT, e em dois pontos de acupuntura E36 e BP6 no grupo LP, durante 30 segundos em cada ponto, com 2 J/cm² de densidade de energia e uma energia total de 1,8 J. Para as análises funcionais de limiar de retirada e força de preensão foram realizadas três avaliações, sendo antes da lesão (AV1), 24 horas após a lesão (AV2) e ao final do tratamento (AV3). No 13º pós lesão o músculo foi retirado para análise da área de secção transversa e densidade de tecido conjuntivo, além da análise do conteúdo das proteínas relacionadas à regeneração muscular como miogenina, MyoD, m-TOR phospho, Murf-1 e TGF-β1. Utilizou-se a análise de variância de um fator (ANOVA – *One-way*) seguido do teste *post hoc* de Bonferroni para determinar a diferença entre condições experimentais. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$. A tendência dos dados foi interpretada usando a fórmula de Cohen para *effect size*.

Resultados: Os grupos C e LP mostraram conteúdo similar para as proteínas MyoD, miogenina e citocina TGFβ1, indicando uma melhor resposta fisiológica no grupo laserpuntura, porém isto não se comprovou nas análises funcionais e morfológicas onde não houve diferença significativa.

Conclusão: O laser de 830nm, 30mW e energia total de 1,8J em 10 sessões não foi capaz de acelerar o processo de regeneração pós criolesão em nenhuma das técnicas.

Palavras-chave: terapia a laser de baixa intensidade, músculo esquelético, regeneração, pontos de acupuntura.

ABSTRACT

Introduction: Muscle injuries are common during the practice of sports or physical activity and some researches in the area of physiotherapy aim to clarify the process of regeneration of skeletal muscle after the application of therapeutic resources. Low-intensity laser therapy, in the conventional way or as laser-puncture, has been shown to be effective in muscle regeneration and it is important to consider the type of the laser, the radiation parameters, the period evaluated and the application time. **Objective:** The aim of the present study is to evaluate the muscle regeneration process in rats treated with conventional laser or laser puncture. **Material and methods:** For this study it was used forty (40) Wistar rats, which were two months old, and randomized into four groups (n = 10 each): control (C), untreated lesion (L), conventional laser therapy-treated lesion (LLLT) and laser-puncture-treated lesion (LP). The cryoinjury performed in the right tibialis anterior muscle belly and after 24 hours the LLLT and LP groups received 10 continuous low intensity AsGa diode laser sessions, with a wavelength of 830 nm and power of 30 mW. The animals submitted to local application at two points on the muscular belly, which randomly selected in the LLLT group and at two acupuncture points E36 and BP6 in the LP group, for 30 seconds at each point with 2J/cm² of energy density and a total energy of 1.8J. For the functional analysis of withdrawal threshold and grip strength three evaluations were performed: one before the injury (AV1), another one 24 hours after the injury (AV2) and the last one at the end of treatment (AV3). At the 13th day after the injury the muscle was removed for analysis of the cross-sectional area and connective tissue density and also to analyze the muscle regeneration-related proteins, such as myogenin, MyoD, m-TOR phospho, Murf-1 and TGF- β 1. It was used the analysis of a variance (ANOVA – *One-way*) followed by the Bonferroni *post hoc* test to determine the difference between experimental conditions. The significance level adopted was $p < 0.05$. The data trend interpreted using Cohen's formula for *effect size*. **Results:** The groups C and LP showed similar content for the MyoD, myogenin and cytokine TGF β 1, indicating a better physiological response in the laserpuncture group, but this was not found in the functional and morphological analyzes where there was no significant difference. **Conclusion:** The 830nm, 30mW and 1.8J total energy laser in 10 sessions was unable to accelerate the post-cryoinjury regeneration process in either technique.

Keywords: low-level light therapy, skeletal muscle, regeneration, acupuncture points.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	9
1.1	Regeneração Muscular	11
1.2	<i>Laser</i>	15
1.3	Laserpuntura	18
2	OBJETIVOS	24
2.1	Objetivo Geral	24
2.2	Objetivos Específicos	24
3	MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1	Grupos Experimentais.....	25
3.2	Desenho Experimental	26
3.3	Protocolo de Lesão Experimental.....	27
3.4	Protocolo de Laserterapia de Baixa Intensidade	28
3.5	Avaliação do Limiar de Retirada.....	31
3.6	Teste de Força	32
3.7	Eutanásia dos Animais	33
3.8	Análise Histológica	33
3.9	Técnica de Immunoblotting	35
3.10	Análise Estatística	36
4	RESULTADOS	37
4.1	Análise do Limiar de Retirada	37
4.2	Análise da Força	38
4.3	Análise morfométrica.....	39
4.4	Quantificação da Área de Secção Transversa (AST).....	41
4.5	Proteínas relacionadas a regeneração da fibra muscular	41
4.6	Quantificação da porcentagem de área de Tecido Conjuntivo (%ATC) e conteúdo de TFG- β 1	43

5 DISCUSSÃO	44
6 CONCLUSÃO.....	53
REFERÊNCIAS*	54
ANEXO A	66

1 INTRODUÇÃO

As lesões musculares representam cerca de 55% das causas de lesões na prática esportiva,, podendo adiar seu retorno à atividade esportiva por semanas ou meses , devido perda da funcionalidade geralmente acompanhada de um quadro algico severo de longa duração(BORATO et al., 2008; GIGANTE et al.,2014;HUARD; LI; FU, 2002). Informações sobre o mecanismo da lesão, sua localização, a classificação e a recorrência são fundamentais para programar o tratamento (VALLE et al., 2017). Estudo realizado com jogadores brasileiros de handebol apontou que os atletas com lesões prévias mostraram alto risco de desenvolver outra lesão por uso excessivo, principalmente em mulheres (GIROTO et al., 2017).

Acima de 90% dos casos de lesão muscular ocorre por algum tipo de contusão e estiramento, sendo que nas contusões normalmente ocorre uma força de compressão extrínseca (força externa) sobre o músculo, o chamado golpe direto, ou ainda por forças indiretas que se relacionam com tensões exercidas no músculo, tanto em atividades de vida diária quanto nos esportes, sendo a recuperação bastante similar (BARROSO; THIELE, 2011; DAWOOD; AL-SALIHI; QASIM, 2013; FUKUSHIMA et al., 2001; LI, 2005).

Os músculos mais afetados nesse tipo de lesão são isquiotibiais, quadríceps e gastrocnêmios, visto que estes são mais sujeitos às forças de aceleração e desaceleração (HAGGLUND; WALDEN; EKSTRAND, 2009). Nos desportos de alta competição, as lesões musculares correspondem em torno de 31%. Dentro do futebol, por exemplo, em torno de 37% dos jogadores perderam treino ou competição por lesões, em especial dos isquiotibiais (MUELLER–WOHLFAHRT et al., 2013).

As manifestações clínicas indicativas da lesão muscular dependem da severidade e natureza da mesma, sendo classificadas em três categorias: leve (grau I) onde poucas fibras são lesadas, formando pequeno edema, com mínima perda da força e do movimento; moderada (grau II) grande lesão muscular com perda de força; severa (grau III), apresenta extensa lesão muscular resultando em perda total da função do músculo (JARVINEN et al., 2000).

O sucesso da regeneração muscular depende do indivíduo, da extensão e da natureza da lesão, porém em todas as situações o processo envolve três fases sobrepostas: inflamação (degeneração), proliferação (regeneração) e remodelação. (FERRARI et al., 2005; JÄRVINEN et al., 2005, LAUMONIER; MENETREY, 2016). A fase de destruição (degeneração) é caracterizada pela ruptura e necrose de fibras musculares, seguida pela formação de um hematoma entre as fibras musculares rompidas e pela reação de células inflamatórias (FERNANDES; PEDRINELLI; HERNANDEZ, 2011). Durante o processo de inflamação gerado pela lesão muscular, há uma produção de diversos agentes inflamatórios que podem causar uma percepção aumentada de estímulo doloroso, conhecido como hiperalgesia. Destaca-se a ação das células gliais: os astrócitos, micróglia e oligodendrócitos, sendo astrócito e microglia as principais envolvidas na modulação neuroimune da dor (JI; BERTA; NEDERGAARD, 2013; MILLIGAN; WATKINS, 2009).

Algumas citocinas pró-inflamatórias e interleucinas originadas da migração celular e de uma resposta pró-inflamatória proveniente dos miócitos lesionados podem intensificar o processo da lesão muscular. Algumas citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β , IL-6 e TNF- α , contribuem não só para a fisiopatologia da lesão tecidual, mas também para uma redução do limiar nociceptivo, perpetuação de

outros mediadores envolvidos na modulação e manutenção da dor (BARROSO;THIELE,2011; OLIVEIRA et al.,2011;).

As fases finais da inflamação se caracterizam por um caráter pró-resolutivo, migração de células inflamatórias, liberação de citocinas anti-inflamatórias, contribuindo para processo de repato e regeneração (FULLERTON;GILROY,2016).

1.1 Regeneração Muscular

Para estudar as fases da degeneração muscular são usados vários métodos de indução da lesão em modelos animais, por meio da contusão (MINAMOTO; BUNHO; SALVINI, 2001; PERTILLE; MACEDO; OLIVEIRA, 2012), eletroestimulação (HILL; WERNING; GOLDSPINK, 2003; LOPES-MARTINS et al., 2006), exercícios físicos (SERRÃO et al., 2003), injeções de miotoxinas (MIYABARA et al., 2004; BORATO et al., 2008), desnervação (JAKUBIEC-PUKA et al., 1999) e a criolesão (ASSIS et al., 2013; MORAIS et al., 2017; PERTILLE et al., 2017; RENNO et al., 2014). Esse último tem a capacidade de induzir a lesão e subsequente regeneração em uma área delimitada do ventre muscular, além de ocasionar uma lesão limpa e de fácil reprodutibilidade (MIYABARA et al., 2006).

A lesão muscular é caracterizada pelo rompimento dos miofilamentos, anormalidade mitocondrial, descontinuidade no sarcolema, necrose celular, além de entrada excessiva de cálcio gerada pelos danos do sarcolema levando a proteólise cálcio-dependente causando uma degeneração tecidual (CHARGÉ; RUDNICKI, 2004).

O processo inflamatório agudo leva a uma resposta abrupta e precoce caracterizada pela vasodilatação e aumento do fluxo sanguíneo no local, levando ao extravasamento de proteínas e recrutamento de leucócitos formando edema e liberação de agentes pró-inflamatórios (WOOLF, 2011). Segundo Jarvinen et al. (2000) e Kannus et al. (2003), essa fase é caracterizada por um tecido edemaciado, pela formação de hematoma, fibrina e infiltrado inflamatório, onde os neutrófilos localizados na área da lesão liberam citocinas atraindo mais células inflamatórias, e os macrófagos realizam a fagocitose da fibra muscular lesada. A creatina quinase (CK) é um marcador bioquímico bem utilizado para caracterizar a lesão muscular, pois tem seu nível aumentado na corrente sanguínea, pela ruptura do sarcolema das fibras musculares e extravasamento dessa enzima, permitindo avaliação indireta do dano muscular (REBALKKA; HAWKE, 2014).

Na sequência surge a fase de proliferação que pode durar de uma a três semanas, onde o tecido necrosado é fagocitado, ocorre coagulação da fibrina, proliferação de fibroblastos e miofibroblastos, produção de fibronectina, colágeno e outros componentes da matriz extracelular, além do aumento de outros macrófagos relacionados à recuperação muscular, responsáveis pela ativação das células satélites. E por fim, a terceira fase é composta pela maturação e remodelação (21 dias ou mais), onde as miofibrilas maturam, ocorre redução do volume de capilares, organização do colágeno e da matriz extracelular, e restauração da capacidade funcional do músculo (JARVINEN et al., 2000; KANNUS et al., 2003).

Considerando a complexidade do reparo muscular observa-se que as células inflamatórias promovem tanto o dano quanto a regeneração, pela ação combinada de espécies reativas de oxigênio (EROs), antioxidantes enzimáticos e de baixo peso

molecular, fatores de crescimento, hormônios e citocinas, que mantêm um equilíbrio entre atividades pro e antioxidantes e pro e anti-inflamatórias (TIDBALL, 2005).

Para Couto et al. (2015), a revascularização é fator determinante na regeneração da fibra muscular pós-lesão, pois ocasiona o acesso de nutrientes e oxigenação, pelos vasos dos tecidos adjacentes, sendo que esta revascularização ocorre por proliferação de células endoteliais, estimuladas por fatores de crescimento como o fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF).

O músculo esquelético possui importante potencial regenerativo graças a uma população de células especiais com grande capacidade mitogênica, as células satélites, que 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. Quando ativadas percorrem vários estágios até chegar a miogênese, expressando em cada um deles marcadores da linhagem miogênica; no estado de quiescência são expressos Pax7, CD34 e moléculas de adesão NCAM e M-caderina. A ativação leva ao início das fases de proliferação e diferenciação, onde são expressos MyoD e Myf5; em um estágio mais tardio ocorre o final da diferenciação e início da maturação dos mioblastos, com expressão de miogenina (ALVES et al., 2014, BRACK; RANDO, 2007; CHARGÉ; RUDNICKI, 2004; HAWKE; GARRY, 2001; LIEBER, 2002; MARG et al., 2014; TEDESCO et al., 2010; ZAMMIT; PARTRIDGE; YABLONKA-REUVENI, 2006).

Considerando que durante a regeneração ocorre o aumento da síntese proteica para a formação das novas fibras musculares, o alvo da rapamicina em

mamíferos/alvo mecanístico de rapamicina (mTOR) se torna uma importante proteína para estudo. Zhang et al. (2015) e Rion et al. (2019) destacam o papel da mTOR na ativação das células satélites pós-natal e na regeneração do músculo esquelético, através do controle da expressão de genes miogênicos.

A regeneração muscular envolve também a remodelação da matriz extracelular. O fator de transformação de crescimento $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) é uma citocina que promove a formação de tecido conjuntivo na área regenerada, sendo um potente fator fibrogênico que regula a síntese de matriz extracelular, como colágeno e fibronectina durante a regeneração (DELANEY et al., 2017).

Gumucio, Sugg e Mendias (2015) também associam o TGF- β a otimização das ações de células satélites. A proliferação prematura, diferenciação e fusão de células satélites resulta em defeitos na regeneração (MURPHY et al., 2011), desta forma o TGF- $\beta 1$ agiria temporalmente para regular a atividade de células satélites garantindo que as fibras musculares tenham terminado de quebrar as proteínas sarcoméricas danificadas no intuito de remodelar a fibra e induzir a hipertrofia.

