

**Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento**

GETÚLIO ANTONIO FREITAS FILHO

**EFEITO DA IRRADIAÇÃO LASER DE BAIXA POTÊNCIA ARSENETO
DE GÁLIO ALUMÍNIO (ASGAAL) DE 785 NM SOBRE A
CICATRIZAÇÃO DE LESÃO MUSCULAR EM RATOS**

**São José dos Campos - SP
2006**

GETÚLIO ANTONIO DE FREITAS FILHO

**EFEITO DA IRRADIAÇÃO LASER DE BAIXA POTÊNCIA ARSENETO
DE GÁLIO ALUMÍNIO (ASGAAL) DE 785 NM SOBRE A
CICATRIZAÇÃO DE LESÃO MUSCULAR EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia, como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica

Orientador: Prof. Dr. Newton Soares da Silva

São José dos Campos - SP
2006

F936e

Freitas Filho, Getúlio Antonio

Efeito da irradiação laser de baixa potência arseneto de gálio alumínio (AsGaAl de 785 nm sobre cicatrização de lesão muscular em ratos/ Getulio Antonio Freias Filho. São José dos Campos: UniVap, 2006.

1 disco laser, color

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Bioengenharia do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, 2006.

1. Terapia laser de baixa intensidade 2. Cicatrização 3. Colágeno
4. Lesão muscular I. Silva, Newton Soares da, Orient., II. Título

CDU: 616-003.9

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processo fotocopiadores ou transmissão eletrônica, desde que citada a fonte.

Aluno: *Getúlio Antonio de Freitas Filho*

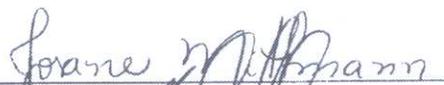
Data: *15/12/2006*

**“EFEITO DA IRRADIAÇÃO LASER DE BAIXA POTÊNCIA ARSENETO DE GÁLIO
ALUMÍNIO (ASGAAL) DE 785 NM SOBRE A CICATRIZAÇÃO DE LESÃO
MUSCULAR EM RATOS”**

Getúlio Antônio de Freitas Filho

Banca Examinadora:

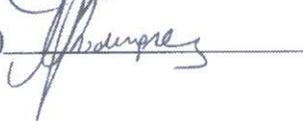
Prof^ª. Dra. **JOSANE MITTMANN** (UNIVAP)



Prof. Dr. **NEWTON SOARES DA SILVA** (UNIVAP)



Prof^ª. Dra. **MARIA DE FÁTIMA R. DA SILVA** (FESURV)



Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco

Diretor do IP&D – UniVap

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Getúlio e Isaura, meus maiores incentivadores e professores, e também às minhas queridas irmãs Patrícia e Priscila.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me acompanhar em mais esta conquista.

Aos amigos Romeu e Evandro, que muito contribuíram para a realização deste trabalho junto à Universidade Federal de Uberlândia, muito obrigado.

Agradeço ao Professor Dr. Newton Soares da Silva, pela orientação, paciência e sabedoria na realização deste trabalho.

Ao amigo e colega Arthur, pelo companheirismo, amizade e incentivo durante todo o mestrado.

Aos amigos Marcelo Marcos e Jean Luís, pelos ensinamentos, amizade, e por tudo aquilo que me proporcionaram dentro da fisioterapia.

Em especial, à minha amiga, Professora Dr. Maria de Fátima Rodrigues da Silva, pelo incentivo durante todo tempo, orientação e ensinamentos, meus sinceros agradecimentos.

A Dona Ivone, secretária do IP&D, pelo carinho e paciência com que trata todos os alunos que por ali passam.

Aos amigos do Laboratório de Genética e Bioquímica da UFU e do Laboratório de Histologia da Faculdade de Veterinária da UFU, meus agradecimentos.

Agradeço de todo o coração a todos os meus alunos que sempre torceram por mim.

EFEITO DA IRRADIAÇÃO LASER DE BAIXA POTÊNCIA ARSENETO DE GÁLIO ALUMÍNIO (ASGAAL) DE 785 NM SOBRE A CICATRIZAÇÃO DE LESÃO MUSCULAR EM RATOS

RESUMO

Uma das intervenções fisioterapêuticas para lesões musculares é a irradiação laser de baixa potência. Neste trabalho, foi utilizado o laser de baixa potencia de 785nm e densidade de energia de 4 J/cm^2 com o objetivo de avaliar seus efeitos sobre o processo inflamatório e fibras colágenas do músculo esquelético de ratos após trauma mecânico. Foram utilizados 48 ratos da linhagem Wistar divididos aleatoriamente em três grupos: Grupo Controle Normal (GCN), Grupo Controle Lesado (GCL) e Grupo Lesado e Tratado (GLT), todos contendo 16 animais, subdivididos em subgrupos de 8 animais para análises no oitavo e décimo quinto dias após a lesão. Foram feitas lesões no músculo gastrocnêmio, por impacto de um pino de 320g solto sobre o músculo a 21cm de altura. A terapia laser foi iniciada com uma aplicação 2 horas após a lesão e mais três aplicações em dias alternados. O grupo controle foi submetido a um tratamento semelhante com o aparelho laser desligado. Os músculos foram fixados em formol e processados em parafina. Foram feitas colorações com hematoxilina-eosina, picrossirius red e fast green. As análises histomorfométrica indicaram que a terapia laser estimulou significativamente a deposição do colágeno nos músculos tratados em comparação aos músculos não tratados, tanto após oito dias quanto quinze dias após lesão. A comparação da quantidade de colágeno nos músculos entre o oitavo e décimo quinto dias indicou também o aumento em sua produção na fase mais tardia da lesão. A análise histológica mostrou que não houve alterações no processo inflamatório, quanto ao número de fibroblastos, macrófagos e monócitos em relação aos grupos tratados e grupos controle. Portanto, concluiu-se que doses de $4/\text{cm}^2$ de Al-Ga-As do laser de 785 nm, não promoveram mudanças quanto ao número de células do processo inflamatório e neovascularização, mas aumentou a deposição de fibras colágenas entre as fibras musculares, sugerindo que a terapia laser estimula a síntese de colágeno.

Palavras-chave: Lesão muscular, Colágeno, laser 785 nm.

EFFECT OF LOW POWER LASER IRRADIATION GALLIUM ALUMINUM ARSENIDE (GAALAS) OF 785NM ON MUSCLE INJURY REGENERATION IN RATS

ABSTRACT

The low potency laser irradiation is one of the physiotherapy interventions to injure muscles. In this work, it was used the laser of low potency of 785nm and density of energy of 4 J/cm² with the objective to evaluate its effect on the inflammatory process and collagen fibers of the skeletal muscle of mice after mechanical trauma. 48 rats of Wistar lineage were used and aleatory divided in three groups: Group Normal Control (GCN), Group Injured Control (GCL) and Injured Group and treated (GLT), all containing 16 animals, subdivided in subgroups of 8 animals for analyses on eighth and fifteenth days after the injury. Injuries in the gastrocnemius muscle were made, for impact of a pin of 320g free on the muscle to 21cm of height. The laser therapy was initiated with an application 2 hours after the injury and more three applications in alternating days. The control group was submitted to a similar treatment with the laser equipment turned off. The muscles had been fixed in formol and processed in paraffin. Colorations were done with hematoxilyn-eosin, picosirius red and fast green. The histomorphometric analyses had in such a way indicated that the therapy laser significantly stimulated the deposition of the collagen in the muscles treated in comparison to the muscles not treated, as eighth days as fifteenth days after injury. The comparison of the amount of collagens in the muscles between the eighth and fifteenth days also indicated the increase in their production in the latest phase of the injury. The histology analysis showed that it didn't have alterations in the inflammatory process, in the number of fibroblasts, macrophages and monocytes between treated groups and controlled groups. Therefore, it was concluded that doses of 4/cm² of Al-Ga-As of the laser of 785 nm, It didn't provoke changes in the numbers of cells in the inflammatory process and neovascularization, but increased the collagen fibers deposition between muscles fibers, suggesting that the laser therapy stimulates the collagen synthesis.