Existem várias formas de tratamento para lesões musculares tais como: crioterapia, ultrassom terapêutico, medicamentos anti-inflamatórios não esteroides, plasma rico em plaquetas, sempre tendo como objetivo modular os sinais e sintomas do quadro inflamatório e da regeneração muscular (DUEWEKE; AWAN; MENDIAS, 2017). A terapia por laser de baixa intensidade (LLLT) tem demonstrado resultados interessantes no processo de reparo muscular tanto em modelos animais como em humanos, sendo esses resultados atribuídos aos efeitos da redução da inflamação, atenuação no aumento das enzimas no sangue (como a creatina quinase), aumento

na atividade antioxidante das enzimas e redução na fadiga muscular (FELISMINO et al., 2014).

1.2 Laser

A palavra *laser* corresponde a uma sigla composta pelas primeiras letras de *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, que significa “Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação”, sendo considerado um recurso não invasivo, de fácil aplicação e que não causa efeitos colaterais (ALVES et al., 2014; MALUF et al., 2006).

A luz só pode promover alterações fotoquímicas se a radiação for absorvida pela estrutura irradiada. Nos tecidos biológicos essas estruturas são chamadas de cromóforos ou fotorreceptores, que são capazes de ser excitados por irradiação de fótons, sendo os principais cromóforos do corpo humano a hemoglobina, a mioglobina, as flavoproteínas e as porfirinas (BAROLET, 2008; FARIVAR; MALEKSHAHABI; SHIARI, 2014; HUANG et al., 2009).

Os efeitos da terapia *laser* são modulados pelos parâmetros de aplicação, como por exemplo a densidade de energia (J/cm^2), o número de sessões e o tempo de aplicação em cada ponto, sendo que os comprimentos de onda mais usados estão no espectro vermelho ou infravermelho, de 600 a 1000 nm (nanômetros), com uma densidade de irradiação acima de $5W/cm^2$ (HUANG et al., 2009). Na prática clínica, a densidade de potência ideal, a dose de energia e o tempo de irradiação são parâmetros extremamente importantes para planejar o tratamento (ALBUQUERQUE-PONTES et al., 2015).

A terapia a *laser* de baixa intensidade (*Low-Level Laser Therapy* – LLLT) apresenta vantagens em relação aos outros tratamentos visto que diminui o tempo de cicatrização garantindo melhor reparo (MEIRELES et al., 2014). Durante a fase inflamatória, onde estão presentes os neutrófilos e macrófagos, ocorre também a produção de citocinas inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF α), interleucinas (IL1A, IL6 e IL-8), bem como enzimas proteolíticas que levarão a fagocitose das células e propagação da inflamação (JARVINEN et al., 2005; MANN et al., 2011). A LLLT auxiliará o reparo do tecido por limitar essa resposta inflamatória e diminuir o dano oxidativo (SILVEIRA et al., 2011).

De forma geral, a LLLT atua na fase inicial da regeneração diminuindo a dor, o processo inflamatório, estimulando a proliferação de células satélites, de colágeno e de fibroblastos, promovendo a microvascularização e estímulo a formação de novos vasos sanguíneos, remodelando a matriz extracelular, aumentando o metabolismo celular e o potencial regenerativo (ALVES et al., 2014; ASSIS et al., 2013; BRUNELLI et al., 2014; FERNANDES et al., 2014; SILVEIRA et al., 2011; SOUZA et al., 2014).

Com a LLLT a energia da célula pode ser alterada, elevando-se os níveis de ATP disponíveis no tecido, por meio da fosforilação oxidativa. As mitocôndrias possuem fotorreceptores (citocromo C oxidase), que ao receberem a irradiação com *laser* promovem a síntese de ATP, o que pode promover a prevenção da fadiga muscular devido a este aporte energético adicional (ALMEIDA et al., 2013; COSTA et al., 2014; DE BRITO VIEIRA et al., 2014; LEAL JÚNIOR et al., 2010).

Os estudos apresentam parâmetros diferentes para o tratamento de lesões musculares, como comprimento de onda variando entre 632,8 a 904 nm, a densidade de energia de 1 J/cm² até valores acima de 300 J/cm², como também o número de

sessões e tempo de tratamento (MANTINEO et al., 2014; PIVA et al., 2011; RAMOS et al., 2012).

Segundo Zanotti et al. (2011), doses excitatórias (até 8 J/cm²) são indicadas quando o objetivo da intervenção inclui a potencialização da bomba sódio/ potássio, estímulo à produção de adenosina trifosfato (ATP), restabelecimento do potencial de membrana, aumento do metabolismo e proliferação celular (SHEFER et al., 2002; VATANSEVER et al., 2012). A revisão sistemática de Alves et al. (2014) apontou que a energia de irradiação na maior parte dos estudos de reparo muscular está entre 0,4 e 9 J, sendo as mais comuns entre 1,4 e 2,0 J.

No estudo de Silva et al. (2012), usando o laser de Arseneto de Gálio nas energias de 1,5 e 3,0 J por cinco dias consecutivos, sendo a primeira aplicação três dias após a injúria muscular induzida por injeção crotoxina, houve uma melhora na regeneração muscular, onde os grupos tratados mostraram uma maior regeneração das miofibrilas, com maior diâmetro e melhor organizadas em fascículo, entretanto apenas a energia de 3J foi capaz de atenuar o aumento do tecido conjuntivo intramuscular.

Estudos recentes mostraram a energia de 3J (830 nm, potência 100 mW) como eficaz na modulação do processo inflamatório, tanto em análises bioquímicas como funcionais (trabalho muscular) após a contusão muscular (TOMAZONI et al., 2017a; TOMAZONI et al., 2017b). Segundo Podbielski, Otrocka-Domagala e Rotkiewicz (2006), o efeito da LLLT está relacionado à aceleração da proliferação das células miogênicas e do processo de regeneração muscular, sugerindo uma fagocitose mais eficiente de células sanguíneas, podendo auxiliar na remoção de metabólitos e no

aumento do aporte sanguíneo, contribuindo para síntese de ATP, aumentando a resistência do músculo a fadiga e melhorando o desempenho.

A fotobiomodulação é capaz de induzir processos fotobiológicos nas células, sendo necessários espectros de ação exatos para ativação dos fotorreceptores . A atividade celular, tanto em divisão como em síntese, tem sido relacionada ao comprimento de onda e com a dose e não especificamente a fonte de luz (HUANG,2009). É capaz de auxiliar na redução no tempo de cicatrização por provocar efeitos bioquímicos e celulares , entre eles aumento da proliferação dos fibroblastos e da síntese de colágeno, efeitos antioxidantes ,aumento no metabolismo das mitocôndrias além de estímulo da síntese de DNA e proliferação celular . Entre os mecanismos fisiológicos induzidos pela fotobiomodulação na cicatrização , está sua influência na ativação de fatores de transcrição redoxsensíveis que pode induzir a sinalização intracelular e alterar a produção de ROS (CHEN et al.2011;GUERRA, et al., 2013; MARQUES, et al.,2016;PUGLIESE, et al., 2003;TAKMATSU-ROCHA et al., 2016)

1.3 Laserpuntura

A acupuntura é um recurso terapêutico da Medicina Tradicional Chinesa que atende a todos os quesitos da Medicina Tradicional, na morfologia do sistema de canais e colaterais (JINGLUO); na dinâmica vital dos sistemas internos (ZANGFU); na diagnose a pulsologia chinesa; na doutrina, os oito princípios (BAGANG) e os cinco elementos (WU XING) e na terapêutica da acupuntura e da moxabustão (PEREIRA, 2005).

O objetivo de práticas terapêuticas baseadas na Medicina Tradicional Chinesa é compreender os desequilíbrios energéticos que atingem o indivíduo e recuperar seu equilíbrio, através do estabelecimento da relação entre o comportamento, os sentimentos, a alimentação, o pulso, a língua, entre outros, para então determinar qual é a melhor terapêutica de tratamento (CIRILO, 2001).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), uma definição ampla de Acupuntura é a estimulação de pontos específicos do corpo, através do uso de agulhas, moxabustão, eletricidade, *laser* ou digito-pressão, com propósitos terapêuticos e profiláticos, sendo que a radiação *laser* ideal para pacientes com fobia de agulhas (ERNST, 2006; LIU et al., 2009; SCOGNAMILLO-SZABÓ; BECHARA, 2001; SHANG, 2000).

Os mecanismos subjacentes são grande parte inexplicáveis, recentes estudos mostram alterações induzidas pela acupuntura na excitabilidade do sistema motor, o que explica fisiologicamente a ligação da acupuntura com o desempenho motor (LO et al., 2005; MAIOLI, et al. 2006). A acupuntura tem efeito sobre a potencia muscular (HÜBSCHER et al., 2010), melhora a microcirculação (SANDBERG et al. 2005), possui efeito anti-inflamatório (ZIJLSTRA et al., 2003) além de inibir a transmissão nociceptiva espinhal e supra-espinhal (IKEDA et al., 2000).

O estímulo realizado pelas agulhas induz a liberação de pró-opiomelanocortina através do eixo hipotálamo-hipófise. Este hormônio será degradado e seus produtos apresentam potente efeito analgésico, além de ação anti-inflamatória. São ativados inúmeros reflexos, formando ligações dentro do córtex cerebral o que leva a melhora

do tônus do sistema nervoso e da reatividade do sistema neurovegetativo (ALVARENGA et al.,2014)

A acupuntura além de tratar atletas tanto profissionais como amadores, modulando o bem-estar físico e emocional, acelerar o processo de recuperação pós-treino, pós-competição, e alcançar um nível mais elevado de performance. A estimulação de determinados acupontos tem sido recomendado por alguns autores para melhorar o desempenho físico, variáveis metabólicas e plasticidade muscular (ROSSETTO, 2009; SANTOS et al., 2008). Onda et al. (2011) conduziram um estudo para avaliar o efeito da acupuntura na prevenção de atrofia muscular do músculo gastrocnêmio em ratos utilizando pontos de acupuntura. Os pesquisadores encontraram que o grupo intervenção apresentou níveis de atrogina-1 e MuRF1 (ubiquitina-ligases que atuam na síntese-degradação proteica muscular) mais elevados do que no grupo controle, sugerindo que a acupuntura pode prevenir parcialmente a atrofia muscular em ratos.

Chae (2007) investigou os efeitos anti-inflamatórios da acupuntura e sua atuação em diversas citocinas em ratos e encontrou que a acupuntura pode causar queda significativa dos níveis séricos de IL-6 e de TNF- α .

A excitação causada pela puntura estimula diversos efeitos na função corporal, incluindo a inibição dos efeitos da transmissão simpática dos impulsos nociceptivo para o sistema nervoso central (SNC), resultando em analgesia e supressão da dor, como também a estimulação de diversas respostas reflexas somáticas, autonômicas e hormonais (KAGITANI et al., 2010).

A Laserpuntura ou *laser* acupuntura é definida como a estimulação dos pontos de acupuntura tradicional com a LLLT. As evidências sobre seus efeitos foram demonstradas por estudos usando a ressonância magnética que observaram a ativação do córtex visual como resposta ao estímulo no ponto B67 usado para tratamento de dor nos olhos (SIEDENTOPF et al., 2005). É uma alternativa em relação à acupuntura tradicional com grande relevância, pois permite o estímulo de pontos de acupuntura de forma bem definida e oferece a possibilidade da aplicação placebo pura (WHITAKER, 2004).

Cabrera, Perón e Alfonso (2002) afirmaram que a LLLT nos acupontos produz uma indução fotobiológica, efeitos bioquímicos e bioelétricos nas células, produzindo ação anti-inflamatória, analgésica, promovendo regeneração celular; aumento do ATP mitocondrial e incremento da síntese de proteínas, levando ao aumento do número de fibroblastos e da síntese de colágeno, além da regeneração dos vasos sanguíneos, aumento de velocidade de crescimento de nervos periféricos, incremento da repitalização e da divisão celular. A baixa frequência do *laser* induz a liberação central de substâncias como endorfinas, beta-endorfinas e encefalinas resultando em analgesia entre 10 e 20 minutos, sendo este efeito cumulativo (TAFFAREL; FREITAS, 2009).

O efeito da acupuntura em tratamentos inflamatórios através dos acupontos explica-se pela transmissão das informações inflamatórias pelos nervos sensoriais ao hipotálamo, onde os estímulos processados levam a uma ação anti-inflamatória pelo sistema humoral do sistema nervoso autônomo, pelo eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal, sendo os que os acupontos agem como moduladores. Esta técnica milenar atua no TNF- α e em algumas citocinas, como a IL1 β , existentes no cérebro e que

interagem com sistema imune. Estas citocinas agem no sistema nervoso autônomo parassimpático liberando a acetilcolina, resultando em uma resposta reflexo neuroimune, suprimindo a liberação das citocinas inflamatórias. Este mecanismo é realizado por estímulos eferentes induzindo resposta na atividade colinérgica do nervo vago gerando um efeito anti-inflamatório (CHO et al, 2006).

Os acupontos em animais têm sido localizados a partir da transposição dos pontos localizados em meridianos em humanos, e levando-se em conta a anatomia peculiar de cada animal, sendo possível a comprovação da localização dos pontos, pois a resistência elétrica nesses locais é menor quando comparado com outras regiões da pele (AHN et al., 2005; PANZER,1993).

Estudos em animais e autópsias em humanos revelaram que a maioria dos pontos de acupuntura contém terminações nervosas livres, receptores cutâneos encapsulados (Merkel; Meissner; Ruffini e corpúsculos de Pacini), receptores musculares (fusos musculares e órgãos tendinosos de Golgi) e suas fibras aferentes (ZHANG; WANG; MCALONAN, 2012). O ponto de acupuntura é uma região da pele com alta concentração dessas terminações, que quando estimuladas projetam esses estímulos para o sistema nervoso central, apresentam sensibilidade espontânea ao estímulo e são caracterizadas por baixa resistência elétrica (DRAEHMPAEHL; ZOHMANN, 1997; FABER; TIMO-IARIA; 1994). Estudos como de Zhao (2008) e Chen et al. (2007) afirmaram que o acuponto Zusanli (E36), estomago 36, localizado a 3 cm abaixo da patela e 0,5 cm lateral a tibia em humanos, e segundo Li (2003), anatomicamente localizado a 3 mm lateralmente ao tubérculo anterior da tibia e 4 mm abaixo da articulação do joelho próximo a cabeça da fíbula em ratos, é bem utilizado em desordens dolorosas, sendo o ponto de primeira escolha para analgesia em

membro inferior, podendo ser utilizado em tratamento de dor aguda de nervo ciático e síndromes gastrointestinais.

A hipótese do presente estudo é que a aplicação da LLLT operando na região do infravermelho (830 nm) possua ação anti-inflamatória e acelere o processo de recuperação após lesão muscular por criolesão, e seja mais efetivo quando associado a pontos de acupuntura.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeitos da laserterapia em comparação com a laserpuntura no processo de regeneração muscular após criolesão em tibial anterior em ratos tratados com *laser* convencional ou laserpuntura.

2.2 Objetivos Específicos

- Comparar os efeitos das duas técnicas laserterapia e laserpuntura sobre a regeneração da lesão do músculo tibial anterior induzida por criolesão em ratos Wistar após 10 sessões, por meio das análises funcional, morfológica e bioquímica;
- Verificar os efeitos das técnicas de tratamento nas avaliações funcionais de limiar de retirada e força de preensão;
- Avaliar a morfologia das fibras musculares regeneradas, considerando a área de secção transversa e a área de densidade de tecido conjuntivo;
- Avaliar o conteúdo de proteínas relacionadas à miogênese, como MyoD e miogenina, além de outras proteínas/citocinas como mTOR, Murf e TGF- β 1.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo teve caráter experimental, intervencional, controlado e aleatorizado. Seguiu as recomendações para pesquisa experimental com animais, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, sob parecer 53/17 (Anexo A). Foi desenvolvido em parceria com o Laboratório de Estudo de Lesões e Recursos Fisioterapêuticos e no Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional da Unioeste, Campus de Cascavel.

O grupo amostral foi composto por 40 ratos machos da linhagem *Wistar*, com idade média de 60 dias, peso médio de 299,1 gramas, obtidos do Biotério Central da Unioeste e mantidos no Laboratório de Estudo de Lesões e Recursos Fisioterapêuticos, em caixas padrão de polipropileno, em ambiente com temperatura de $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo de 12 horas, recebendo água e ração *ad libitum*.

3.1 Grupos Experimentais

Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos, compostos por 10 ratos cada, sendo:

- Controle (C): não foram submetidos à criolesão e não receberam nenhum tipo de intervenção;
- Lesão sem tratamento (L): os animais foram submetidos à criolesão, mas não receberam nenhuma intervenção;

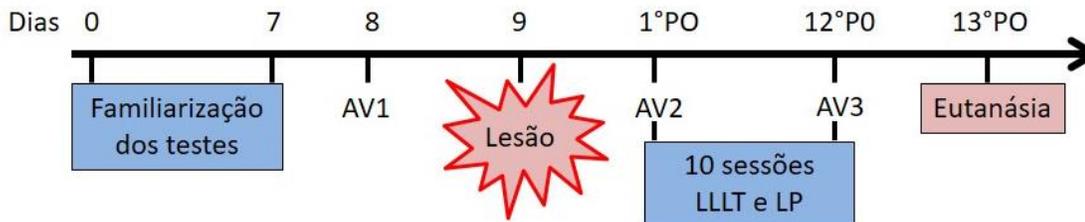
- Lesão tratado com laserterapia convencional (LLLT): os animais foram submetidos a criolesão e receberam o tratamento por laser na forma tradicional;
- Lesão tratado por laserpuntura (LP): os animais foram submetidos a criolesão e receberam o tratamento por laser nos pontos E36 e BP4 de acupuntura.

Após o protocolo de lesão, o animal 1 do grupo L e o animal 10 do grupo LP morreram, reduzindo o número de animais para 9 nesses grupos.

3.2 Desenho Experimental

Previamente ao período da lesão foram realizados sete dias de treinamento para familiarização de todos os grupos para os testes de incapacidade funcional, limiar de retirada e força de preensão, visando dissipar o viés de estresse dos testes. O tratamento dos grupos LLLT e LP iniciou a partir do 1º dia após o procedimento cirúrgico (1º PO) e foi conduzido por 10 sessões, totalizando cinco dias por semana durante duas semanas, com intervalo de dois dias ao término do protocolo na primeira semana. As avaliações funcionais foram realizadas em todos os grupos experimentais 24 horas antes da lesão (AV1), 24 horas após a lesão (AV2) e após a aplicação da última sessão de tratamento (AV3) no 12º pós-operatório (Figura 1).

Figura 1: Desenho experimental. Fase de familiarização dos testes funcionais. As avaliações foram realizadas antes da lesão (AV1), 24 horas após a lesão (AV2) e ao final do tratamento (AV3).



LLLT: lesão tratado com *laser* convencional e LP: lesão tratado com laserpuntura, PO: pós-operatório

3.3 Protocolo de Lesão Experimental

Os animais foram pesados e anestesiados com xilazina (10 mg/kg, 0,01 mg/gr) e ketamina (50mg/kg, 0,05 mg/gr) intraperitoneal. Posteriormente à verificação do estado de consciência, pela ausência de resposta motora ao pinçamento da cauda e das pregas interdigitais, realizou-se a tricotomia do membro posterior direito e assepsia da região com uso de álcool 70%. Em seguida foi realizada uma incisão paralela às fibras do músculo tibial anterior direito, expondo assim o músculo.

Efetou-se a criolesão, segundo o protocolo de Miyabara et al. (2006) que consiste na aplicação de uma haste metálica de 1cm x 0,5 cm resfriada em nitrogênio líquido por 30 segundos, pressionada sobre o ventre do músculo tibial anterior por 10 segundos, em seguida imersa novamente em nitrogênio líquido por 30 segundos, e pressionada novamente no local (Figura 2). Posteriormente a pele foi suturada e os animais alocados de dois em dois em caixas de polipropileno com ração e água *ad*

libitum até sua recuperação pós cirúrgica. Depois alocados de quatro em quatro animais por caixa.

Figura 2: Procedimento de criolesão do músculo tibial anterior. Em A: haste metálica resfriada em nitrogênio líquido e pressionada por 10 segundos sobre o músculo; Em B: aspecto do músculo logo após a lesão.



Fonte: acervo pessoal

3.4 Protocolo de Laserterapia de Baixa Intensidade

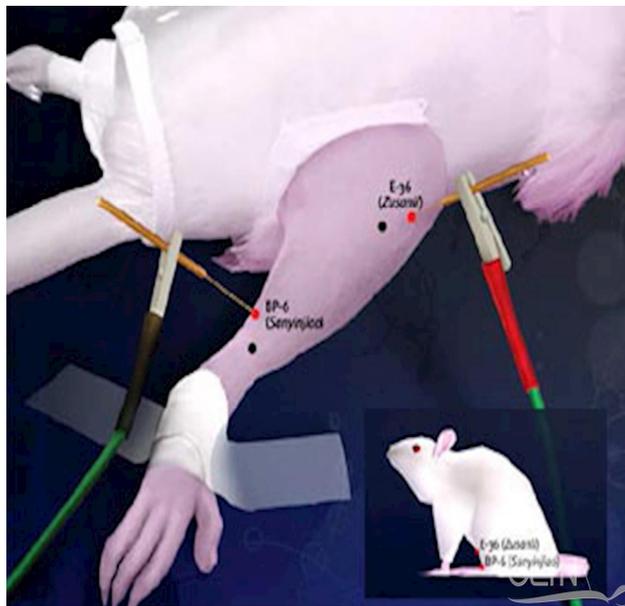
Para o tratamento foi utilizado o laser de baixa intensidade de diodo AsGa na forma contínua, com comprimento de onda de 830 nm, potência de 30 mW da marca Ibramed[®]. Os parâmetros foram calculados pelo número de pontos a serem utilizados no tratamento e pelo tamanho da área a ser tratada.

O cálculo da densidade de energia a ser administrada no tecido é feito por meio da potência de saída média do equipamento, caracteriza-se pela quantidade de energia associada aos fótons que alcançam o tecido por unidade de tempo. Sendo a densidade de energia ou dose é definida pela quantidade de energia fornecida em uma área determinada, estabelecendo os efeitos fotobiológicos de inibição, estimulação ou não manifestação dos efeitos terapêuticos (GARCEZ et Al., 2012; HUANG, et al., 2011).

Revisão sistemática de 30 estudos mostrou que a terapia laser de baixa potencia apresenta diferentes ajustes, sendo as doses de energia mais comumente usadas de 3J e 1J, comprimentos de onda de 904nm e 830nm, os resultados obtidos vão desde a diminuição a resposta inflamatória mediante redução de células inflamatórias e modulação de mediadores de inflamação, aumento síntese de colágeno, além de angiogenese, redução de estresse oxidativo, colágeno e da fibrose, aumento de tecido de granulação, remodelação e síntese óssea, além de expressão de proteína de diferenciação miogênica (MyoD), e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), redução no fator de crescimento transformante beta (TGF – β) e da concentração da creatina quinase, aumento de força muscular, melhora das propriedades biomecânicas de tendão e da função locomotora como um todo.

Os animais foram submetidos às aplicações por meio da técnica pontual (em dois pontos sobre o ventre muscular do músculo tibial anterior lesado no grupo LLLT, e em dois pontos de acupuntura E36 e BP6 (esses pontos são conhecidos por causar hiperanalgesia tanto em animais como em humanos, Figura 3), no grupo LP, durante 30 segundos em cada ponto, com 2 J/cm^2 de densidade de energia e uma energia total de 1,8 J (Tabela 1).

Figura 3: Pontos de acupuntura usados no animal



Fonte: Zurrón, Barrach e Crepaldi (2013) disponível em <https://www.cetn.com.br/imprensa/acupuntura-e-analgesia/20130122-102236-g613>

Tabela 1 – Valores dos parâmetros do *laser* utilizados nos grupos LLLT e LP para tratamento após criolesão

Parâmetros	Alumínio – gálio ASGa
Comprimento de onda	830Nm
Área de feixe	0,11600 cm ²
Potência de saída	30mW
Densidade de energia	2J/cm ²
Energia por ponto	0,9J
Total de pontos	2
Tempo de exposição por ponto	30 segundos
Tempo total	60 segundos
Energia Total	1,8J

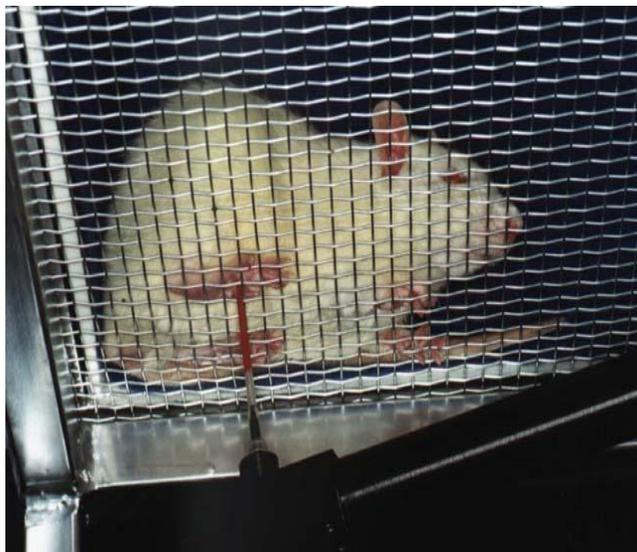
LLLT: lesão tratado com *laser* convencional e LP: lesão tratado com laserpuntura.

Os animais foram contidos manualmente por um pesquisador enquanto outro aplicava o *laser* e as aplicações foram realizadas com o mesmo equipamento nos grupos LLLT e LP. O tratamento teve início 24 horas após a lesão, cinco vezes na semana, durante duas semanas, totalizando 10 sessões. O equipamento foi calibrado anteriormente ao experimento e apresenta registro Anvisa: 10360310030.

3.5 Avaliação do Limiar de Retirada

O uso de filamentos de Von Frey é um método utilizado para avaliar a sensibilidade tecidual ao estímulo mecânico, sendo bastante utilizado clinicamente, primeiramente em humanos (JENSEN et al., 1986), e posteriormente em ratos e camundongos (CUNHA et al., 2004). O experimento foi realizado com um anestesímetro eletrônico da marca Insight[®], que consiste em um transdutor de pressão adaptado a um contador digital de força expressa em gramas (g). O contato do transdutor de pressão com a pata foi realizado através de uma ponta descartável de polipropileno, com variação de 0,1-1000 g (NEUGEBAUER et al., 2007). Os animais foram colocados em caixas de madeira durante 15 a 30 minutos para adaptação na semana anterior à lesão. O assoalho da caixa é feito de arame não maleável na forma de rede. As alterações nos limiares nociceptivos foram avaliadas exercendo-se uma pressão linearmente crescente no centro da planta membro pélvico direito do animal até a produção de uma resposta caracterizada como sacudida (flinches). Assim que o animal retirou o membro o teste foi interrompido para registro do limiar de retirada (Figura 6).

Figura 6: Teste do limiar de retirada



Fonte: acervo pessoal

Os estímulos foram repetidos por até seis vezes, em geral até o animal apresentar três medidas similares com uma clara resposta de flinch após a retirada do membro. A intensidade de hipernocicepção foi obtida pela média de três valores expressos em gramas (JENSEN et al., 1986).

3.6 Teste de Força

Para a avaliação da força muscular foi usado um medidor de força de preensão (BERTELLI; MIRA, 1995), modelo EFF 305 Grip Strength Meter, da marca Insight[®]. Segundo Karvat et al. (2018) o teste foi adaptado para avaliar a força de preensão do membro pélvico direito. Os animais foram cuidadosamente contidos pelo dorso e permitiu-se que eles agarrassem com a pata posterior direita uma grade conectada a um transdutor de força. Os animais foram tracionados com firmeza crescente, até perderem a preensão, momento do registro da força máxima exercida. (Figura 7). Em cada avaliação, o teste foi repetido três vezes e foi utilizado o valor médio.

Figura 7: Teste do limiar de retirada



Fonte: acervo Laboratório Unoeste

3.7 Eutanásia dos Animais

Após o período de tratamento e dos testes funcionais, os animais foram pesados, devidamente anestesiados com cloridrato de ketamina (50mg/kg, 0,05 mg/gr) e xilazina (10 mg/kg, 0,01 mg/gr) via intraperitoneal e eutanasiados por pneumotórax. Em seguida o músculo tibial anterior (TA) direito foi dissecado, limpo e dividido em duas partes iguais transversalmente. Uma das partes foi fixada em solução Metacare armazenada em formol para posterior procedimento histológico, com desidratação em série crescente alcoólica, diafanização em xilol e inclusão em parafina histológica. A outra parte foi colocada em nitrogênio líquido e conservada no biofreezer para à técnica de immunoblotting.