Word-key: Muscular injury, Collagen, laser 785 n

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Equipamento promotor de trauma mecânico (PTM).	39
Figura 2 – Equipamento Laser Physiolux Dual da Bioset – Al-Ga-As com comprimento de onda de 785 nm.....	39
Figura 3 – Técnica de aplicação do laser Al-Ga-As 785 nm sobre o músculo gastrocnêmio.....	40
Figura 4 – Técnica cirúrgica para retirada do músculo gastrocnêmio.....	41
Figura 5 - Corte transversal do músculo gastrocnêmio corado com HE, 24 horas após a lesão.....	46
Figura 6 – Cortes transversais do músculo gastrocnêmio, corado com HE, 8 dias após a lesão	49
Figura 7 – Cortes transversais do músculo gastrocnêmio, corado com HE, 15 dias após a lesão	50
Figura 8 – Cortes transversais do músculo gastrocnêmio, corado com sirius red e fast green, 8 dias após a lesão causada por impacto	51
Figura 9 – Cortes transversais do músculo gastrocnêmio, corado com sirius red e fast green, 15 dias após a lesão causada por impacto	52
Figura 10 – Médias das porcentagens de colágeno entre os grupos controle normais, lesados não tratados e lesados/tratados.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Divisão dos animais em grupos e cronograma de sacrifício.	37
Tabela 2 – Protocolo de radiação com laser de As-Ga-Al.	40
Tabela 3 – Média e desvio padrão da porcentagem de colágeno para os grupos controles e tratados no 8° e 15° dias após lesão.	53
Tabela 4 – Análise estatística da porcentagem de colágeno entre os grupos grupos controle, lesados e tratados.	55
Tabela 5 - Análise da celularidade e neovascularização em microscopia de luz e coloração por HE. Resultado das médias dos grupos sacrificados no 8° dia pós lesão. Grupo lesado não tratado e Grupo lesado e tratado.	54
Tabela 6 - Análise da celularidade e neovascularização em microscopia de luz e coloração por HE. Resultado das médias dos grupos sacrificados no 15° dia pós lesão. Grupo lesado não tratado e Grupo lesado e tratado.	55
Tabela 7 - Análise da celularidade e neovascularização em microscopia de luz e coloração por HE. Resultado das médias dos grupos sacrificados no 8° e 15° dias após a lesão – Grupos lesados não tratados.	55
Tabela 8 - Análise da celularidade e neovascularização em microscopia de luz e coloração por HE. Resultado das médias dos grupos sacrificados no 8° e 15° dias após a lesão – Grupos lesados e tratados.	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ADM – amplitude de movimento
ADP – Adenosina Difosfato
Al-Ga-As – Arseneto de Gálio Alumínio
Anilab – Animais de Laboratório de Paulínia
ATP – Adenosina Trifosfato
cm – Centímetro
cm² – Centímetro Quadrado
CO₂ – Dióxido de carbono
DE – Densidade de Energia
DNA – Ácido Desoxirribonucléico
DP – Densidade de Potência
FHC – Fator de Crescimento Hepáticos
g – grama
Ga-As – Arsenieto de Gálio
GCL – grupo controle lesado
GCN – grupo controle normal
GLT – grupo lesado tratado
He-Ne – Hélio Neônio
Hz – Hertz
Hz – Hertz
J/cm² – Joules por centímetro quadrado
LBP – Laser de Baixa Potência
LEA - Laboratório de Experimentação Animal
mg/kg – Miligrama por kilograma
mL – mililitro
mmol/L – Milimol por litro
ms – Milisegundos
mW – Miliwatts
N₂ – Nitrogênio
nm – nanômetros

°C – Graus Celsius

pH – Potencial Hidrogeniônico

PSR – Pricosirius red

PTM – Promotor de Trauma Mecânico

s – Segundos

U/L – Unidades por Litro

UFU – Universidade Federal de Uberlândia

V – Volts

W – Watts

W/cm² – Watts por centímetro quadrado

mm – Micrômetro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	17
2.1.1. Objetivo Geral.....	17
2.1.2. Objetivos Específicos.....	17
3. A TERAPIA LASER DE BAIXA POTÊNCIA.....	18
3.1. Características do laser de baixa potência	18
3.2. Terapia Laser de Baixa Potência	20
4. A ESTRUTURA MUSCULAR.....	23
4.1. O colágeno muscular	24
4.2. Regeneração e Reparo muscular.....	27
4.3. Terapia Laser nas lesões musculares	31
5. MATERIAL E MÉTODOS	36
5.1. Animais de experimentação.....	36
5.2. Grupos experimentais	36
5.3. Mecanismo de lesão.....	37
5.4. Equipamento promotor de lesão	37
5.5. Equipamento de Laser	39
5.6. Terapia com Laser de baixa potência	39
5.7. Coleta de material.....	41
5.8. Análise histológica.....	41
5.9. Coloração por Hematoxilina Eosina	42
5.10. Coloração por picrosirius red e fast green.....	42
5.11. Obtenção de imagens	43
5.12. Quantificação de células e vasos sanguíneos.....	43
5.13. Quantificação morfométrica do colágeno	44
5.14. Análise estatística	44
6. RESULTADOS.....	45
6.1. Caracterização macroscópica da lesão muscular.....	45
6.2. Caracterização por microscopia da lesão muscular	45
6.3. Processo Inflamatório	45

6.4. Aspectos morfológicos das fibras musculares 8 dias após a lesão.....	46
6.5. Aspectos morfológicos das fibras musculares 15 dias após a lesão	46
6.6. Análise morfométrica do colágeno 8 e 15 dias após a lesão	47
7. DISCUSSÃO	56
8. CONCLUSÃO	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
ANEXO.....	69

1. INTRODUÇÃO

A perspectiva para a utilização do laser de baixa potência como forma terapêutica tem sido investigada desde a década de 60. Estes estudos mostram que esta forma de radiação pode estimular processos biológicos, em especial os processos de reparo tecidual (MESTER; KORENVI-BOTH; SPIRY; TISZA, 1975).

Dentre os tecidos biológicos o músculo é o mais plástico isto é, é capaz de se remodelar frente a estímulos como atividade física, condições de nutrição, inervação, eletroestimulação, imobilização e alterações de condição hormonais (ROSE; ROTHSTEIN, 1982).

O músculo esquelético é também o mais afetado por atividades esportivas e traumas decorrentes de atividades de vida diária. A rápida recuperação deste tecido mantendo suas propriedades mecânicas e desempenho é importante para o indivíduo lesado em especial para atletas que necessitam de sua máxima eficiência durante as competições.

Estas lesões muitas vezes exigem longo tempo de imobilização e uso de antiinflamatórios que podem provocar o aumento no número de fibras colágenas bem como alterações em sua orientação espacial e diminuição da quantidade de fibras musculares. Estas alterações contribuem para mudanças das funções e das propriedades biomecânicas do músculo (WILLIAMS; GODSPINK, 1984; JARVINEN et al., 2002; MEDRADO; PUGLIESE; REIS; ANDRADE, 2003).

As intervenções fisioterapêuticas procuram amenizar estes efeitos adversos como diminuir o tempo de imobilização, estímulo de movimentos controlados, e aplicações de terapias que atuam na diminuição do processo inflamatório e que estimulam o reparo do tecido muscular com manutenção de suas características funcionais.

A terapia laser de baixa potência representa uma das alternativas para o tratamento de diversas lesões. Ela pode apresentar efeitos tanto inibitórios quanto estimulatórios, por isso, o termo biomodulador é utilizado para citar seus efeitos sobre os tecidos biológicos. No entanto, existe a necessidade de se realizar estudos bem controlados para o desenvolvimento e padronização desta modalidade terapêutica. Por exemplo, a eficácia da terapia depende de parâmetros como o tempo, a dose, o comprimento de onda e frequência da radiação utilizada. Alterações destes parâmetros podem produzir efeitos diferentes em um mesmo tecido (SOTELO et al., 1996; ANDERS et al., 1993; LAAKSO et al., 1993; KARU et al., 1995; SCHINDL et al., 2000; PEREIRA et al., 2002; AMARAL et al., 2001).

Apesar de vários estudos indicarem o efeito biomodulador sobre o colágeno, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, há poucos estudos mostrando seus efeitos sobre o colágeno presente no tecido muscular esquelético. O presente trabalho propõe avaliar o efeito da terapia utilizando o laser Al-Ga-As de 785nm sobre processo inflamatório e o colágeno do músculo gastrocnêmio de rato lesionado por impacto. O modelo proposto é utilizar uma forma de lesão que simule impactos sofridos pelos músculos ao se chocar contra um obstáculo. Além disso, é proposto iniciar a terapia laser logo após a lesão para verificar seu efeito durante a fase aguda.

2. OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos da terapia laser de baixa potência sobre o processo inflamatório e fibras do tecido conjuntivo no músculo esquelético de ratos submetidos à lesão.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analisar o efeito de 4 aplicações de 4 J/cm^2 de laser de 785 nm, em dias alternados e iniciados 2 horas após a lesão, sobre a distribuição e quantidade do colágeno em músculo lesado por trauma mecânico através de estudos histomorfométricos;

Analisar o efeito de 4 aplicações de 4 J/cm^2 de laser de 785 nm, em dias alternados e iniciados 2 horas após a lesão, sobre a evolução do processo inflamatório em músculo lesado por trauma mecânico através de estudos histológicos.

3. A TERAPIA LASER DE BAIXA POTÊNCIA

3.1 CARACTERÍSTICAS DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA

O termo laser é um acrônimo para *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation* o que traduzindo significa amplificação da luz por emissão estimulada de radiação. Os princípios que delinearam a geração deste tipo de luz foram desenvolvidos por Albert Einstein e Maiman, que na década de 60 produziram o primeiro feixe de luz laser, e baseada em seus estudos surgiram vários aparelhos. Nesta mesma época, o húngaro André Mester iniciou trabalhos com o laser se difundindo rapidamente para a União Soviética e Europa (MESTER, 1969).

A radiação laser é uma onda eletromagnética constituída por um feixe de fótons, coerentes, de mesma frequência. Para a produção do laser é necessária a energia – de fonte elétrica – e substâncias gasosas, tais como o hélio e neônio, ou semicondutores, como o arsenieto de gálio ou arseneto de gálio e alumínio, levando assim a produção de um feixe de luz, que pode ser visível ou não dependendo do comprimento de onda (LEHMANN; LATEUR, 1994; KARU et al., 1995).

A adaptação do laser como recurso terapêutico ocorreu após 1965, sendo amplamente aplicado nas áreas biomédicas como recurso cirúrgico e clínico (COLLS, 1988).