3.8 Análise Histológica

A parte fixada em formol a 7% foi posteriormente emblocada em parafina. Os músculos foram seccionados transversalmente numa espessura de 5 μ m no micrótomo marca Olympus[®] e coletados para a coloração de Hematoxilina e Eosina e tricrômico de Mallory.

Os cortes foram para a desparafinização em xilol e álcool, e posteriormente corados com hematoxilina por 20 segundos, lavados em água corrente por sete minutos, em seguida em água destilada por duas vezes de um minuto cada. Em seguida os cortes foram corados com eosina durante cinco minutos. Iniciou-se após a lavagem com água destilada a desidratação em álcool e diafanização em xilol. Na coloração do tricrômico de Mallory, as lâminas foram desparafinizadas e hidratadas, coradas com a solução A por cinco minutos e solução B por 13 minutos. As lâminas foram montadas para posterior avaliação do tecido conjuntivo.

As lâminas foram montadas com Entellan e utilizadas para mensuração da área de secção transversa (AST) e a densidade de área do tecido conjuntivo (%ATC).

Para a AST foram analisadas 200 fibras em regeneração por animal, bem como dos animais sem lesão, utilizando microscópio óptico com câmera acoplada, com objetiva de 40X e conectado a um computador com software Image Pró-Plus[®] 6.0 (Media Cybernetics) (BRITO et al., 2006).

A densidade de área do tecido conjuntivo foi realizada por meio do software Image Pro[®] com imagens adquiridas do microscópio de luz acoplado a uma câmera e mensurado por meio do software Gimp[®] na objetiva de 40X, onde foram analisadas sete imagens por animal, e sobre as imagens foi analisada através da cor onde pela

quantidade de pixels em relação a foto completa foi contabilizada a porcentagem referente ao tecido conjuntivo (BOSI et al., 2008).

3.9 Técnica de Immunoblotting

Parte do músculo TA foi homogeneizado em Triton X-100 1%, tris-HCL 100 mM (pH 7,4), pirofosfato de sódio 100 mM, fluoreto de sódio 100 mM, EDTA 10 mM, ortovanadato de sódio 10 mM, PMSF 2 mM e 0,1 mg/ml de aprotinina, com volume variando 600 a 1000 uL, a 4°C usando homogeneizador tipo Polytron PTA20S (modelo PT 10/35; Brinkmann Instruments, Westbury, NY, EUA) operado em velocidade máxima por 30 segundos. Os extratos foram centrifugados a 11.000 rpm a 4°C por 20 minutos e o sobrenadante utilizado para análise do extrato total. A determinação de proteína foi realizada pelo método colorimétrico de Bradford e a leitura por leitor de microplaca Epoch (Biotek). As amostras dos extratos proteicos foram tratadas com tampão Laemlli (azul de bromofenol 0,1% e fosfato de sódio 1 M pH 7,0, glicerol 50% e SDS 10%), acrescido de ditioneitol 100 mM e aquecidas banho seco por 5 minutos. Em seguida, 50 µg de proteína foram aplicadas em gel SDS-poliacrilamida, com porcentagem de 12% em aparelho para eletroforese da Bio-Rad (mini-Protean), Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, EUA).

A eletrotransferência do gel para membrana de nitrocelulose foi realizada em 90 minutos a 120V (constante) em aparelho de transferência da Bio-Rad®. As membranas foram lavadas com solução basal (trisma base 10 mM, cloreto de sódio 150 mM e tween) e incubadas com 10 µg de anticorpo primário para MyoD (m-318; rabbit policlonal, Santa Cruz: sc-760); miogenina (mouse monoclonal, Sigma, M5815),

mTOR phospho (rabbit policlonal, Cell Signaling, 2972-S), MuRF-1 (Muscle Ring Finger-1; rabbit policlonal Bioss Antibodies, bs-2539R) TGF- β 1 (mouse monoclonal, Sigma-Aldrich, T7039) e GAPDH (Glicealdeido 3-fosfato dehidrogenase; mouse monoclonal, Santa Cruz, SC-59540), 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 μ g de anticorpo secundário (Goat anti-rabbit IgG-HRP, Santa Cruz : sc-2004 ou Goat anti-mouse IgG-HRP, Santa Cruz: sc-2005) por duas horas em temperatura ambiente. Posteriormente as membranas foram novamente lavadas por 30 minutos com solução basal. Para determinar 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). Os valores foram expressos em unidades arbitrárias, que é o resultado da divisão do conteúdo da proteína estuda pelo conteúdo de GAPDH (proteína de controle interno).

3.10 Análise Estatística

A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Utilizou-se análise de variância de um fator (ANOVA – *One-way*) seguido do teste *post hoc* de Bonferroni para determinar a diferença entre condições experimentais. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$. A tendência dos dados foi interpretada usando a fórmula de Cohen para *effect size* (COHEN, 1988). O limiar de magnitude adotado foi: $\leq 0,19$ trivial; entre 0,20-0,59 pequeno; entre 0,60-1,19 moderado; entre 1,20-1,99 grande; e $\geq 2,00$ muito grande (HOPKINS *et al.*, 2009). Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão (intervalo de confiança de 95%).

4 RESULTADOS

4.1 Análise do Limiar de Retirada

Não foi observada diferença significativa na análise da sensibilidade ao estímulo mecânico entre os grupos avaliados ($F=4,488$; $p= 0,8140$). Diferença significativa foi observado na comparação entre a AV1 e AV2 nos grupos L e LLLT ($p<0,0001$; Tabela 2), indicando resposta de retirada com menor estímulo mecânico 24 horas após a lesão.

Tabela 2: Valores em gramas para a avaliação limiar de retirada dos grupos avaliados, em média e desvio-padrão, para os diferentes momentos de avaliação (AV1: pré-lesão; AV2: 24h pós-lesão e AV3: 12º dia pós-lesão). C: controle; L: lesão; LLLT: lesão tratado com laser convencional; LP: lesão tratado com laserpuntura.

Grupos	AV1	AV2	AV3
C	9,4 ± 3,6	7,3 ± 3,4	8,6 ± 2,7
L	9,1 ± 4,1	5,7 ± 2,6 [†]	7,4 ± 3,2
LLLТ	8,7 ± 2,8	5,2 ± 2,7 [†]	7,5 ± 3,1
LP	9,7 ± 4,9	6,5 ± 3,3	8,5 ± 3,4

[†] difere de AV1 no mesmo grupo; $p<0,0001$

O teste *post hoc* indicou diferença significativa entre a AV1 vs AV2 ($p= 0,031$; $\Delta= 37,53\%$; moderado *effect size*) no grupo lesão e ($p= 0,030$; $\Delta= 39,54\%$; grande *effect size*) no grupo LLLT, entre a AV2 vs AV3 ($p= 0,015$; $\Delta= 42,91\%$; pequeno *effect size*), apenas para o grupo LLLT. Não houve diferença significativa entre as avaliações para o grupo LP (Tabela 3).

Tabela 3: Valores de Cohen's *d effect size* entre as condições experimentais para a variável limiar de retirada.

	Controle vs. Lesão	Controle vs. LP	Controle vs. LLLT	Lesão vs. LP	Lesão vs. LLLT	LP vs. LLLT
AV1	0,07 (trivial)	0,06 (trivial)	0,20 (pequeno)	0,12 (trivial)	0,10 (trivial)	0,24 (pequeno)
AV2	0,52 (pequeno)	0,21 (pequeno)	0,65 (moderado)	0,28 (pequeno)	0,15 (trivial)	0,42 (pequeno)
AV3	0,37 (pequeno)	0,00 (trivial)	0,35 (pequeno)	0,33 (pequeno)	0,02 (trivial)	0,31 (pequeno)

AV1: pré-lesão; AV2: 24h pós-lesão e AV3: 12º dia pós-lesão. LLLT: lesão tratado com laser convencional; LP: lesão tratado com laserpuntura.

4.2 Análise da Força

Não foi observada diferença significativa na análise de força do membro posterior direito entre os grupos ($F= 1,921$; $p= 0,0542$). Diferença significativa foi observado na comparação entre as avaliações apenas no grupo lesão ($F= 12,910$; $p= 0,018$; Figura 4)

Tabela 4 – Valores em gramas da preensão plantar dos grupos avaliados, em média e desvio-padrão, para os diferentes momentos de avaliação (AV1: pré-lesão; AV2: 24h pós-lesão e AV3: 12º dia pós-lesão). C: controle; L: lesão; LLLT: lesão tratado com laser convencional; LP: lesão tratado com laserpuntura.

Grupos	AV1	AV2	AV3
C	24,1 ± 12,4	32,8 ± 9,3	25,6 ± 13,9
L	14,8 ± 3,2	23,3 ± 5,8 [†]	29,0 ± 10,2 [†]
LLLT	19,0 ± 5,0	22,4 ± 10,5	24,5 ± 9,4
LP	22,2 ± 7,9	19,7 ± 7,4	33,1 ± 13,3

[†] difere de AV1; $p=0,018$

O teste *post hoc* indicou diferença significativa entre a AV1 vs AV2 ($p= 0,036$; $\Delta= 57,43\%$; grande *effect size*), vs AV3 ($p= 0,025$; $\Delta= 95,95\%$; grande *effect size*) no grupo lesão. Não houve diferença significativa entre as avaliações para os grupos LLLT, LP e controle. Destaca-se o efeito moderado na AV3 entre os grupos LP e LLLT (Tabela 5).

Tabela 5 - Valores de Cohen's *d effect size* entre as condições experimentais para a variável força

	Controle vs. Lesão	Controle vs. LP	Controle vs. LLLT	Lesão vs. LP	Lesão vs. LLLT	LP vs. LLLT
AV1	1,02 (moderado)	0,18 (trivial)	0,53 (pequeno)	1,22 (grande)	1,00 (moderado)	0,48 (pequeno)
AV2	1,22 (moderado)	1,55 (grande)	1,04 (moderado)	0,54 (pequeno)	0,10 (trivial)	0,29 (pequeno)
AV3	0,27 (pequeno)	0,55 (pequeno)	0,09 (trivial)	0,34 (pequeno)	0,45 (pequeno)	0,75 (moderado)

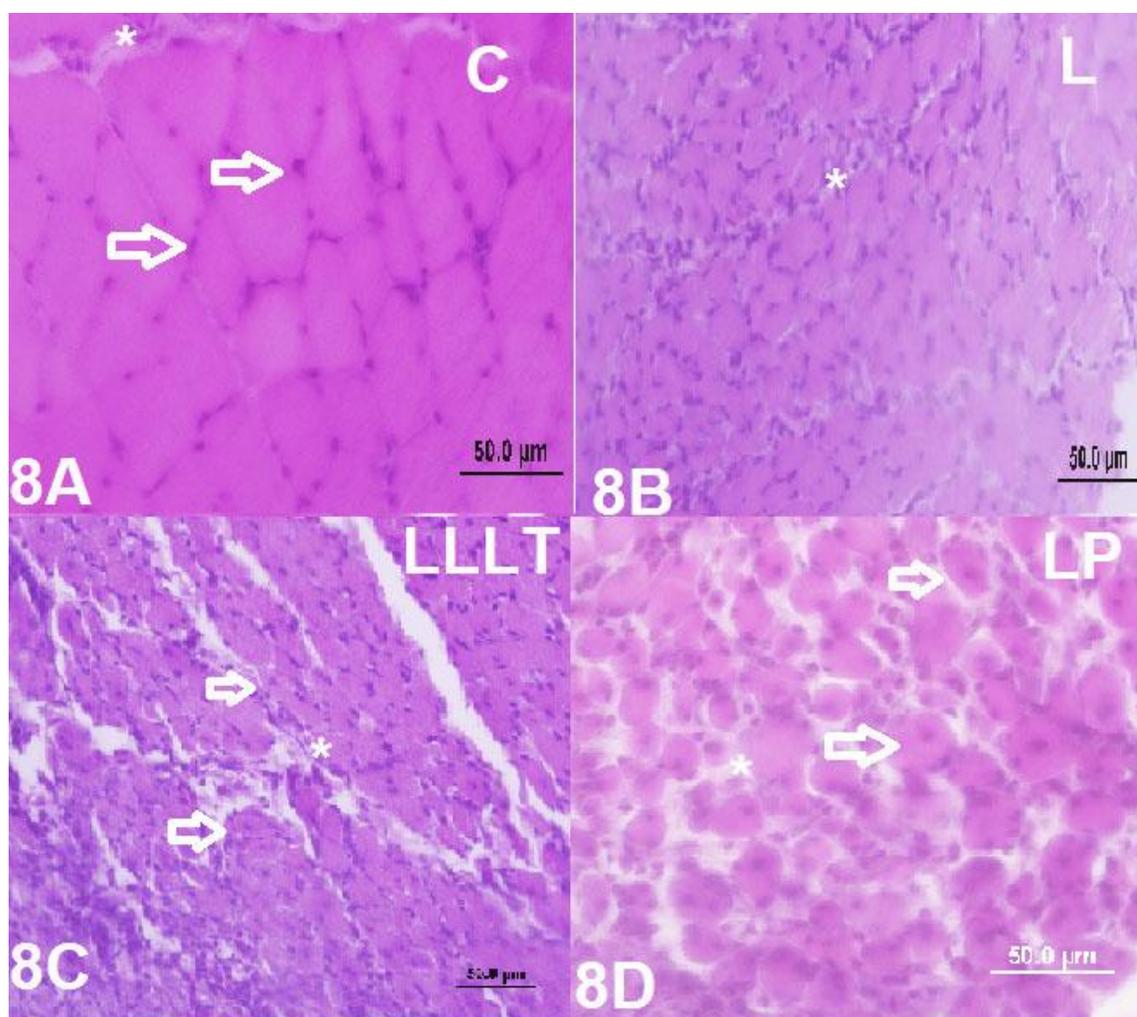
AV1: pré-lesão; AV2: 24h pós-lesão e AV3: 12º dia pós-lesão. LLLT: lesão tratado com laser convencional; LP: lesão tratado com laserpuntura.