O laser terapêutico possui três características, a primeira é a monocromaticidade, a qual relata que a maior parte da radiação agrupa-se em torno de um único comprimento de onda com amplitude limitada, onde o comprimento de onda determina quais biomoléculas

absorverão a radiação e, portanto gerando os efeitos terapêuticos específicos. A segunda característica é a colimação ou unidirecionalidade, onde os raios de luz ou fótons promovem pouca, ou nenhuma divergência da radiação emitida ao longo da distância percorrida através dos tecidos. E por último a coerência, sendo que a radiação é coerente se as ondas estão em fase e temporalmente coerentes, onde os trens de onda têm todos a mesma direção e o mesmo comprimento de onda (SCHINDL et al., 2000).

A coerência é uma das principais propriedades do laser, porém ao penetrar no tecido esta propriedade se perde nos primeiros extratos da pele. Isto ocorre devido a grande variedade de estruturas celulares que compõem este tecido, mas apesar disto a luz é absorvida em tecidos superficiais e profundos gerando alterações metabólicas a nível celular. (HACZEKI; TAMURA, 1989; KARU, 2003).

A possibilidade de estimulação em pequenos pontos e a emissão de altas densidades de energia faz do laser um instrumento de grande aplicabilidade nas áreas da saúde, tanto no diagnóstico como no tratamento (BRUGNERA; PINHEIRO, 1998).

A aplicação do laser na medicina pode ser classificada em cirúrgica, com alta potência, destinada à remoção, corte e coagulação de tecidos, e não cirúrgica com baixa potência, sendo este largamente utilizado como estimulador tecidual e cicatrizante pelos vários profissionais da saúde (BRUGNERA; PINHEIRO, 1998; SCHINDL et al., 2000; PEREIRA et al., 2002).

Outra característica do laser de baixa potencia é a capacidade de gerar efeitos sistêmicos mesmo quando aplicado em um só local do corpo, ou seja, promove efeito

metabólico no hemicorpo contralateral ao lado irradiado (MESTER; MESTER, 1989; POGREL et al., 1997).

3.2 TERAPIA LASER DE BAIXA POTÊNCIA

O laser terapêutico induz alterações atérmicas nos tecidos estimulados, sendo capaz de estimular tecidos específicos, interagindo com os mesmos através da distribuição de sua radiação enquanto transita nos tecidos, a variabilidade nos índices refrativos dos tecidos provoca alargamento espacial do feixe e perda de coerência (GUIRRO; GUIRRO, 2002).

Moléculas com capacidade de absorção de luz são responsáveis pela interação do laser com o tecido biológico. Os cromóforos (moléculas fotorreativas com capacidade de absorção de luz) tais como a hemoglobina e a melanina absorvem luz na faixa visível do espectro, os aminoácidos possuem absorção na faixa intermédia do espectro ultravioleta e nos comprimentos de onda menores do ultravioleta, já os ácidos nucléicos apresentam absorção semelhante aos aminoácidos além da região infravermelha (BAXTER, 1997).

Os fotorreceptores presentes nos tecidos células são sensíveis a determinados comprimentos de onda, que ao absorverem fótons desencadeiam reações químicas, o que acelera em curto prazo a síntese de ATP (via glicolítica e por oxidação fosforilativa) e em longo prazo ativa a transcrição e replicação do DNA (REDDY et al., 1998; SCHINDL et al., 2000; KARU, 2003).

Segundo Karu e colaboradores (1995), por exemplo, os comprimentos de onda de 415 nm, 602 nm, 633 nm, 650 nm e 725 nm são eficientes para aumentar a produção de energia celular, enquanto que com o comprimento de onda de 477 nm, 511 nm e 577 nm, não

influenciam este processo. Além disso, a fase do ciclo celular da célula irradiada, a dose, o comprimento de onda e a frequência da radiação utilizada também influenciam o efeito da terapia (KARU et al., 1995; SCHINDL et al., 2000; BOURGUIGNON-FILHO et al., 2005).

A terapia laser de baixa potência apresenta efeito fotobiológico, estimulando a síntese de ATP, de colágeno, proliferação celular dentre outros eventos celulares. Dessa forma, podem ocorrer efeitos analgésicos, antiinflamatórios e reparadores. Porém, estes efeitos dependem de fatores como comprimento de onda do laser, dose e tempo de aplicação (KARU; PYATIBRAT; KALENDÓ, 1995; PEREIRA et al., 2002; BOURGUIGNON-FILHO et al., 2005).

Os principais efeitos bioquímicos encontrados são: a liberação de substâncias pré-formadas, como histaminas, serotonina e bradicinina, e modificações das reações enzimáticas, que proporcionam alterações estimulantes ou inibitórias as enzimas, como inibição de prostaglandina e lise de fibrina (BORGES et al., 1996; SCHINDL et al., 2000; ROCHA, 2004).

O efeito bioelétrico é explicado pelo estímulo à produção de ATP (adenosina trifosfato) e aumento da mobilidade iônica, levando a potencialização da bomba de sódio e potássio, promovendo então o efeito bioestimulante do laser (GUIRRO; GUIRRO, 2002; ROCHA, 2004).

As radiações por laser Ga-As invisível a olho nu ou He-Ne - visível a olho nu, possuem efeito anti-inflamatório, analgésico, estimulante celular e modulador do tecido conjuntivo na regeneração e na cicatrização de diferentes tecidos (STAINKI et al., 1998).

Segundo Freitas e Baranauskas (2000) e Schindl et al. (2000), o efeito analgésico é devido à redução da inflamação, reabsorção de exsudatos, eliminação de substâncias alógenas, estímulo a microcirculação, interferência na mensagem elétrica através da manutenção do potencial de membrana, estímulo a liberação de beta endorfinas, redução na síntese de prostaglandinas, alteração no metabolismo das serotoninas, e promoção do equilíbrio energético no local da lesão através da manutenção da permeabilidade normal de vênulas e arteríolas.

Cotran e Robbins (2000) e Freitas e Baranauskas (2000) citam que o efeito antiinflamatório é devido à interferência na síntese de prostaglandinas e ao efeito microcirculatório que favorece o tecido lesionado provendo-o com nutrientes, células de defesa e oxigenação adequada.

O laser atua na fase proliferativa do processo inflamatório, excitando os efeitos regenerativos que ocorrem nesta fase, e ainda leva ao rearranjo estrutural do citoesqueleto e a modulação celular. O efeito antiedematoso também é explicado pelo estímulo a microcirculação, o qual favorece melhores condições de drenagem do plasma e pela ação fibrinolítica (COTRAN; ROBBINS, 2000; MEDRADO et al., 2003).

Laakso et al. (1993), relatam que o efeito da terapia por laser de baixa potência para ter efeito estimulante deve ter intensidade entre 0.5 J/cm^2 e 4.0 J/cm^2 , sendo que doses acima disto produzem efeito bio-inibitório, causando danos fotodinâmicos. O mesmo autor cita ainda que a frequência de tratamento deva ser de três vezes por semana, podendo variar de acordo com a lesão a ser tratada. Relata também que a estimulação tem seus maiores efeitos em casos onde a proliferação e regeneração celular é baixa, como no caso dos músculos.

Guirro e Guirro (2002) descreveram um esquema orientador, onde o efeito analgésico é atingido de 2 a 4 J/cm², o efeito antiinflamatório e circulatório de 1 a 3 J/cm², e o efeito cicatrizante de 3 a 6 J/cm².

4. A ESTRUTURA MUSCULAR

O músculo estriado esquelético é constituído pelos tecidos muscular, nervoso e o conjuntivo. A função primária do músculo esquelético adulto é gerar força de maneira rápida e direcionada, a qual é conseguida pela contração sincronizada dos feixes de miofibrilas. Cada miofibrila é um conjunto de células altamente especializadas consistindo predominantemente de citoesqueleto rico em proteínas contráteis filamentosas (McARDLE et al., 1998; WILMORE; COSTILL, 2001).

As proteínas responsáveis pela contração, actina e miosina dentre outras, compõem as unidades funcionais do músculo, os sarcômeros. A denominação músculo estriado se deve a alternância destas proteínas que formam bandas claras e escuras ao longo destes sarcômeros, sendo as primeiras denominadas banda I – formada pelos filamentos de actina – e a segunda banda A – filamentos de miosina (WILMORE; COSTILL, 2001).

O conjunto de fibras musculares é separado por tecido conjuntivo, tendo denominações específicas de acordo com o local onde se encontra. O tecido que envolve o músculo como um todo é denominado epimísio, o tecido que envolve cada fascículo chama-se perimísio, e o que cobre cada fibra muscular individualmente é conhecido como endomísio. A função destas camadas de tecido conjuntivo é permitir que a força de contração gerada em cada fibra individualmente se distribua sobre o músculo inteiro (NISHIMURA; TAKAHASHI, 1996; McARDLE et al., 1998; FISCHER et al., 2000; WILMORE; COSTILL, 2001).

Uma vez que o custo do alto grau desta especialização é a perda da habilidade de proliferar, a regeneração muscular em tecido adulto, seja por crescimento ou substituição das miofibrilas, depende de células-tronco mioprecursoras. Atualmente são conhecidas células mioprecursoras denominadas células satélites identificadas inicialmente por Mauro (1961), localizadas entre as membranas sarcoplasmática e basal e uma população de células hematopoiéticas denominadas *side population* (ASAKURA, 2003).

4.1 O COLÁGENO MUSCULAR

O colágeno é o maior componente do tecido conjuntivo intramuscular, tendo este um importante papel na determinação da rigidez e elasticidade muscular. O tipo, o arranjo, e o tamanho das fibras colágenas é de suma importância para manutenção da estrutura funcional do músculo (NISHIMURA; TAKAHASHI, 1996; LISTRAT et al., 1999).

No músculo esquelético adulto cinco tipos colágenos são encontrados, os tipos I, III, IV, V e VI, sendo os tipos I e III os predominantes (variando suas concentrações de acordo com o músculo estudado), versando ainda que o tipo I predomina sobre o tipo III (LISTRAT et al., 1999; AHTIKOSKI et al., 2001).

Segundo Ahtikoski et al. (2001), o colágeno se acumula durante todo crescimento fisiológico e também tem a função de suportar a estrutura muscular e distribuir as forças contráteis provindas da ação muscular. Estes mesmos autores relatam que o colágeno tipo I tem grande importância na força tênsil tecidual e papel na limitação da elasticidade, enquanto que o colágeno tipo III tem estrutura e função semelhante e possui maior número de fibras elásticas.

O colágeno tipo IV é encontrado somente no endomísio possivelmente devido a sua função estabilizadora das interações da matriz celular, enquanto que os outros tipos colágenos são encontrados em todas as camadas de tecido conjuntivo muscular (LISTRAT et al., 1999).

Segundo Wilmore e Costill (2001), o tecido conjuntivo intramuscular, constituído por fibras colágenas, servindo como passagem de nervos e vasos às fibras musculares, além de constituírem o arcabouço não contrátil, transmissor de força aos ossos. Relata ainda que por formarem grande parte da estrutura muscular, em casos de lesões o processo de cicatrização é basicamente composto de tecido conjuntivo. Na extremidade das fibras musculares, o tecido conjuntivo se une às fibras tendinosas para formar os tendões.

A contração organizada dos elementos contráteis de uma fibra muscular leva à produção de tensão, esta por sua vez é transmitida ao tecido conjuntivo gerando os movimentos corporais. Portanto alterações na estrutura muscular ou colágena altera a produção do movimento (ALBERTS et al, 1998; MARQUES, 2000).

Nishimura e Takahashi (1996) relatam em seus estudos que a espessura das estruturas colágenas intramuscular tem relação direta com a capacidade de geração de força muscular.

De acordo com Roach et al. (2002), o músculo perde colágeno em decorrência da falta de circulação sanguínea muscular, que pode ocorrer, por exemplo, em uma lesão muscular, e esta perda é diretamente proporcional ao tempo de sofrimento sanguíneo na área.

Durante o processo de imobilização muscular ocorrem grandes alterações fisiológicas, dentre elas na produção colágena, este processo resulta em uma queda rápida na produção

colágena, que pode ser evitada em parte com a imobilização na posição de alongamento muscular (AHTIKOSKI et al, 2001).

Mediante uma lesão tecidual, a lesão do tecido conjuntivo é certa, podendo resultar em complicações debilitantes e requerer um longo tempo de reabilitação. A organização do colágeno muscular no músculo sadio ou lesionado é de suma importância para a funcionalidade do músculo, podendo o excesso aliado à desorganização causar barreiras mecânicas que inibem a função e/ou regeneração muscular (GUM et al, 1997; FISCHER et al., 2000).

A síntese do colágeno inicia-se assim que a lesão intersticial começa, e é prolongada até as fases finais da cicatrização, quando os remodelamentos dos tecidos ocorrem. As fibrilas longas de colágeno entrelaçam-se com as fibras elásticas a fim limitar a expansão e evitar a laceração do tecido (PUGLIESE et al., 2003).

4.2 REGENERAÇÃO E REPARO MUSCULAR

Dois eventos ocorrem durante a recuperação muscular: a regeneração tecidual em que células lesadas são substituídas por outras do mesmo tipo e a reparação em que a substituição do tecido perdido é feita por tecido cicatricial (COTRAN; ROBBINS, 2000).

A musculatura esquelética de mamíferos adultos possui grande capacidade de adaptação às necessidades do organismo. Ele é capaz de se regenerar após diversos tipos de trauma, como lesões, esmagamento, isquemia, denervação ou mesmo pelo crescimento normal e exercícios físicos graças às células mioprecursoras. Essas células atuam no crescimento muscular pós-natal, na regeneração de fibras musculares danificadas e na

manutenção do músculo esquelético do indivíduo adulto (SEALE; RUDNICKI, 2000; ZAMMIT; BEAUCHAMP, 2001).

Independente do tipo de lesão (mecânica, térmica, isquêmica, ou por substâncias tóxicas) a cicatrização muscular segue uma série de eventos estabelecidos, sendo esta seqüência a necrose das células lesadas, infiltração inflamatória, fagocitose das células lesadas, ativação das células satélites, e por último a diferenciação das células precursoras (LEFAUCHEUR; SÉBILLE, 1995).

Nos 3 primeiros dias após a lesão o músculo encontra-se em processo inflamatório agudo e segue em regeneração até o 21º dia. Nas primeiras horas pós-lesão, existe uma reação catabólica levando a quebra de proteínas musculares, seguida por uma reação anabólica com formação de tecido cicatricial e novas fibras musculares (FISCHER et al., 1999).

No entanto, Kasemkijwattana et al. (2002), advertem que o tipo de trauma é de suma importância na determinação do prognóstico da lesão, pois alguns traumas podem acarretar grande lesão de tecido vascular e nervoso o que complica o processo de regeneração muscular. Em toda lesão ocorre um processo inflamatório local, o qual passa por cinco acontecimentos básicos: 1- liberação de substâncias químicas, 2- aumento da circulação sanguínea na área lesada, 3- extravasamento de plasma (exsudação), 4- infiltração de células imunológicas, e 5- cicatrização (ALLBROOK, 1973; COTRAN; ROBBINS, 2000).

Como consequência do trauma pode haver ruptura da membrana celular, o sarcolema, causando extrusão das organelas para o meio extracelular. O sarcolema, formado principalmente por componentes lipídicos, é uma membrana de relativa fragilidade, desta

forma pequenos traumas podem levar a deterioração sarcoplasmática, no entanto o sarcolema tem capacidade regenerativa que restaura sua propriedade contrátil (ROTH; ORUN,1985).

O tecido muscular lesionado sofre processo de necrose, infiltração de leucócitos polimorfonucleares, hematoma e edema no local da lesão. Em poucos dias os macrófagos fagocitam o tecido necrosado, levando a deposição de tecido conjuntivo e formação de cicatriz muscular. Durante este período, as células satélites são ativadas, sendo estas consideradas precursoras de novas células musculares. Com aumento destas células precursoras de mioblastos, elas se fundem para formar miotúbulos, os quais se maturam para formar novas células musculares (ALLBROOK, 1973; KASEMKIJWATTANA et al., 2002).

A capacidade de regeneração resultante de uma lesão parcial ou total da fibra muscular depende de fatores como a população de células mioprecursoras, revascularização e reinervação (BODINER-FOWLER, 1994; ASAKURA, 2003).

A considerável capacidade de regeneração do músculo esquelético resultante de uma lesão parcial ou total da fibra muscular, é limitada a três fatores: população de células satélites, revascularização e reinervação (BODINER-FOWLER, 1994).

Sato et al. (2003), complementam esta informação relatando que o processo regenerativo depende da ativação das células satélites, mas adverte que este processo é lento (dura aproximadamente duas semanas) e geralmente é incompleto com grande formação de tecido cicatricial, este de consistência fibrosa e pouco elástica. O processo de deposição de fibrose continua por tempo indeterminado após as duas semanas iniciais do processo de cicatrização, esta fibrose pode alterar a força e extensibilidade muscular.

A formação de miotúbulos ocorre após três dias de uma lesão e o músculo torna-se reparado entre 21 a 28 dias (HUSMANN, 1996). Lefaucheur e Sébille (1995) relatam que o músculo traumáticamente lesado após poucas horas de lesão já se encontra com significativo infiltrado inflamatório (este persistindo até o 11º dia pós-lesão). Miofibrilas com coloração clara aparecem do 3º ao 4º dia na zona central da lesão, do 2º ao 4º os fagócitos aparecem e são observados até o 6º dia, Observa-se ainda nestes dias, degradação da matriz extracelular. No 18º dia todas as miofibrilas regeneradas aparecem com o núcleo centralizado e sua organização em fascículos se iguala ao músculo adulto.

Segundo Hurne e Kalimo (1992), é importante para a cicatrização muscular a remoção do material muscular necrosado por macrófagos na área da lesão o mais cedo possível, pois este processo parece ser um requisito para a ativação e proliferação das células miogênicas subjacentes à área da lesão.

A matriz extracelular atua na regeneração muscular fazendo com que as membranas basais das células necróticas auxiliem a fusão das células precursoras aos miotúbulos. Secundariamente serve como reservatório de vários fatores de crescimento que servem como regulador do processo de regeneração. Por último, estimula a proliferação das células satélites e sua mobilidade no local em questão (LEFAUCHEUR; SÉBILLE, 1995).

A lesão muscular leva a uma proliferação de tecido conjuntivo, ocasionando uma desestruturação da arquitetura tecidual, esta desestruturação do tecido altera o alinhamento natural e desorganiza as fibras musculares (JÄRVINEN, 1975).

A reação inflamatória é um dos principais processos que estimulam a liberação de fatores para a ativação de células satélites. Estes fatores, produzidos pela rápida invasão de neutrófilos ou pela população de macrófagos os quais chegam mais tarde ao local da lesão, ativam de várias maneiras as células satélites, os motoneuronios, a matriz extracelular, a quimiotaxia, a reação inflamatória e a revascularização (HUSMANN et al.,1996).