4.3 Análise morfométrica

Os cortes transversais do músculo tibial anterior do grupo C apresentaram fibras com seus núcleos periféricos, fibras com formato poligonal, com núcleos periféricos, tecido conjuntivo envolvendo as fibras musculares (endomísio) e demais estruturas preservadas (figura 8A), já os grupos L, LLLT e LP demonstraram presença de infiltrado inflamatório, aumento de tecido conjuntivo, presença de fibras musculares

com núcleo centralizado e variação de tamanho das fibras, indicando o processo de regeneração muscular (8B, C e D).

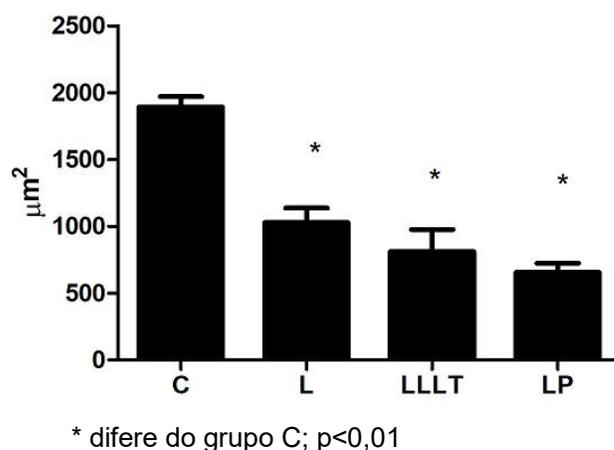
Figura 8: Fotomicrografias dos músculos tibial anterior dos ratos Wistar, corte transversal, coloração Hematoxilina e Eosina. Em **A**, grupo controle (C), com fibras musculares com formato poligonal, núcleos de posição periférica (seta branca), tecido conjuntivo (*): Em **B**: grupo lesão (L), onde se destaca fibras musculares com perda do formato poligonal, presença de infiltrado inflamatório e núcleos centralizados. Em **C**: grupo com lesão tratado com laserterapia convencional (LLLLT) com fibras musculares com núcleos centrais (seta branca), tecido conjuntivo (*) com perda do arranjo característico. LP: grupo lesão tratado com laserpuntura, fibras musculares com perda do formato poligonal e presença de núcleos centrais (seta branca). Barra: 50 μ m.



4.4 Quantificação da Área de Secção Transversa (AST)

Após 13 dias da criolesão, os grupos L, LLLT e LP apresentaram redução significativa ($F=6,0036$; $p=0,0001$) da AST dos músculos quando comparados ao grupo controle. Nenhuma das intervenções propostas (LLLT ou LP) se mostrou eficaz para aumentar a AST no período estudado (Figura 9).

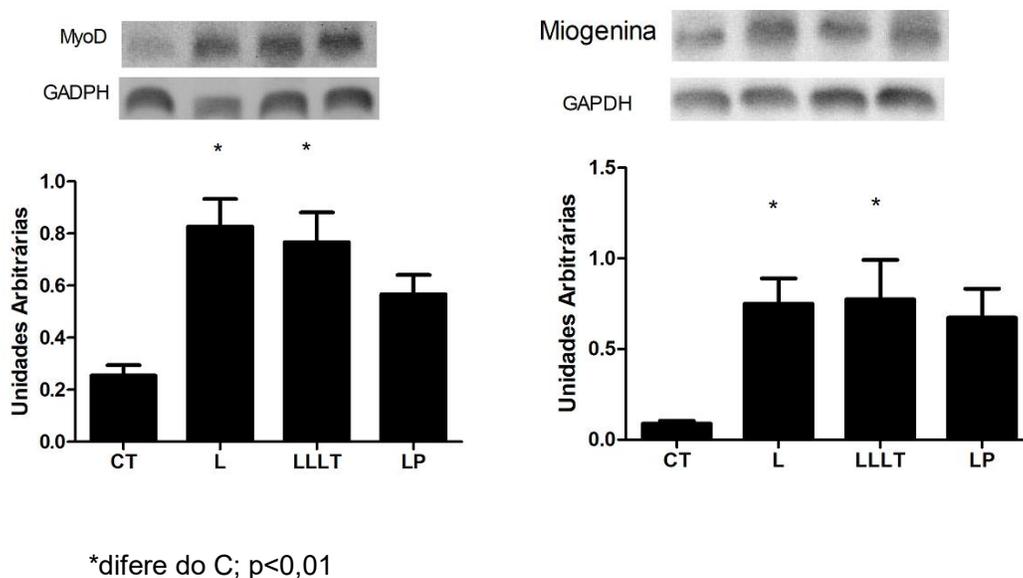
Figura 9: Média e desvio padrão área de secção transversa (AST) em μm^2 do músculo tibial anterior direito dos animais avaliados. C: controle; L: lesão sem tratamento; LLLT: lesão tratado com laser convencional e LP: lesão tratado com laserpuntura.



4.5 Proteínas relacionadas a regeneração da fibra muscular

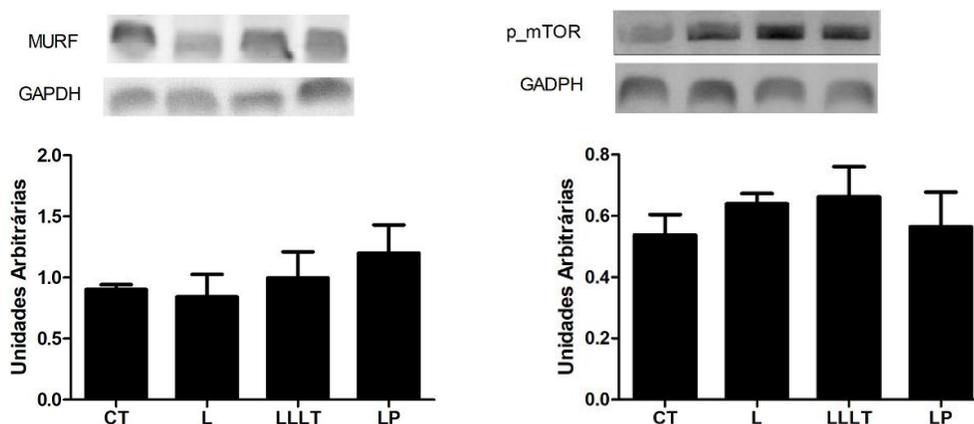
O conteúdo da proteína MyoD (marcador de ativação e proliferação das células satélites) nos grupos L e LLLT foi maior quando comparado ao C ($F=8,555$; $p=0,0026$), o mesmo resultado foi observado para a proteína miogenina (marcador da diferenciação das células satélites), ou seja, aumento nos grupos L e LLLT quando comparado ao C ($F=4,542$; $p=0,0239$) (Figura 10).

Figura 10: Média e desvio padrão MyoD e Miogenina do músculo tibial anterior dos animais avaliados. C: controle; L: lesão sem tratamento; LLLT: lesão tratado com laser convencional e LP: lesão tratado com laserpuntura.



As proteínas Murf (F=0,7338; p=0,5516) e mTOR fosforilada (F=0,5080; p=0,6841), que indicam atrofia e hipertrofia muscular, respectivamente, não apresentaram diferenças entre os grupos (Figura 11).

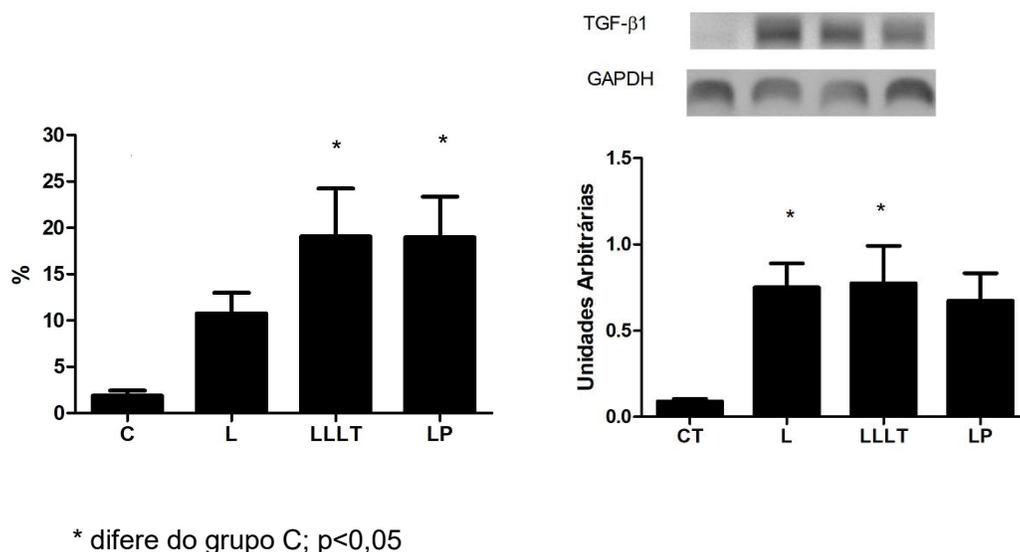
Figura 11: Média e desvio padrão para Murf e p-mTOR do músculo tibial anterior dos animais avaliados. C: controle; L: lesão sem tratamento; LLLT: lesão tratado com laser convencional e LP: lesão tratado com laserpuntura.



4.6 Quantificação da porcentagem de área de Tecido Conjuntivo (%ATC) e conteúdo de TFG- β 1

Na análise da área de tecido conjuntivo os grupos que receberam algum tipo de intervenção (LLLT e LP) apresentaram aumento significativo da quantidade de tecido conjuntivo quando comparados ao C ($F=4,2423$; $p=0,0152$; Figura 12A). A citocina TGF- β 1 que é um indicativo de fibrose apresentou maior conteúdo nos grupos L e LLLT quando comparado ao C ($F=4,542$; $p=0,0239$), como observado na figura 12B.

Figura 12: Média e desvio padrão da porcentagem da densidade de área de tecido conjuntivo do músculo tibial anterior lesado dos animais avaliados. Média e desvio padrão do conteúdo da citocina TGF β 1 dos animais avaliados. C: controle; L: lesão sem tratamento; LLLT: lesão tratado com laser convencional e LP: lesão tratado com laserpuntura



5 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo indicam conteúdo similar das proteínas MyoD, miogenina e da citocina TGF- β 1 entre os grupos controle e lesão tratado com laserpuntura, sugerindo melhor resposta fisiológica do grupo LP quando comparado aos grupos lesão e lesão tratado com laser convencional, entretanto não foi observado diferença entre os grupos lesados nas análises funcionais e morfológicas. Portanto, a hipótese do estudo não foi comprovada, pois a aplicação do *laser* de 830 nm, com potência de 30 mW e energia total de 1,8 J aplicado por 10 sessões, não acelerou o processo de regeneração após criolesão no músculo tibial anterior de ratos.

Os dados do presente estudo não são conclusivos para afirmar que a aplicação do *laser* em acupontos favorecem o processo de regeneração quando comparado a aplicação em pontos sobre a lesão (terapia convencional).

A criolesão realizada neste estudo teve por objetivo induzir a um processo inflamatório agudo semelhante ao que ocorre com humanos. É uma técnica utilizada em músculos superficiais, como o tibial anterior (ASSIS et al., 2013; MESQUITA-FERRARI et al., 2011; PERTILLE et al., 2017), e gera um comprometimento de 24% a 38% das fibras musculares (ADABBO et al., 2016; ASSIS et al., 2013).

O período de 13 dias pós-lesão indica a fase de reparo (LI; CHEN; KIRSNER, 2007), que pode durar de uma a três semanas, onde ocorre a proliferação e diferenciação das células miogênicas, de fibroblastos e miofibroblastos, produção de fibronectina, colágeno e outros componentes da matriz extracelular (JARVINEN et al., 2000; KANNUS et al., 2003).

O trauma ou a lesão inflamatória podem gerar a hiperalgesia muscular, sendo que os nociceptores podem ser ativados por substâncias endógenas e/ou estímulos mecânicos (GRAVEN-NIELSEN; MENSE, 2001). O estímulo doloroso é transmitido da periferia para a medula espinhal e para o tronco cerebral por fibras pequenas mielinizadas, localizada e discriminada por sua duração proporcional a aplicação do estímulo doloroso (AGGUGIA, 2003).

O laser de baixa intensidade é um recurso muito utilizado para reparo tecidual promovendo redução dos níveis de TNF- α , redução de edema, bem como de diminuição de células inflamatórias, o que levaria a redução da dor por melhora do processo inflamatório (BORTONE et al., 2008; ENWEMEKA et al., 2004; GUR et al., 2003; LOPES-MARTINS, 2005). O trabalho de Assis et al, 2013 observou uma melhora na regeneração do músculo esquelético reduzindo a área lesionada, aumentando a MyoD, expressão gênica de miogenina e VEGF, simultaneamente mRNA de TGF- β e deposição de colágeno tipo I no tecido lesionado.

No presente estudo a análise do limiar de retirada do membro lesado, que indica a resposta de nocicepção do animal, não apresentou diferença significativa entre os grupos nas três avaliações. Foi observado aumento da sensibilidade para essa resposta, ou seja, foi necessário menor carga para desencadear a resposta de retirada, na AV2 (24 horas pós-lesão) nos grupos L e LLLT. Entretanto, após as sessões de tratamento com o *laser* (AV3), não houve diferença entre os grupos. Tal fato pode ser explicado pelo período de análise da AV3 (12º dia pós-lesão), pois o processo inflamatório é característico até 7º dia pós-lesão (LI; CHEN; KIRSNER, 2007).

Brunelli et al. (2014) usando o laser ArGaAl, com 780 nanômetros, densidades de energia de 10 J/cm^2 (20 mW, irradiação por 20 s, energia total 0,4 J) e 50 J/cm^2 (40 mW, irradiação 50 s, energia total de 2 J), por 7, 14 e 21 dias após a criolesão do tibial anterior, encontraram diminuição no infiltrado inflamatório nos grupos tratados quando comparado ao grupo lesão sem tratamento apenas no 7º dia pós-lesão.

Outra técnica usada no tratamento de lesões musculares é a acupuntura utilizada para alívio da dor em geral. A metanálise realizada por MacPherson et al. (2014) avaliou 29 estudos clínicos, envolvendo aproximadamente 18.000 pacientes com osteoartrite, dores de cabeça crônicas, dores na coluna vertebral, entre outros, demonstrou melhor efeito analgésico através da acupuntura em relação ao placebo ou sem tratamento. Cao et al. (2012) em outra metanálise incluindo 14 estudos com aproximadamente 4.000 indivíduos com osteoartrite no joelho mostraram que a acupuntura proveu melhora no alívio da dor em relação ao grupo placebo ou tratamentos convencionais.