Hurne e Kalimo (1992), afirmam que os núcleos de células satélites marcadas não aparecem antes que se inicie a fagocitose de restos necrotizados. Geralmente um dia após o trauma muitos núcleos são encontrados na área de necrose de miofibras rompidas, enquanto que poucos deles na porção sobrevivente. Há grande proliferação de células satélites no 4º dia de regeneração e poucas marcadas no 7º dia. Especula-se se o fator de crescimento liberado pelos macrófagos seria necessário devido ao decréscimo de células satélites no 7º dia. A maioria dos mionúcleos, necessária à regeneração de miofibrilas, é produzida precocemente dentro dos cilindros de lâminas basais preservadas e distribuídas naquelas partes das miofibras que se estendem entre o tecido conjuntivo e o muscular.

A regeneração muscular pode acontecer pelo povoamento do local lesado por células mioprecursoras as quais irão formar novos miotubos ou pela restauração de miofibrilas lesadas também por meio dessas células (ROTH; ORON, 1985).

As células mioprecursoras quiescentes podem ser estimuladas pelo próprio mecanismo de lesão a formarem novas fibras musculares ou restaurar fibras musculares lesadas (BISCHOFF, 1986).

Após vários ciclos de injúria e regeneração não se nota depleção do número de células satélites sugerindo que estas células se multiplicam para diferenciarem em fibras musculares e também um grupo de células com a habilidade de auto renovação (BISCHOFF, 1994).

4.3 TERAPIA LASER NAS LESÕES MUSCULARES

Estudos *in vivo* e *in vivo* mostram que a terapia laser pode apresentar diferentes efeitos sobre a regeneração muscular. Estes efeitos dependem da dose, do comprimento de onda e do número de aplicações. Estudos realizados por Amaral et al. (2001), mostram que o efeito da radiação do He-Ne 632,8 em lesão muscular provocada por miotoxina depende da dose utilizada. Neste trabalho foram utilizadas doses de 2,6, 8,4 e 25 J/cm² e apenas a dose de 2.6 J/cm², promoveu mudanças significativas como o aumento da área da fibra muscular e a densidade mitocondrial. Já Oliveira et al. (1999), utilizando o mesmo protocolo, observaram que a radiação laser 904 nm com a dose de 3 e 10 J/cm² não provocou alterações morfológicas necessárias para a promoção da regeneração muscular.

Fisher e colaboradores (2000) utilizaram 1 J/cm² de laser sobre músculo que sofreu lesão por impacto, observaram que houve estímulo preferencial sobre fibroblastos com o aumento na produção de colágeno levando à formação de um tecido de cicatrização e não houve estímulo de mioblastos para a formação de novas fibras musculares.

Segundo Ben-Dov et al. (1999), o laser estimula a proliferação das células satélites, pela alteração no ciclo celular destas células, levando ao aparecimento de novos miotúbulos,

no entanto, inibem a sua diferenciação. Estes mesmos autores também concluíram que a idade das células altera a ativação das células satélites pela radiação laser.

A ativação das células satélites pela radiação laser de baixa intensidade explica-se em parte pela ativação de enzimas que tem papel fundamental na regulação da transcrição do RNA mensageiro. Outro fator que estimula a proliferação das células satélites pelo laser é o estímulo aos receptores da tirosina-quinase, a qual por sua vez ativa a fase 1 da síntese de novas proteínas celulares (SHEFER et al., 2003).

Os estudos feitos sobre o efeito da terapia laser Al-Ga-As (670nm) em feridas cutâneas nas doses de 4 e 8 J/cm² mostraram que a dose de 4 J/cm² foi mais eficiente que a dose de 8 J/cm² para promover a cicatrização. Este estudo utilizou apenas uma aplicação do laser imediatamente após a lesão e foi observada uma maior proliferação de fibroblasto e miofibroblasto causando deposição de colágeno e diminuição da cicatriz pela contração dos miofibroblastos. O colágeno do tecido conjuntivo se mostra mais organizada em feixes paralelos no grupo tratado (MEDRADO et al., 2003).

Além disso, Shefer et al. (2002), relatam que o laser também atua como protetor celular, regulando a apoptose celular das células envolvidas ou próximas a lesão, diminuindo assim a possibilidade de maior lesão muscular.

O laser na lesão muscular também tem papel auxiliador na estimulação da atividade dos macrófagos, os quais colaboram para uma melhor cicatrização muscular, e quando aplicado nos três primeiros dias atua na fase fibroblástica da reparação tecidual (FISCHER et al., 2000).

De acordo com Bem-Dov e colaboradores (1999) aplicações de laser acima de 10 segundos em lesões musculares podem não ter efeito regenerador sobre o músculo irradiado, sendo que observou maiores efeitos com 3 segundos de aplicação.

Segundo Schindl et al. (2000) e Pereira et al. (2002), o efeito cicatrizante do laser é em grande parte explicado pela sua capacidade de aumentar a síntese de colágeno, atuando como mecanismo de exportação do colágeno para o meio extracelular. Em estudos *in vitro* revelaram que a aplicação do laser pode aumentar em 50% os fibroblastos em tecidos humanos (AMARAL et al., 2001). A radiação a laser nos fibroblastos causa um aumento direto na produção do procolágeno, sendo isto em parte explicado pela alteração nos níveis de RNAm sintetizados (transcritos), causado pelo laser de baixa intensidade (SKINNER et al., 1996; YAMAMOTO et al., 1996).

Schindl et al. (2000), cita que o aumento da síntese de DNA nos fibroblastos foi conseguido com a intensidade de 0.5 J/cm², e que o laser estimula o fator de crescimento dos fibroblastos e miofibroblastos, e conseqüentemente a síntese colágena.

Skinner et al. (1996), conseguiram este mesmo efeito com a intensidade variando entre 0,09-0,5 J/cm². Os mesmos autores relatam ainda que este efeito só foi conseguido após a aplicação do laser durante quatro dias consecutivos.

Pogrel et al. (1997) e Schindl et al. (2000), também sugerem a utilização do laser para aumentar a síntese de colágeno e de fibroblastos, citando como base para tal sugestão, estudos

in vitro nos quais foram aplicados laser e resultados significativos foram obtidos quanto ao aumento dos fibroblastos e do colágeno.

O laser aplicado nas culturas dos fibroblastos de embriões humanos mostrou-se eficaz no aumento dos níveis do colágeno nas células irradiadas, assim como na produção de fibroblastos (REDDY et al., 1998; PUGLIESE et al., 2003).

A aplicação do laser em tecido muscular pode levar ao aumento do tecido conjuntivo entre as fibras, assim como o aumento de fibroblastos e ativação na formação do colágeno (BEM-DOV et al., 1999; BULYAKOVA et al., 2002).

A aplicação do laser leva a proliferação fibroblástica, a síntese colágena e a formação de matriz extracelular. O estímulo ao tecido conjuntivo leva a diferenciação dos miofibroblastos, que tem características morfológicas comuns aos fibroblastos, e são os principais responsáveis pela força contrátil do tecido no processo de cicatrização (MEDRADO et al., 2003).

Gum et al. (1997), relatam que o laser de He-Ne a 1 J/cm^2 é capaz de aumentar a síntese de fibras colágenas, e explica este fenômeno do laser através da sua capacidade de aumentar a síntese de RNA e promover a replicação celular, podendo desta maneira aumentar a síntese de RNA para os colágenos do tipo I e III.

Yamamoto et al. (1996), aplicaram o laser com o intuito de aumentar a síntese de procolágeno com o tempo de aplicação variando entre de 3 a 10 minutos, e verificaram que

tempos mais prolongados de terapia a laser não causam efeito acumulativo, portanto, não se preconizam fazer aplicações prolongadas para obtenção de maiores sínteses de procolágeno.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Foram utilizados 48 ratos (*Rattus norvegicus*), machos da linhagem WISTAR, de mesma idade (70 dias), sexo e massa corporal, provenientes da Anilab – Animais de laboratório de Paulínia São Paulo.

Os animais foram confinados em gaiolas de polietileno e acondicionados no LEA – Laboratório de Experimentação Animal, da Universidade Federal de Uberlândia – UFU.

Os ratos foram mantidos dentro das condições ideais para sua espécie, ou seja, temperatura a 25°C, umidade 40% e luminosidade dia/noite de 12 horas e ventilação adequada. Mantidos em gaiolas coletivas com 4 animais em cada onde receberam cuidados de higiene adequados e ração sólida Nuvilab CR1 da NUVITAL® e água *ad libidum* enquanto durou o tratamento.

5.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram divididos em três grupos sendo 16 não lesados, 16 lesados não tratados e 16 lesados e tratados.

Os grupos por sua vez foram subdivididos em dois subgrupos com 8 ratos. Cada subgrupo foi sacrificado no 8° e 15° dias após o início do experimento. A divisão dos grupos, o número de animais de cada grupo e o cronograma, está representada na (tabela 1).

Tabela 1 – Divisão dos animais em grupos e cronograma de sacrifício.

GRUPO	Nº ANIMAIS	SUBGRUPOS	SACRIFÍCIO PÓS LESÃO
CONTROLE (CGN)	16	8 - 8	8º e 15º dias
LESADOS (GCL)	16	8 - 8	8º e 15º dias
LESADOS E TRATADOS (GLT)	16	8 - 8	8º e 15º dias

Os animais foram anestesiados com quetamina a 5% e xilasina a 2% na proporção de 1:4 em dose de 0,10 a 0,15 mL/100g de massa corporal, sendo feito em seguida a delimitação da área a ser contundida com lápis dermatográfico na região caudal da perna direita. Após a delimitação da área os animais foram tricotomizados e foi feita a lesão utilizando o equipamento PTM - Promotor de Trauma Mecânico.