Na laserpuntura utiliza-se os pontos E36 pela sua função anti-inflamatória e antinoceptiva (KIM et al., 2007; XIA et al., 2014). O estudo de Zhang et al. (2012) verificou que o estímulo ao ponto Zusanli (E36) em camundongos reduziu significativamente a dor crônica na pata ipsilateral e aumentou as concentrações extracelulares de ATP e adenosina nos tecidos adjacentes.

Um estudo realizado com laser de 830nm e dose de 4 J/cm^2 em pontos de acupuntura, especialmente o E36, observou a redução do edema induzido por carragenina e dos mediadores inflamatórios como bradicinina e histamina (ERTHAL et al., 2016).

Outros recursos, como a eletroterapia, também são utilizados nos acupontos. Park et al. (2013) apontaram o efeito terapêutico anti-inflamatório da eletroacupuntura no ponto E36 em ratos com artrite induzida. Em outro estudo de tratamento de dor em modelo de inflamação em animais, o uso de eletroacupuntura aumentou significativamente o limiar mecânico avaliado com o filamento de Von Frey, além de diminuir o fator de necrose tumoral α (TNF α) e interleucinas no tecido inflamado (SU et al., 2012).

Em relação a força de preensão, no presente estudo não houve diferença significativa entre os grupos nas três avaliações, apenas na comparação entre as avaliações no grupo lesão, com aumento da força. Destaca-se na AV3 do grupo LP aumento da força de preensão com efeito moderado em comparação ao grupo LLLT.

A metodologia de análise da força de preensão foi adaptada para o membro posterior do animal, como utilizado por Karvat et al. (2018), que analisaram a força de preensão do músculo tibial anterior em modelo de compressão do nervo isquiático de ratos, observando redução da força no 3º dia pós-operatório e ausência de estímulo no 8º e no 15º dia pós-operatório.

No presente estudo, a extensão da destruição das fibras musculares provocada pela criolesão gerou uma lesão grau I, pois não houve redução da força de preensão do membro lesado. Segundo Jarvinen et al. (2000) na lesão grau I há mínima perda da força e do movimento.

A laserterapia também é aplicada para melhora da *performance* muscular. O estudo de Leal Júnior et al. (2010), que avaliou a irradiação a laser com 904 nm do músculo tibial anterior de ratos com diferentes energias, verificou melhora no pico de

força e trabalho durante contrações tetânicas induzidas eletricamente e, assim, atrasou o desenvolvimento de fadiga muscular esquelética, além da redução do aumento esperado nos níveis de lactato sanguíneo e atividade da CK. Os melhores efeitos para a maioria dos desfechos foi observada com uma dose de 1,0 J.

Nampo et al. (2016) em metanálise com o objetivo de avaliar a eficácia da fototerapia de baixa intensidade no pré-exercício em humanos, considerando o aumento da capacidade de exercício e desempenho muscular, verificaram que os parâmetros de saída de energia, energia e dose variaram amplamente. A potência varia de 10 a 200 mW por diodo ou de 50 a 1390 mW por ponto irradiado. A energia fornecida variou de 12 a 360 J por membro e a dose variou de 3,2 J / cm² a 2500 J /cm²

Estudo realizado com jovens sedentários analisou o efeito do *laser* na fadiga e potência muscular durante o salto vertical. Os parâmetros de irradiação foram comprimento de onda 660nm; potência de saída 30mW; energia irradiada por ponto 0,24 J; densidade de energia de 4 J/cm²; tempo de irradiação de 8 segundos; sendo oito pontos irradiados no tríceps sural; energia total irradiada de 1,92 J; por seis ou 10 sessões. Os grupos irradiados não apresentaram melhora comparados ao controle. A baixa dose de energia aplicada no estudo, de apenas 1,92 J por membro, possivelmente explica a ausência de melhora nos resultados tanto para a fadiga quanto para a potência em grandes áreas de irradiação (KAKIHATA et al., 2015). Segundo Reis et al. (2014) as divergências entre os estudos ocorrem devido o emprego de diferentes parâmetros na terapia por laser.

A análise morfométrica dos cortes transversais do músculo tibial anterior demonstrou nos grupos que sofreram criolesão (L,LLLT,LP) infiltrado inflamatório, aumento de tecido conjuntivo, fibras com núcleo centralizado e variação do tamanho das mesmas, o que é indicativo do processo de regeneração muscular.

A área de secção transversa (AST) das fibras musculares em todos os grupos lesados apresentou redução significativa em relação ao controle, indicando que o músculo estava em fase de reparo / regeneração. Nenhuma das terapias foi capaz de aumentar este parâmetro no período de tratamento.

Pertille, Macedo e Oliveira (2012) avaliaram o processo de regeneração muscular em ratos idosos após contusão no músculo tibial anterior e tratamento com *laser* Arserneto de gálio-alumínio (GaAIs), comprimento de onda de 830 nm, emissão contínua, potência de saída de 30 mW, energia total de 1 J e observaram que após 21 dias da lesão a AST das fibras musculares retornaram aos valores do grupo controle. O período de 21 dias é caracterizado pela fase de remodelação e amadurecimento das fibras musculares regeneradas (LI; CHEN; KIRSNER, 2007), onde é possível verificar o aumento da AST.

Sobre as proteínas relacionadas ao processo de regeneração muscular, a expressão de MyoD é mantida durante a proliferação das células satélites e diferenciação precoce em mioblastos. O pico de diferenciação dos mioblastos é caracterizado pela expressão de miogenina (FÜCHTBAUER; WESTPHAL, 1992; GROUNDS et al., 1992; YABLONKA-REUVENI; RIVERA, 1994; YABLONKA-REUVENI et al., 1999).

Van Der Poel et al. (2011) avaliaram o processo de regeneração muscular após aplicação de bupivacaina em animais jovens e adultos. Os resultados mostraram aumento da expressão de MyoD após 72 horas da lesão e da miogenina após sete dias da lesão. Já o estudo de Fuchtbauer et al. (1992) revelou a presença de MyoD e miogenina em fibras musculares regeneradas por até duas semanas.

No presente estudo a proteína MyoD apresentou maior conteúdo grupos L e LLLT em relação ao controle e o mesmo resultado foi observado para a miogenina, o que sugere que após 13 dias da lesão, esses grupos ainda mantinham alta taxa de diferenciação dos mioblastos. O grupo LP apresentou valores similares ao controle para as duas proteínas. Provavelmente o laser acelera o quadro inflamatório e diminui o tempo de exposição aos efeitos nocivos dessa fase, como a produção de espécies reativas de oxigênio.

Não houve diferença entre os grupos no conteúdo das proteínas que indicam atrofia ou hipertrofia muscular, observado na análise das proteínas Murf e mTOR fosforilada. A MuRF-1 é uma enzima ubiquitina ligase E3 reconhecida como marcador do processo de atrofia muscular em diversos modelos experimentais (BODINE et al., 2001). O resultado encontrado no presente estudo sobre a Murf indica que o processo de regeneração muscular ocorreu naturalmente em todos os grupos e que as intervenções não geraram prejuízo ao processo.

A proteína quinase mTOR coordena o crescimento celular e desempenha um papel fundamental na fisiologia celular (SAXTON; SABATINI, 2017). A subunidade mTORC1 promove a síntese de proteínas (catabolismo) em grande parte através da fosforilação da p70S6 quinase 1 (S6K1) e proteína de ligação eIF4E (HOLZ et al.,

2005). No presente estudo o conteúdo da mTOR fosforilada foi similar entre os grupos, indicando que no 13º dia pós-lesão a via da mTOR não interferiu na formação das novas fibras musculares.

Em relação a análise da porcentagem de área do tecido conjuntivo houve aumento significativo nos grupos LLLT e LP, em contrapartida a citocina TGF β 1, indicativa de fibrose, apresentou maior conteúdo apenas nos grupos L e LLLT. No grupo laserpuntura a TGF- β 1 apresentou conteúdo similar ao controle.

Mesquita-Ferrari et al. (2011) analisaram o efeito da LLLT na expressão de TGF- β após contusão no músculo tibial anterior de ratos e tratamento com laser 660 nm (20 mW, 5 J/cm², 10 segundos por sessão, três vezes por semana, durante 7 e 14 dias) e observaram que a LLLT modula a curto prazo a expressão de citocinas, com a redução TGF- β .

A citocina TGF β 1 foi avaliada nos dias 1, 2, 3, 7, 14, 21 e 28 no músculo gastrocnêmio de ratas após contusão e tratamento com LLLT GaAIs, 635 nm, 17,5 mW/cm², 20 minutos, por 10 dias, sendo observado redução desta citocina no 3º e 28º dia, e aumento do conteúdo no 7º e 14º dias, mostrando que o LLLT modulou o TGF β 1 durante o experimento (LUO et al, 2013).

O tecido conjuntivo que forma a matriz extracelular tem papel importante na geração e transmissão de força no músculo e é um fator chave nos sinais, sintomas e prognóstico de lesões musculares (KJAER et al., 2006). Portanto, quanto mais a matriz extracelular é prejudicada numa lesão muscular, pior será o prognóstico (BALIUS et al., 2009; BRUKNER; CONNEL, 2016; COMIN et al., 2013). Os resultados do grupo LP no presente estudo sugerem que a aplicação do *laser* nos acupontos

pode favorecer a modulação da citocina TGF- β 1 e reduzir a possibilidade de formação de fibrose no local da lesão.

Tal fato apresenta importância clínica, pois a formação de fibrose no local da lesão muscular aumenta a possibilidade de recidiva (*re-injury*). A lesão recorrente é um preditor importante que define um tempo maior de recuperação quando comparado com lesão que acontecem pela primeira vez (EKSTRAND; HAGGLUND; WALDEN , 2011; EKSTRAND et al., 2012; LEE; MITCHELL; HEALY, 2012). Portanto, a *re-injury* deve ser um parâmetro incluído na classificação das lesões musculares (VALLE et al., 2017).

O presente estudo apresenta como limitações a energia aplicada pode não ter sido suficiente para mostrar efeitos benéficos para a fase inicial do processo de regeneração; a ausência de avaliações em períodos diferentes como 3 dias (fase inflamatória) e 21 dias (fase de maturação das fibras regeneradas), além da análise de marcadores inflamatórios como TNF- α e interleucinas. Os resultados encontrados neste estudo podem servir de base para estudos futuros, explorados de forma a comprovar se uma das técnicas pode ser mais eficaz no tratamento da lesão muscular.

6 CONCLUSÃO

Conclui-se que a aplicação do *laser* nos parâmetros propostos no presente estudo não gerou efeitos sobre o processo de regeneração após criolesão no músculo tibial anterior de ratos, em nenhuma das intervenções. A aplicação do *laser* nos acupontos E36 e BP6 resultou na melhor resposta das proteínas MyoD e miogenina e da citocina TGF- β 1, que apresentaram conteúdo similar ao controle, sugerindo assim o equilíbrio no processo de regeneração com a formação de novas fibras musculares e a reorganização da matriz extracelular.

As análises funcionais e morfológicas propostas não demonstraram a eficácia da aplicação do *laser* em acupontos ou em pontos sobre o ventre muscular (terapia convencional) no período estipulado.

REFERÊNCIAS*

ADABBO, M.; PAOLILLO, F.R.; BOSSINI, P.S.; RODRIGUES, N.C.; BAGNATO, V.S.; PARIZOTTO, N.A. Effects of Low-Level Laser Therapy Applied Before Treadmill Training on Recovery of Injured Skeletal Muscle in Wistar Rats. **Photomed Laser Surg**, v.34, n.5, p.187-93, 2016.

AGUGGIA M. Neurophysiology of pain. **Neurol Sci.**, v.24, suppl 2, p. S57–S60, 2003.

AHN C.A., et al. Electrical impedance along connective tissue planes associated with acupuncture meridians. **BMC Complement. Altern Med.** v.9, p.5-10, 2005.

ALBUQUERQUE-PONTES, G. M., et al. Effect of pre-irradiation with different doses, wavelengths, and application intervals of low-level laser therapy on cytochrome c oxidase activity in intact skeletal muscle of rats. **Lasers Med Sci**, v. 30, n. 1, p. 59-66. 2015.

ALMEIDA P.S.M., et al. Incidência de lesão musculoesquelética em jogadores de futebol. **Rev. Bras Med Esporte**, v.19, n.2, mar/abr,2013.

ALVES A.N, et al. Effects of low-level laser therapy on skeletal muscle repair: a systematic review. **Am J Phys Med Rehabil.**, v.93, p.1073-1085, 2014.

ASSIS L. et al. Low-level laser therapy (808nm) contributes to muscle regeneration and prevents fibrosis in rat tibialis anterior muscle after cryolesion. **Lasers Med Sci.** v.28, n.3, p.947-955, 2012.

BALIUS, R., et al. Central aponeurosis tears of the rectus femoris: practical sonographic prognosis. **Br J Sports Med.** v.43, n.11, p.818–24, 2009.

BAROLET, D. Light-Emitting Diodes (LEDs) in Dermatology. **Semin Cutan Med Surg**, v.27, p.227-238, 2008.

BARROSO,G.C; THIELE,E.S. Lesão muscular nos atletas. **Rev Bras Ortop.** v.46, n.4, p.354-58, 2011.

BERTELLI J.A., MIRRA J.C. The grasping test: a simple behavioral method assessment of peripheral nerve regeneration the rat. **J Neurosci Methods.** v.58, p.151-5, 1995.

BODINE, S.C., et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. **Science**, v.294, n.5547, p.1704-8, 2001.

* Baseadas na norma NBR 6023, de 2002, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

BORATO, E. OLIVEIRA, J.J. CIENA, A.P, BERTOLINI, G.R.F. Avaliação imediata da dor e edema em lesão muscular induzida por formalina e tratada por laser 808nm. **Rev.Bras.Med. Esporte.** v.14, n.5, p.446-449, 2008.

BORTONE, F., et al. Low level laser therapy modulates kinin receptors mRNA expression in the subplantar muscle of rat paw subjected to carrageenan- induced inflammation. **Int Immunopharmacol**, v.8, p.206-10, 2008.