5.3 MECANISMO DE LESÃO

A lesão foi feita por meio do impacto de um pino de ferro com massa de 320g e solto de uma altura de 21 cm por meio do equipamento PTM. O pino foi posicionado sobre o músculo Gastrocnêmio do rato e solto, causando um impacto que provocou lesão muscular.

5.4 EQUIPAMENTO PROMOTOR DE LESÃO

O equipamento promotor de trauma mecânico (PTM), em sua estrutura geral, é formado por uma base fixa, um trilho fixo, um suporte móvel e um pino de impacto como será descrito a seguir:

- *Base fixa*: Tem por finalidade a sustentação de todo o aparelho, bem como servir de base para colocação dos animais em disposição previamente calculada para que a lesão fosse implantada de conformidade com o objetivo inicial;
- *Trilho fixo*: Parafusado na base fixa, tem por fim servir de trilho onde irá correr o suporte móvel. Trata-se de uma estrutura quadrangular, o que impede que se altere a trajetória da haste e que esta atinja necessariamente o ponto determinado, funcionando assim como o corredor por onde se deslocará a peça móvel;
- *Suporte móvel*: Em uma de suas extremidades combina-se com o trilho fixo, onde realiza movimento de deslocamento vertical, motivado pela ação da aceleração gravitacional. Por outra extremidade liga-se ao pino de impacto, possuindo a capacidade de ser regulada, mas que no momento da indução da lesão permanece ajustada em altura previamente estabelecida;
- *Pino de impacto*: Tem por função fazer contato com o local do animal a ser lesionado, com massa de 320 g.

O pino de impacto foi posicionado sobre o músculo gastrocnêmio do rato e solto, causando um impacto e assim, provocando lesão muscular. (figura 1).



Figura 1 – Equipamento promotor de trauma mecânico (PTM).

5.5 EQUIPAMENTO LASER

O equipamento utilizado foi o Laser Physiolum Dual da Bioset com frequência de trabalho de 2000 Hertz e comprimento de onda de 785 nm – Arseneto de Gálio e Alumínio – infravermelho, e LASER em emissão contínua. Esta caneta foi desenvolvida e cedida pela empresa Bioset Indústria de Tecnologia Eletrônica Ltda (Figura 4).



Figura 2- Equipamento Laser Physiolum Dual da Bioset – Al-Ga-As com comprimento de onda de 785 nm.

5.6 TERAPIA COM LASER DE BAIXA POTÊNCIA

A aplicação da radiação laser Al-Ga-As foi iniciada no primeiro dia, 2 horas após lesão, pelo método transcutâneo pontual em apenas um ponto, com dose de 4 J/cm². Os animais foram posicionados sobre uma plataforma, em decúbito ventral com hiperextensão do membro inferior direito. A Terapia laser foi realizada no 1º, 3º, 5º e 7º dia após lesão seguindo os parâmetros conforme (tabela 2). A incidência da TLBP foi realizada diretamente na pele da região lesionada, com o contato direto da caneta sobre esta região em ângulo de 90°. Os animais controle também receberam o mesmo tipo de manipulação que os animais irradiados, porém com o laser desligado (Figura 3).

Tabela 2 – Protocolo de radiação com laser de baixa potencia 785nm.

Parâmetro de radiação	Valores
Densidade de Energia (dE)	4 J/cm ²
Potência de pico	70 mW
Comprimento de Onda	785 nm
Área do feixe	0,08 cm ²
Regime de emissão	contínuo



Figura 3 – Técnica de aplicação do laser 785 nm sobre o músculo gastrocnêmio.

5.7 COLETA DE MATERIAL

Ao final da fase experimental, os animais foram submetidos à anestesia utilizando injeção intraperitoneal de Rompum[®] e Quetalar[®] em doses iguais de 0.10 mL de solução para cada 100g de massa corporal, pesados, em seguida realizada a punção cardíaca e feito o sacrifício dos animais por dose excessiva do anestésico. Os músculos Gastrocnêmio foram retirados por meio de equipamentos cirúrgicos (figura 4)



Figura 4 – Técnica de retirada da pele e do músculo gastrocnêmio.

5.8 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Foi feita a retirada cuidadosa dos músculos Gastrocnêmio e fixação dos mesmos em formol a 10% durante pelo menos 48 horas.

Para processar o material, utilizou-se a técnica histológica clássica para inclusão em parafina (MICHALANY, 1980), composta pela seguinte seqüência, depois de realizada a fixação:

A - Desidratação – Os fragmentos permaneceram 30 minutos, em cada frasco contendo álcool de concentrações crescentes: 75%, 85%, 95%, absoluto I, absoluto II e absoluto III.

B - Diafanização - Após o álcool absoluto III o material foi transferido para xilol I, II e III, permanecendo por 30 minutos em cada banho, tratamento necessário para substituir o álcool e permitir a penetração de parafina fundida dentro da peça.

C – Impregnação e Inclusão - Os fragmentos passaram por 3 banhos de parafina (I, II e III), cada um com duração de 30 minutos. Em seguida, fez-se a inclusão propriamente dita em moldes metálicos, colocados sobre uma folha de papel com parafina à 56°C.

D - Corte – Foram feitos cortes transversais com uma espessura de nove micrômetros, com o auxílio de um micrótomo Spencer 820, os quais foram distendidos em banho-maria. O procedimento foi seguido pela pescagem, que consiste em mergulhar no banho-maria a lâmina já pincelada com albumina na parte central para fixar o corte à lâmina. A secagem foi feita na estufa para fusão da parafina impregnada no tecido. Os cortes foram selecionados para as colorações hematoxilina/eosina e *fastgreen/picrosirius red* de modo alternado.

5.9 COLORAÇÃO POR HEMATOXILINA EOSINA

A coloração por hematoxilina/eosina foi utilizada para a identificação dos tipos celulares presentes no local da lesão (MICHALANY, 1980).

5.10 COLORAÇÃO POR PICROSIRIUS RED E FASTGREEN

Na coloração por *picrosirius red* as fibras colágenas são identificadas positivamente pela cor avermelhada. A coloração do colágeno foi executada usando uma modificação dos métodos combinados descritos por Sweat *et al* (1964) e Dolber e Spach (1987). Inicialmente

as lâminas foram imersas por 2 minutos em cubeta contendo solução de ácido fosfomolibidênico 0,2%, seguido de mergulho em solução contendo o *picrosirius red* (PSR) (*sirius red* e solução saturada de ácido pícrico) por 90 minutos. As amostras foram enxaguadas por 2 minutos em solução 0,01 NHCl, seguido pelo enxágüe por 1 minuto em etanol 70%, etanol 100% e Xilol. As amostras foram montadas usando Entelan[®].

A coloração por *fastgreen* colore as fibras musculares em verde permitindo o contraste com as fibras colágenas em vermelho para a realização da análise morfométrica dos tecidos conjuntivo.

5.11 OBTENÇÃO DE IMAGENS

As imagens dos cortes histológicos foram obtidas em microscópio *Olympus Triocular BX40* acoplado a câmera *Olympus-200*, ligada a um computador PC através de placa digitalizadora Data Translation 3153 com objetivas de 10X e 40X.

5.12 QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS E VASOS SANGUÍNEOS

Para caracterização do processo inflamatório foi realizada a contagem de células do processo inflamatório, mononucleados e polimorfonucleados, fibroblastos, células gigantes e também a presença de neovascularização. Foi realizada uma análise semiquantitativa em graus que variavam de: ausente (-), pouca presença (+), presença moderada (++) e presença elevada (+++). Os registros em cruces foram transcritos em valores numéricos para análise estatística através da comparação de médias dos grupos da seguinte forma: 0 para (-), 1 para (+), 2 para (++) e 3 para (+++).

5.13 QUANTIFICAÇÃO MORFOMÉTRICA DO COLÁGENO

As quantificações morfométricas foram feitas a partir da binarização da imagem no programa HImage. Neste, o colágeno em vermelho se torna preto em contraste com a coloração verde do músculo que se torna branca. O programa calcula a área em preto resultando na porcentagem de colágeno (BERETTA, 2005).

5.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as variáveis aferidas no estudo foram analisadas com o auxílio do programa SPSS 12.0 para Windows. A expressão dos valores está demonstrada em média aritmética e desvio-padrão, submetido ao teste estatístico Wilcox ANOVA e t-Student. O nível de significância estabelecido foi de 5 % ($p < 0,05$).

6. RESULTADOS

6.1 CARACTERIZAÇÃO MACROSCÓPICA DA LESÃO MUSCULAR

Ao exame *in vivo*, 24 horas após a lesão, foi observado aumento na espessura do músculo, caracterizando edema, movimento de retirada do membro à palpação e hiperemia local.

6.2 CARACTERIZAÇÃO POR MICROSCOPIA DA LESÃO MUSCULAR

Como estudo piloto do mecanismo do trauma, foram sacrificados 02 animais 48 horas pós-lesão e submetidos a análise histológica pela coloração por HE do músculo gastrocnêmio lesado. Foi observado infiltrado de células inflamatórias, áreas hemorrágicas e edema, o que caracterizou a presença de lesão tecidual. (Figura 5A e B).

6.3 PROCESSO INFLAMATÓRIO

A análise estatística foi feita pelo teste não paramétrico de Wilcoxon onde foi verificado segundo os critérios utilizado para avaliação das lâminas que não houve diferença entre os grupos tratados e não tratado quanto à presença de: células gigantes, células musculares pequenas, fibroblastos, células mononucleadas (macrófagos, monócitos e linfócitos) e neovascularização.