BOSI, P.L., et al. Metformina minimiza as alterações morfométricas no músculo sóleo de ratos submetidos à imobilização articular. **Rev. Bras Med Esporte**, v.14, n.5, p. 436-439, set/out, 2008

BRACK, A.S.; RANDO, T.A. Intrinsic Changes and Extrinsic Influences of Myogenic Stem Cell Function During Aging. **Stem Cell Reviews**, v.3, n.3, p.226-37, 2007.

BRITO, M. K. M. et al. Dimensões geométricas das fibras do músculo sóleo de ratos exercitados em esteira rolante: a importância da análise por meio de imagens digitalizadas. **Rev. Bras. Med. Esporte**, v. 12, n. 2, p. 103-107, 2006.

BRUKNER, P.; CONNELL, D. 'Serious thigh muscle strains': beware the intramuscular tendon which plays an important role in difficult hamstring and quadriceps muscle strains. **Br J Sports Med.**v.50, n.4, p.205–8, 2016.

BRUNELLI, R.M., et al. The effects of 780-nm low-level laser therapy on muscle healing process after cryolesion. **Lasers Med Sci.**, v.29, p.91–96, 2014.

CABRERA, E.B.A; PERÓN; J.M.R., ALFONSO, L.E. Laser Acupuntura con Hélio-Neón en el tratamiento de pacientes traumatizados. **Rev. Cubana Med. Milit.** v. 31, n. 1, p. 5-12, 2002.

CAO, L.; ZHANG, X.L.; GAO, Y.S.; JIANG, Y. Needle acupuncture for osteoarthritis of the knee. A systematic review and updated meta-analysis. **Saudi Med**, v.33, p.526–32, 2012.

CHAE, Y. et al. Protein array analysis of cytokine levels on the action of acupuncture in carrageenan-induced inflammation. **Neurological Research**, v.29, p.555-558,2007.

CHARGE, S.B.P.; RUDNICKI, M.A. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. **Physiol.Rev.** v.84, p.209-238, 2004.

CHEN, A.C. et al. Low level laser therapy activates NF-KB via generation of reactive oxygen species in mouse embryonic fibroblasts. **Plos One**, 22,453,2011.

CHEN, G. et al. Nitric oxide synthase modulates CFA-induced thermal hyperalgesia through cytokine regulation in mice. **Mol Pain**, v. 6, p .1-13, 2007.

CHO, Z.H., et al. neural substrates, experimental evidences and functional hypothesis of acupuncture mechanisms. **Acta Neurol Scand**, 113:370-377,2006.

CIRILO, H. Fundamentos da Medicina Tradicional Chinesa. 2001. Disponível em: <https://www.vivernatural.com.br/saude-natural/fundamentos-da-medicina-tradicional-chinesa/> Acesso em 05/03/2017.

COHEN, J. Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences. **New York, NY: Routledge Academic**, 1988.

COMIN, J., et al. Return to competitive play after hamstring injuries involving disruption of the central tendon. **Am J Sports Med.** v.41, n.1, p.111–5, 2013.

COUTO, L.I.M., et al. Efeitos da suplementação nutricional com L-arginina no reparo de lesões por estiramento muscular. Estudo experimental em ratos. **Rev Bras Ortop.** v.50, n.4, p.455-461, 2015.

COSTA, F.P.; SILVA, M.P.A.; MELO, E.L.V.S.; COSTA, M.S.; ZAMUNER, S.R. Protective effect of low-level laser therapy (LLLT) on acute zymosan-induced arthritis. **Lasers Med Sci.**, v.29, n.2, p.757-63, 2014

CUNHA, T.M., et al. An eletronic pressure-meter nociception paw test for mice. **Braz. J, Med. Biol. Res.**, v.37, n.3, p.401-7, 2004.

DAWOOD, M.S.; AL-SALIHI, A.R.; QASIM, A.W. Laser therapy of muscle injuries. **Lasers Med Sci.** v.28, p.732-742, 2013.

DE BRITO VIEIRA, W.H., et al. Use of low-level laser therapy (808 nm) to muscle fatigue resistance: a randomized double-blind crossover trial. **Photomed Laser Surg.**, v.32, n.12, p.678-85, 2014.

DELANEY, K.; KASPRZYCKA, P.; CIEMERYCH, M.A.; ZIMOWSKA, M. The role of TGF- β 1 during skeletal muscle regeneration. **Cell Biol Int.**, v.41, n.7, p.706-715, 2017.

DRAEHMPAEHL, D.; ZOHMANN, A. **Acupuntura no cão e no gato: Princípios Básicos e prática científica.** São Paulo: Roca, 1997.

DUEWEKE, J.J.; AWAN, T.M.; MENDIAS, C.L. Regeneration of skeletal muscle following eccentric injury. **J Sport Rehabil.**, v.26, n.2, p.171-9, 2017.

EKSTRAND, J.; HAGGLUND, M.; WALDEN, M. Epidemiology of muscle injuries in professional football (soccer). **Am J Sports Med.** v.39, n.6, p.1226–32, 2011.

EKSTRAND, J., et al. Hamstring muscle injuries in professional football: the correlation of MRI findings with return to play. **Br J Sports Med.** v.46, n.2, p.112–7, 2012.

ENWEMEKA, C.S., et al. The efficacy of low-power lasers in tissue repair and pain control: a meta-analysis study. **Photomed Laser Surg**, v.22, p.323-9, 2004.

ERNST, E. Acupuncture: a critical analysis. **J Intern Med**, v.259, n.2, p.125–137, 2006.

ERTHAL, V.; MARIA-FERREIRA, D.; WERNER, M.F.; BAGGIO, C.H.; NOHAMA, P. Antiinflammatory effect of laser acupuncture in ST36 (Zusanli) acupoint in mouse paw edema. **Lasers Med Sci.**, v. 31, n.2, p. 315-22, 2016.

FABER, P.L.; TIMO-IARIA, C. Acupuntura e Sistema Nervoso. **J. Bras. Med.**, v.67, n.5-6, p.125-131, 1994.

FARIVAR, S.; MALEKSHAHABI, T.; SHIARI, R. Biological Effects of Low Level Laser Therapy. **J Lasers Med Sci**, v. 5, n. 2, p. 58–62, 2014

FELISMINO, A.S., et al. Effect of low-level laser therapy (808 nm) on markers of muscle damage: a randomized double-blind placebo-controlled trial. **Lasers Med Sci.** v.29, p.933-938, 2014.

FERNANDES, K.P.S, et al. Effect of photobiomodulation on expression of IL-1 β in skeletal muscle following acute injury. **Lasers Med Sci.** v.28, n.3, p.1043-6, 2014.

FERNANDES, L.T. PEDRINELLI, A., HERNANDEZ, A.J. Muscle injury physiopathology, diagnosis, treatment and clinical presentation. **Revista Brasileira de Ortopedia.** v.46, n.3, p.247,2011.

FERRARI, R.J.; PICCHI, L.D.; BOTELHO, A.P.; MINAMOTO, V. Processo de regeneração na lesão muscular: uma revisão. **Fisiot Mov.**, v.18, n. 2, p. 63 – 71, 2005.

FÜCHTBAUER, E.M.; WESTPHAL, H. MyoD and myogenin are coexpressed in regenerating skeletal muscle of the mouse. **Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists**, v.193, n.1, p.34-39, 1992.

FUKUSHIMA, K., et al. The use of an antifibrosis agent to improve muscle recovery after laceration. **Am JSports Med.**, v.29, p. 394-402, 2001.

FULLERTON, J.N.; GILROY, D.W. Resolution of inflammation a new therapeutic frontier. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.15, n., p.551-567,2016.

GARCEZ, A.S.; RIBEIRO,M.S.; NUÑEZ, S.C. **Laser de baixa potencia : princípios básicos e aplicações clínicas na odontologia.** Rio de Janeiro: Elsevier,2012.

GIGANTE, A. et al. The effects of growth factors on skeletal muscle lesions. **Joints**, v.4,n.1, p.180-186, 2014.

GIROTO, N.; HESPANHOL JUNIOR, L.C.; GOMES, M.R.; LOPES, A.D. Incidence and risk factors of injuries in Brazilian elite handball players: A prospective cohort study. **Scand J Med Sci Sports**, v.27, n.2, p.195-202, 2017.

GRAVEN-NIELSEN, T.; MENSE, S. The peripheral apparatus of muscle pain: evidence from animal and human studies. **Clin J Pain**, v. 17, n. 1, p. 2-10, Mar 2001.

GROUNDS, M.D.; GARRETT, K.L.; LAI, M.C.; WRIGHT, W.E.; BEILHARZ, M.W. Identification of skeletal muscle precursor cells in vivo by use of MyoD1 and myogenin probes. **Cell Tissue Res.**, v.267, n.1, p.99-104, 1992.

GUERRA, F.D., et al. LLLT improves tendon healing through increase of MMP activity and collagen synthesis. **Lasers Med Sci**, 28(5):1281-8,2013.

GUMUCIO, J.P.; SUGG, K.B.; MENDIAS, C.L. TGF- β superfamily signaling in muscle and tendon adaptation to resistance exercise. **Exerc Sport Sci Rev.**, v.43, n.2, p.93-9, 2015.

GUR, A., et al. Efficacy of different therapy regimes of low-power laser in painful osteoarthritis of the knee: a double-blind and randomized-controlled trial. **Lasers Surg Med**; v.33, p.330-8, 2003.

HAGGLUND, M.; WALDEN, M.; EKSTRAND, J. Injuries among male and female elite football players. **Scand J Med Sci Sports**, v.19, p.819–27, 2009.

HAWKE, T.J.; GARRY, D.J. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. **J Appl Physiol**, v.91, p.534–551, 2001.

HILL, M.; WERNIG, A.; GOLDSPIK, G. Muscle satellite (stem) cell activation during local tissue injury and repair. **J Anat.**, v.203, n.1, p.89-99,2003.

HOLZ, M.K.; BALLIF, B.A.; GYGI, S.P.; BLENIS, J. mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events. **Cell**, v.123, n.4, p.569-80, 2005.

HOPKINS, G. W., MARSHALL, W. S., BATTERHAM, M. A., HANIN J. Progressive Statistics for Studies in Sports Medicine and Exercise Science. **Med Scien Sports Exercise**. v. 41, n. 1, p. 3-12, 2009.

HUANG, Y.Y.; SHARMA, S.K.; CARROLL, J. D.; HAMBLIN, M. R Biphasic dose response in low level light therapy-an update. **Dose Response**, 9(4),2011.

HUANG, Y. Y.; CHEN, A. C.; CARROLL, J. D.; HAMBLIN, M. R. Biphasic dose response in low level light therapy. **Dose Response**, v. 7, n. 4, p. 358-83, 2009.

HUARD, J.; LI, Y, FU, F.H. Muscle injuries and repair. Current Trends in Research. **J. Bone Joint Surg**. v. 84, n.5, p.822-832, 2002.

HUTSCHER M., et al. Immediate effects of acupuncture in strenght performance: a randomized controlled crossover Trial . **Eur J Appl Physiol**, 110, 353-358,2010.

IKEDA, H.; ASAI, T. Robust changes of afferent-induced excitation in the rat spinal dorsal horn after conditioning high frequency stimulation. **J Neurophysiol**, 83,2412-2420,2000.

JAKUBIEC-PUKA, A., et al. Contents of myosin heavy chains in denervated slow and fast rat leg muscles. **Comp Biochem Physiol**. v.122B, p.355-362, 1999.

JARVINEN, T.A.H, et al. Muscle strain injuries. **Curr Op Rheumatol**, v.12, p.155-161, 2000.

JÄRVINEN, T.A.H.; JÄRVINEN, T.L.N.; KÄÄRIÄINEN, M.; KALIMO, H.; JÄRVINEN, M. Muscle injuries: biology and treatment. **Am J Sports Med**, v. 33, n. 5, p. 745 – 64, 2005.

JENSEN K., et al. Pressure-pain threshold in human temporal region. Evaluation of a new pressure algometer. **Pain**, v.25, n.3, p.3131-323, 1986.

JI, R.R.;BERTA, T.NEDERGAARD, M. Glia and pain: Is chronic pain a gliopathy? **Pain**, v.154, p.510-528,2013.

KAGITANI, et al. Afferent nerve fibers and acupuncture. **Autonomic Neuroscience Basic and Clinical**, v.157, p.2-8,2010.

KAKIHATA, C.M.M., et al. Influência do *laser* de baixa potência no salto vertical em indivíduos sedentários. **Einstein**, v.13, n.1, p.41-6, 2015.

KANNUS, P., et al. Basic science and clinical studies coincide: active treatment approach is needed after a sports injury. **Scand J Med Sci Sports.**, v. 13, p. 150-154, 2003.

KARUAT, J., et al. Análise do tecido muscular de ratos Wistar submetidos ao modelo de compressão do nervo isquiático e à crioterapia. **Einstein**, v.16, n.3, p.1-7, 2018.

KJAER M., et al. Extracellular matrix adaptation of tendon and skeletal muscle to exercise. **J Anat**. v.208, n.4, p.445–50, 2006.

KIM, J.W, et al. Differentially expressed genes and morphological changes during lengthened immobilization in rat soleus muscle. **Differentiation**, v.75, p.147-157, 2007.

LAUMONIER, T.; MENETREY, J. Muscle injuries and strategies for improving their repair. **J Exp Orthop.**, v.3, n.1, p.15, 2016.

LEAL JUNIOR, E.C.P., et al. effect of low-level laser therapy (GaAs 904 nm) in skeletal muscle fatigue and biochemical markers of muscle damage in rats. **Eur J Appl Physiol** v.108, p.1083-8, 2010.

LEE, J.C.; MITCHELL, A.W.; HEALY, J.C. Imaging of muscle injury in the elite athlete. **Br J Radiol**. v.85, n.1016, p.1173–85, 2012.

LI, G. Effects of Cu/Zn superoxide dismutase on strain injury – induced oxidative damage to skeletal muscle in rats. **Physiological Research**, v.54, p.193-199, 2005.

LI, J.; CHEN, J.; KIRSNER, R. Pathophysiology of acute wound healing. **Clin Dermatol**, v.25, p.9–18, 2007.

LI, Z. R. **Experimental Acupuncture**. China Press of Traditional Chinese Medicine; 2003.

LIEBER, R.L. **Skeletal muscle structure, function, and plasticity**. 2 ed., Philadelphia: Lippincott Williams Wilkins, 2002, p. 26-35.

LIU, S.Y., et al. Acupuncture stimulation improves balance function in stroke patients: a single-blinded controlled, randomized study. **Am J Chin Med**, v. 37, 483–494, 2009.