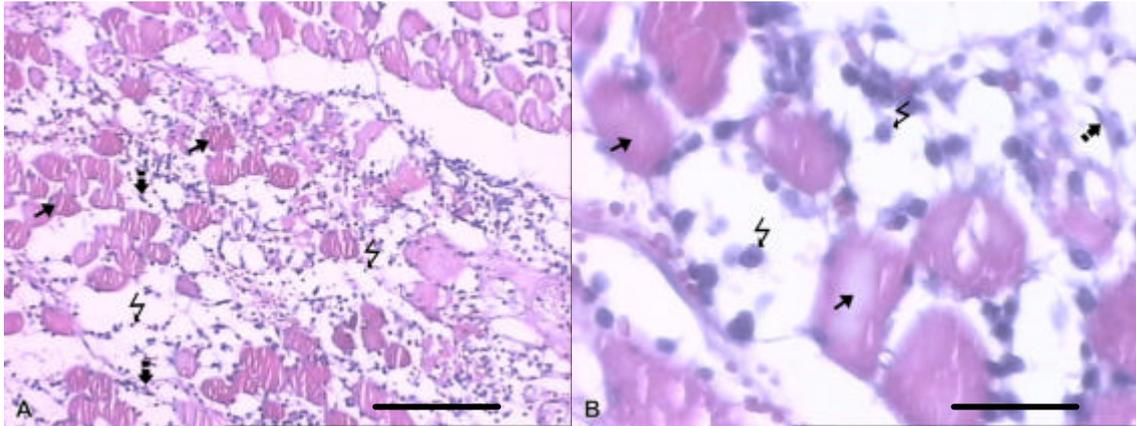


Figura 5 - Corte transversal do músculo gastrocnêmio corado com HE, 24 horas após a lesão. Seta: fibra muscular, seta pontilhada: fibroblasto, seta ondulada: células gigantes. Barra: A- 100 μ m e B- 25 μ m).

6.4 ASPECTOS MORFOLÓGICOS DO TECIDO MUSCULAR 8 DIAS APÓS A LESÃO

A análise do tecido muscular corado por HE mostrou ainda, 8 dias após a lesão, células relacionadas ao processo inflamatório como: células gigantes, fibroblastos e mononucleados (macrófagos, monócitos) e polimorfonucleados tanto no grupo tratado quanto não tratado. É observado também que a neovascularização ocorre em ambos os grupos. Porém não há diferença estatisticamente significativa entre os números de células e de vasos neoformados quando comparados os grupos tratados e não tratados (Figuras 6A, B e C, Tabelas 5, 7 e 8).

6.5 ASPECTOS MORFOLÓGICOS DO TECIDO MUSCULAR 15 DIAS APÓS A LESÃO

Após 15 de lesão do tecido muscular, a análise histológica dos cortes corados por HE, observa-se ainda células relacionadas ao processo inflamatório e neovascularização, tanto no grupo de animais lesados quanto no grupo de animais lesados e tratados. Entretanto, não foi

observado nos grupos controle normal (não lesado). A análise estatística demonstrou não haver diferenças significativas do número de células do processo inflamatório entre os grupos tratados e não tratados (Figuras 7A, B e C, Tabelas 6,7 e 8)

Não foi observada diferença estatisticamente significante quanto ao número de células do processo inflamatório e de neovascularização entre os grupos lesados de 8 e 15 dias entre grupos tratados e não tratados (Tabelas 7 e 8).

6.6 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DO COLÁGENO 8 e 15 DIAS APÓS A LESÃO

Os métodos de coloração *fastgreen e picrosirius* utilizados para corar músculo e colágeno, respectivamente, permitiram o contraste para a binarização da imagem, delimitação da área de colágeno e fazer sua quantificação em termo de porcentagem utilizando o programa Hlimage (Figuras 8 e 9)

As figuras 8-C e 9-C mostram que no padrão de normalidade, ou seja, músculo não lesado, 8 e 15 dias após o início do experimento respectivamente, as fibras musculares apresentam tamanhos semelhantes entre si com igual quantidade de colágeno distribuído entre elas quando comparados ao músculo lesado. Não há diferença estatística entre as médias da quantidade de colágeno entre os grupos controle normal do oitavo e décimo quinto dias ($p = 0,975$). Nos grupos lesados a quantidade de colágeno foi maior que nos grupos controle normais mostrando o aumento da quantidade dessas fibras devido ao processo de cicatrização da lesão ($p < 0,05$) (Figura 10, Tabelas 3 e 4)

As figuras 8-A e 8-B mostram a distribuição do colágeno e fibras musculares, após oito dias da lesão, no grupo lesado não tratado e no grupo lesado e tratado respectivamente. Observa-se que no grupo tratado as fibras colágenas se apresentam melhor distribuídas entre as fibras musculares em comparação ao grupo não tratado. A quantificação deste colágeno mostra que ela é maior no grupo lesado e tratado do que no grupo sem o tratamento, sugerindo que a terapia estimulou sua produção ($p = 0$) (Figura 10, Tabelas 3 e 4).

As figuras 9-A, 9-B e 9-C mostram a distribuição do colágeno e fibras musculares, após quinze dias da lesão, no grupo lesado e tratado, grupo lesado não tratado e grupo controle normal respectivamente. Observa-se que o grupo tratado apresenta maior quantidade de fibras colágenas distribuídas, apresentando também uma melhor distribuição do colágeno entre as fibras musculares. O grupo lesado não tratado apresenta fibras colágenas agrupadas separadas do tecido muscular.

A quantificação do colágeno dos grupos controle lesado e grupo lesado tratado no décimo quinto dia mostra uma maior quantidade de colágeno no grupo tratado, esta diferença foi estatisticamente significativa ($p = 0,001$) (Figura 10, Tabelas 3 e 4).

A comparação da quantidade de colágeno entre o oitavo e décimo quinto dias nos grupos irradiados mostrou também maior quantidade de colágeno no décimo quinto dia ($p = 0,003$), sugerindo que houve estímulo à produção de colágeno continuou.

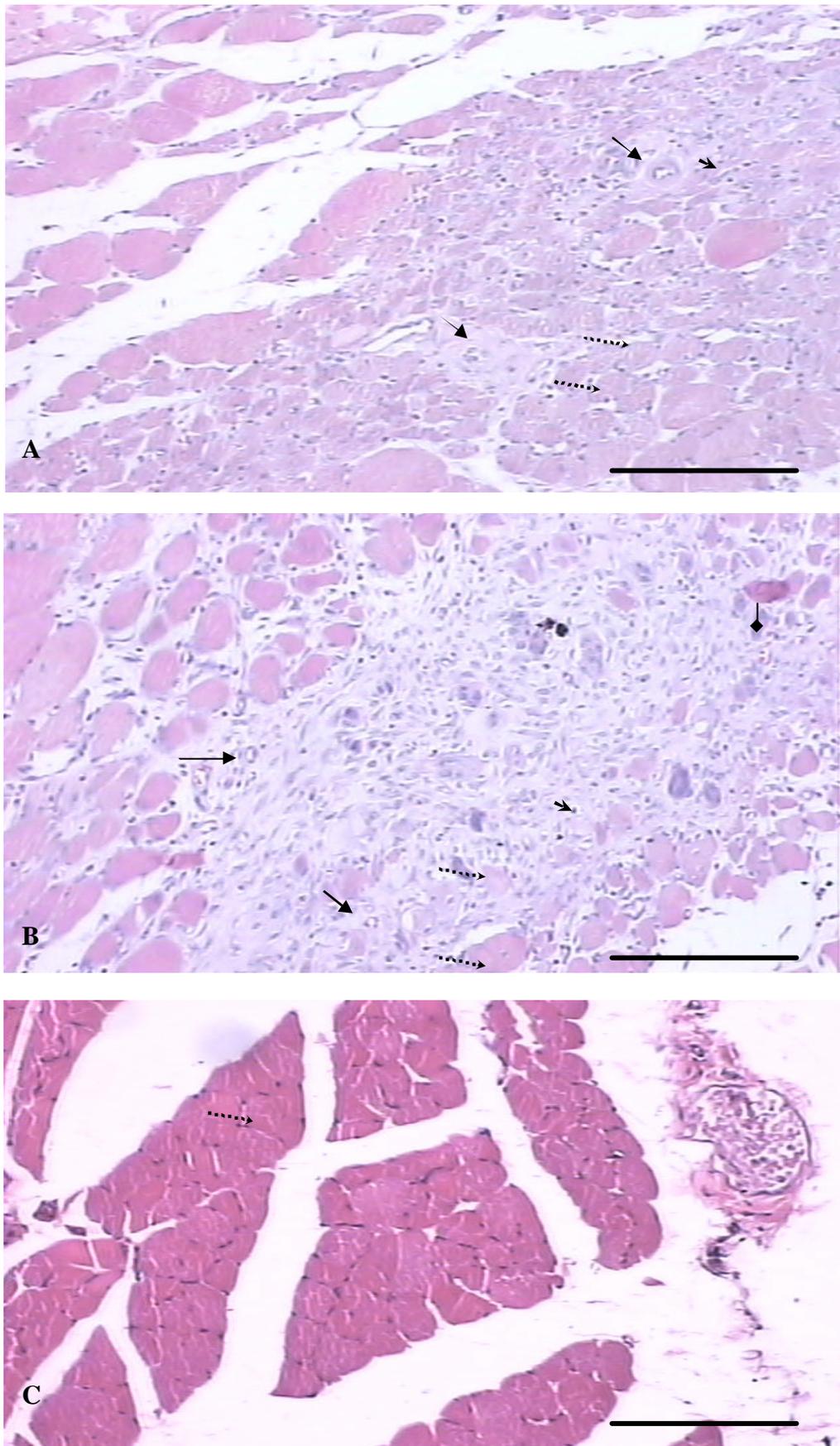


Figura 6 – Fotomicrografias de cortes transversais do músculo gastrocnêmio, corado com HE, 8 dias após a lesão (barra = 100 μ m). **A-** músculo lesado e tratado, **B-** músculo lesado não tratado, **C-** músculo não lesado e não tratado. **Setas pretas:** neovascularização, **cabeça de seta:** células mononucleadas, **setas pontilhadas:** fibras musculares, **seta em losago:** fibroblasto.