LO, Y.L.; CUI, S.L.; FOOK-CHONG, S. The effect of acupuncture on motor cortex excitability and plasticity. **Neurosci Lett**, 384, p.145-149, 2005.

LOPES-MARTINS, R.A., et al. Spontaneous effects of low-level laser therapy (650 nm) in acute inflammatory mouse pleurisy induced by carrageenan. **Photomed Laser Surg**, v.23, p.377-81, 2005.

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 (1985)**. v.101, n.1, p.283-8, 2006.

LUO, L., et al. Effects of low-level laser therapy on ROS homeostasis and expression of IGF-1 and TGF- β 1 in skeletal muscle during the repair process. **Lasers Med Sci.**, v.28, n.3, p.725-34, 2013.

MA,H.;et al. Intervention effects of acupuncture on fatigue induced by exhaustive physical exercises: A metabolomic investigation. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**,2015.

MACPHERSON, H., et al. Influence of Control Group on Effect Size in Trials of Acupuncture for Chronic Pain: A Secondary Analysis of an Individual Patient Data Meta-Analysis. **Plos One**. v.9, n.4, p. e93739, 2014.

MAIOLI, C. ET AL. Short and long-term modulation of upper limb motor-evoked potentials induced by acupuncture. **Eur J Neurosci**, 23(7):1931-1938,2006.

MALUF, A.P., et al. Utilização do laser terapêutico em exodontias de terceiros molares inferiores. **RGO**. v.54, p.182-4, 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., et al. Low level laser therapy on skeletal muscle inflammation: evaluation of irradiation parameters. **J. Biomed Opt.** v.19, n.9, p.1-12, 2014.

MARG, A., et al. Human satellite cells have regenerative capacity and are genetically manipulable. **J Clin Invest**, v.124, n.10, p. 4257-65, 2014.

MARQUES, et al. Photobiomodulation therapy on collagen type I and III, vascular endothelial growth factor, and metalloproteinase in experimentally induced tendinopathy in aged rats. **Lasers Med Sci**, 31(9):1915-23, 2016.

MEIRELES G.C.S., et al. A efetividade da fototerapia laser no reparo tecidual em portadores de desordem funcional sistêmica. **C&D. 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- α and TGF- β in skeletal muscle during the repair process. **Lasers Med Sci**, v. 26, p. 335-340, 2011.

MILLIGAN, E.D.; WATKINS, L.R. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. **Nature Reviews neuroscience**, v.10, n.1, p.23-36, 2009.

MINAMOTO, V.B.; BUNHO, S.R.; SALVINI, T.F. Regenerated rat skeletal muscle after periodic contusions. **Braz J Med Biol Res**, v.34, n.11, p.1447-1452, 2001.

MIYABARA, E.H., et al. Cyclosporin a attenuates skeletal muscle damage induced by crotoxin in rats. **Toxicon** v.43, p.35-42, 2004.

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.1128-38, 2006.

MORAIS, S.R.L., et al. Strength training prior to muscle injury potentiates low-level laser therapy (LLLT)-induced muscle regeneration. **Lasers Med Sci**, v.32, p.317-25, 2017.

MUELLER-WOHLFAHRT, H.W., et al. Terminology and classification of muscle injuries in Sport: The Munich consensus statement. **Br J Sports Med**, v.47, p.342-350, 2013.

MURPHY, M.M.; LAWSON, J.A.; MATHEW, S.J.; HUTCHESON, D.A.; KARDON, G. Satellite cells, connective tissue fibroblasts and their interactions are crucial for muscle regeneration. **Development**, v.138, n.17, p. 3625-37, 2011.

NAMPO, F.K.; CAVALHERI, V.; SOARES, F.S.; RAMOS, S.P.; CAMARGO, E.A. Low-level phototherapy to improve exercise capacity and muscle performance: a systematic review and meta-analysis. **Lasers Med Sci**, v.31, n.9, p.1957-70, 2016.

NEUGEBAUER, V.; HAN, J. S.; ADWANIKAR, H.; FU, Y.; JI, G. Techniques for assessing knee joint pain in arthritis. **Molecular Pain**, v. 3, n. 8, 2007.

OLIVEIRA, C.M.B. et al. Cytokines and pain. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v.6, n.2, p.255-265,2011.

ONDA, A. et al. acupuncture ameliorated skeletal muscle atrophy induced by hindlimb suspension in mice. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v.410, n.3, p.434-438,2011.

PANZER, R.B. A comparison of the traditional Chinese versus transpositional zangflu organ association acupoint lactions in the horse. **Am J Chin Med**, v.21, p.119-131, 1993.

PARK, D.S.; SEO, B.K.; BAEK, Y.H. Analgesic effect of electroacupuncture on inflammatory pain in collagen-induced arthritis rats: mediation by alpha2- and beta-adrenoceptors. **Rheumatol Int.**, v.33, n.2, p.309-14, 2013.

PEREIRA, F.A.O. Evidências científicas da ação da acupuntura. **Perspectiva**, v.4, n.7, p.88-105, 2005.

PERTILLE, A. et al. Evaluation of skeletal muscle regeneration in experimental model after malnutrition. **Braz J Biol**. v.77, n.1, p.83-91, 2017.

PERTILLE, A., MACEDO, A.B.; OLIVEIRA, C.P.V. Avaliação da regeneração muscular em animais idosos após tratamento com laser de baixa intensidade. **Rev Bras Fisioter**. v.16, n.6, p. 495-501, 2012.

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.

PODBIELSKI, M.; OTROCKA-DOMAGALA, I.; ROTKIEWICZ, T. Effects of laser lighth on regenerating muscle fibers in pigs. **Medycyna Weterynaryna**, v.62, n.10, p.1158-63, 2006.

PUGLIESE, L.S.; MEDRADO, A.P., et al. The influence of low-level laser therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers. **Pesqui Odontol Bras**, 17(4):307-13,2003.

RAMOS, L., et 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, p.154-160, 2012.

REBALKA, I.A.; HAWKE, T.J. Potential biomarkers of skeletal muscle damage. **Biomark Med**., v.8, n.3, p.375-8, 2014.

REIS, F.A., et al. Effects of Pre- or Post-Exercise Low-Level Laser Therapy (830 nm) on Skeletal Muscle Fatigue and Biochemical Markers of Recovery in Humans: Double-Blind Placebo-Controlled Trial. **Photomed Laser Surgery**., v.32, n.2, p.106-12, 2014.

RENNO, A.C.M., 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.

- RION, N. et al. mTORC2 affects the maintenance of the muscle stem cell pool. **Skelet Muscle**. v.9, n.1, p.30, 2019.
- ROSSETTO, S.C. **Acupuntura nos esportes**. São Paulo: Phorte, 2009.
- SANDBERG, M. et al. Different patterns of blood flow response in the trapezius muscle following needle stimulation (acupuncture) between healthy subjects and patients with fibromyalgia and work-related trapezius myalgia. **Eur J Pain**, 9, 497-497, 2005.
- SANTOS, V.C.; KAWANO, M.M.; BANJA, R.A. acupuntura na melhora da performance em atletas juvenis de handebol. **Revista Saúde e Pesquisa**, 1, 3:331-335, 2008.
- SAXTON, R.A.; SABATINI, D.M. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and **Disease**. **Cell**, v.168, n.6, p.960-76, 2017.
- SCOGNAMILLO-SZABÓ, M.V.R.; BECHARA, G.H. Acupuncture: Scientific basis and applications. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 6, p. 1091-9, 2001.
- SERRÃO, F.V., et al. Functional changes of human quadriceps muscle injured by eccentric exercise. **Braz J Med Biol Res.**, v.36, n.6, p.781-6, 2003.
- SHANG, C. The past, present and future of meridian system research. **Clinical Acupuncture and Oriental Medicine**, v. 1, n. 2, pp. 115–124, 2000.
- SHEFER, G., et al. Low-energy laser irradiation promotes the survival and cell cycle entry of skeletal muscle satellite cells. **J Cell Sci**. v.115, p.1461–9, 2002.
- SIEDENTOPF, C., et al. Laser acupuncture induced specific cerebral cortical and subcortical activations in humans. **Lasers Med Sci**. v.20, p.68-73, 2005.
- SILVA L.H., et al. GaAs 904-nm laser irradiation improves myofiber mass recovery during regeneration of skeletal muscle previously damaged by crotoxin. **Lasers Med Sci**, v.27, p.993-1000, 2012.
- SILVEIRA P.C.L., et al. Effects of low-power laser irradiation (LPLI) at different wavelengths and doses on oxidative stress and fibrogenesis parameters in an animal model of wound healing. **Lasers Med Sci**. v.204, n.26, p.125-131, 2011.
- SOUZA, N.H.C. et al. Effect of low-level laser therapy on the modulation of the mitochondrial activity of macrophages. **Braz J Phys Ther.**, v.18, n.4, p.308-314, 2014.
- SU, T.F., et al. Electroacupuncture reduces the expression of proinflammatory cytokines in inflamed skin tissues through activation of cannabinoid CB2 receptors. **Eur J Pain** v.16, p.624–35, 2012.
- TAKMATSU-ROCHA, J.C.; FERRARESI, C.; HAMBLIN, M.R. Low level laser therapy (904nm) can increase collagen and reduce oxidative and nitrosative stress in diabetic

wounded mouse skin. **J Photochem**, Photobiol B, 164:96-102,2016.

TAFFAREL, M. O. FREITAS, P.M.C. Acupuntura e analgesia: aplicações clínicas e principais acupontos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 9, p. 2665-2672, 2009.

TEDESCO, F.S.; DELLAVALLE, A.; DIAZ-MANERA, J.; MESSINA, G.; COSSU, G. Repairing skeletal muscle: regenerative potential of skeletal muscle stem cells. **J Clin Invest.**, v.120, n.1, p.11-9, 2010.

TIDBALL, J.G. Inflammatory processes in muscle injury and repair. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 288, p. R345-R353, 2005.

TOMAZONI, S.; FERREIRA, T.; CASALECHI, H.; LEAL JÚNIOR, E. Effects of photobiomodulation therapy and topical non steroidal anti-inflammatory drug on skeletal muscle injury induced by contusion in rats – part 1: morphological and functional aspects. **Lasers Med Sci.** v. 32, n.9, p.2111-20, 2017a.

TOMAZONI, S., et al. Effects of photobiomodulation therapy and topical non-steroidal anti-inflammatory drug on skeletal muscle injury induced by contusion in rats – part 2: biochemical aspects. **Lasers in Med Sci.** v.32, n.8, p.1879-1887, 2017b.

VALLE, X., et al. Muscle Injuries in Sports: A New Evidence-Informed and Expert Consensus-Based Classification with Clinical Application. **Sports Med.** v.47, p.1241–53, 2017.

VAN DER POEL, C., et al. Ageing prolongs inflammatory marker expression in regenerating rat skeletal muscles after injury. **J Inflamm (Lond)**., v.8, n.1, p.41, 2011.

VATANSEVER, F., et al. Low intensity laser therapy accelerates muscle regeneration in aged rats. **Photonics Lasers Med.**v.1, n.4, p.287–97.47, 2012.

WHITTAKER, P. Laser acupuncture: past, present, and future. **Lasers Med Sci.** v.19, p.69-80, 2004.

WOOLF, C. J. Central sensitization: implications for the diagnosis and treatment of pain. **Pain**, v.152, n.3 (Suppl), p. 2-15, 2011.

XIA, H., et al. Effect of Zusanli (ST 36) moxibustion on rat mesenteric microvascular system. **J Tradit Chin Med**, v.34, n.4, p. 491-497, 2014.

YABLONKA-REUVENI, Z.; RIVERA, A.J. Temporal expression of regulatory and structural muscle proteins during myogenesis of satellite cells on isolated adult rat fibers. **Developmental Biology** v.164, n.2, p.588-603, 1994.

YABLONKA-REUVENI, Z.; SEGER, R.; RIVERA, A.J. Fibroblast Growth Factor Promotes Recruitment of Skeletal Muscle Satellite Cells in Young and Old Rats. **J. Histochem. Cytochemistry**, v.47, n.1, p.23-42, 1999.

ZAMMIT, P.S.; PARTRIDGE, T.A.; YABLONKA-REUVENI, Z. The Skeletal Muscle Satellite Cell: The Stem Cell That Came in From the Cold. **J Histochem Cytochem**, v.54, n.11, p. 1177-91, 2006.

ZANOTTI, G.B., et al. Efeitos do laser de baixa potência sobre a regeneração da cartilagem na osteoartrose. **Rev Fisiot Bras**. v.12, n.2, p.139-46, 2011.

ZHANG, P., et al. mTOR is necessary for proper satellite cell activity and skeletal muscle regeneration. **Biochem Biophys Res Commun**. v.463, n. 1-2, p.102-8, 2015.

ZHANG, Y., et al. Electroacupuncture inhibition of hyperalgesia in an inflammatory pain rat model: involvement of distinct spinal serotonin and norepinephrine receptor subtypes. **Br J Anaesth**, v.109, p245–252, 2012.

ZHANG, Z. J.; WANG, X. M.; MCALONAN, G. M. Neural acupuncture unit: a new concept for interpreting effects and mechanisms of acupuncture. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2012, p. 429412, 2012.

ZHAO, Z.-Q. Neural mechanism underlying acupuncture analgesia. **Progress Neurobiol**. v.85, p. 355-375, 2008.

ZYLSTRA, F.J. et al. Anti-inflammatory actions of acupuncture. **Medial Inflamm**, 12, 59-69, 2003.

ANEXO A



Certificado Experimental no Uso de Animais em Pesquisa Nº 53/17 - CEUA

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito do tratamento com laserterapia em comparação com laserpuntura no tratamento da lesão muscular em gastrocnêmio induzida por agulha de biópsia em ratos wistar – análise morfológica, funcional e imunohistoquímica", registrada com o número "71/16", sob a responsabilidade de "Gladson Ricardo Fior Bertolini", que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2008, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pelo COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ (UNIOESTE), em reunião de 22/09/2017.

Finalidade	Pesquisa Científica
Vigência da autorização	10/09/2016 - 30/02/2017
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico wistar
Nº de animais	40
Peso/idade	300-400g, 60 dias
Sexo	Masculino
Origem	Biotério central da UNIOESTE Campus Cascavel - PR

Prof. Dr. Dirceu Baumgartner
Vice Coordenador do CEUA UNIOESTE
Portaria nº3730/2016