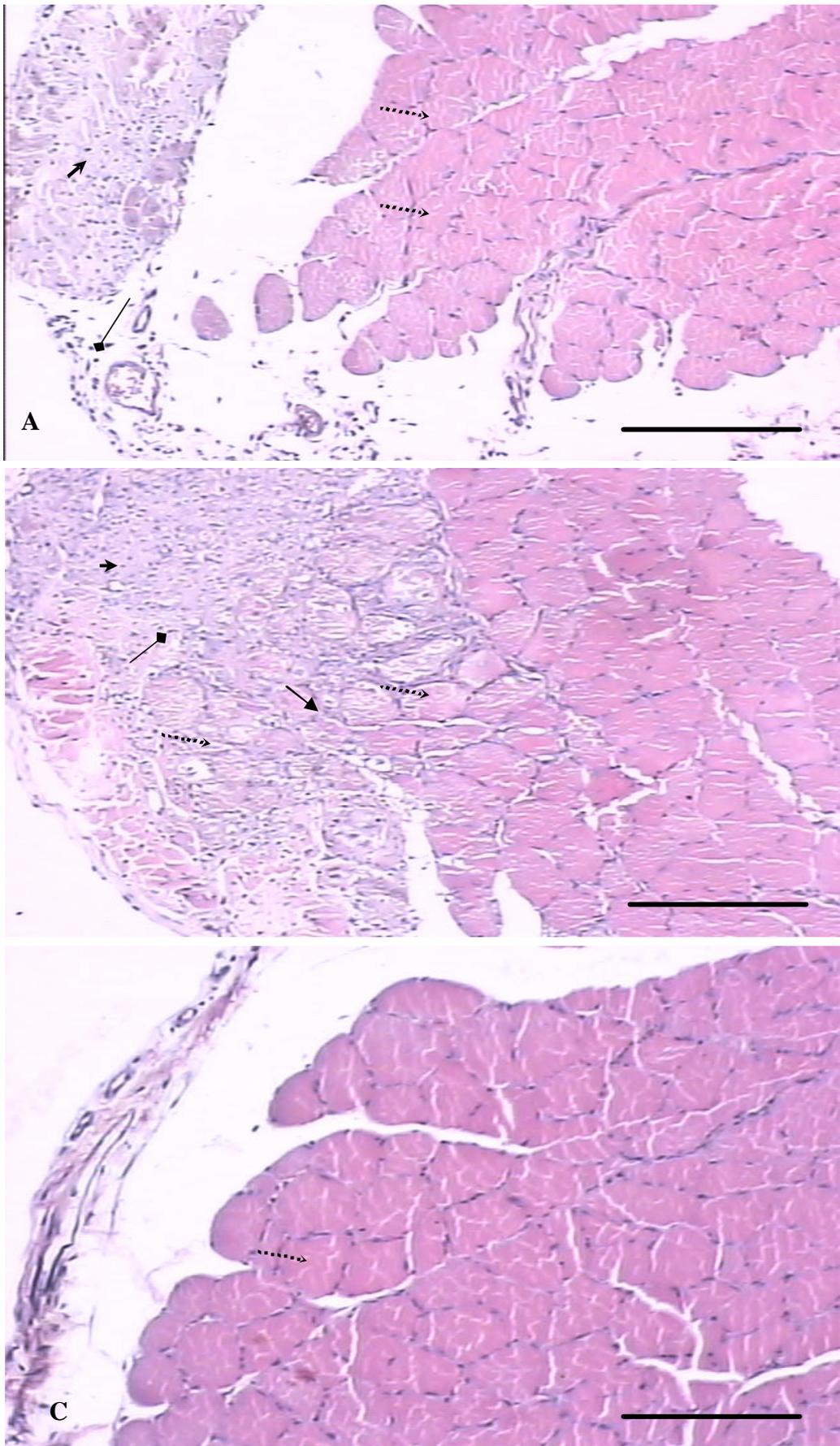


Figura 7 – Fotomicrografias de cortes transversais do músculo gastrocnêmio, corado com HE, 15 dias após a lesão (barra = 100 μ m). **A-** músculo lesado e tratado, **B-** músculo lesado não tratado, **C-** músculo não lesado e não tratado. **Setas pretas:** neovascularização, **cabeça de seta:** células mononucleadas, **setas pontilhadas:** fibras musculares, **seta em losago:** fibroblasto.

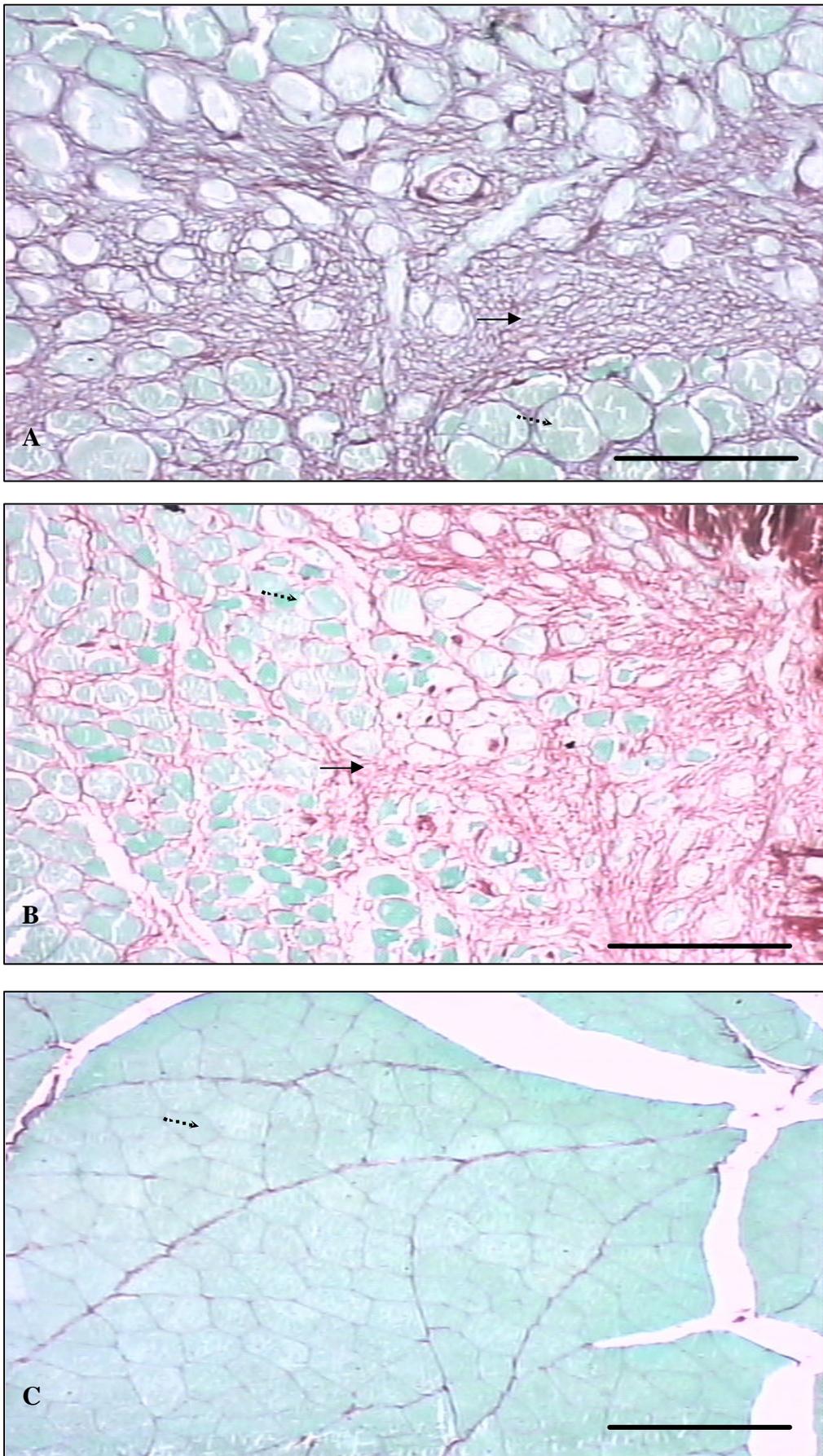


Figura 8 - Análise histológica do tecido muscular com 08 das após lesão. **A** - Grupo lesado não tratado (GCL); **B** - Grupo controle lesado e tratado (GLT); **C**- Grupo controle normal (GCN). Picrosirius e fastgreen . (barra = 100 μ m). **Setas pontilhadas:** fibras musculares, **setas pretas:** tecido conjuntivo.

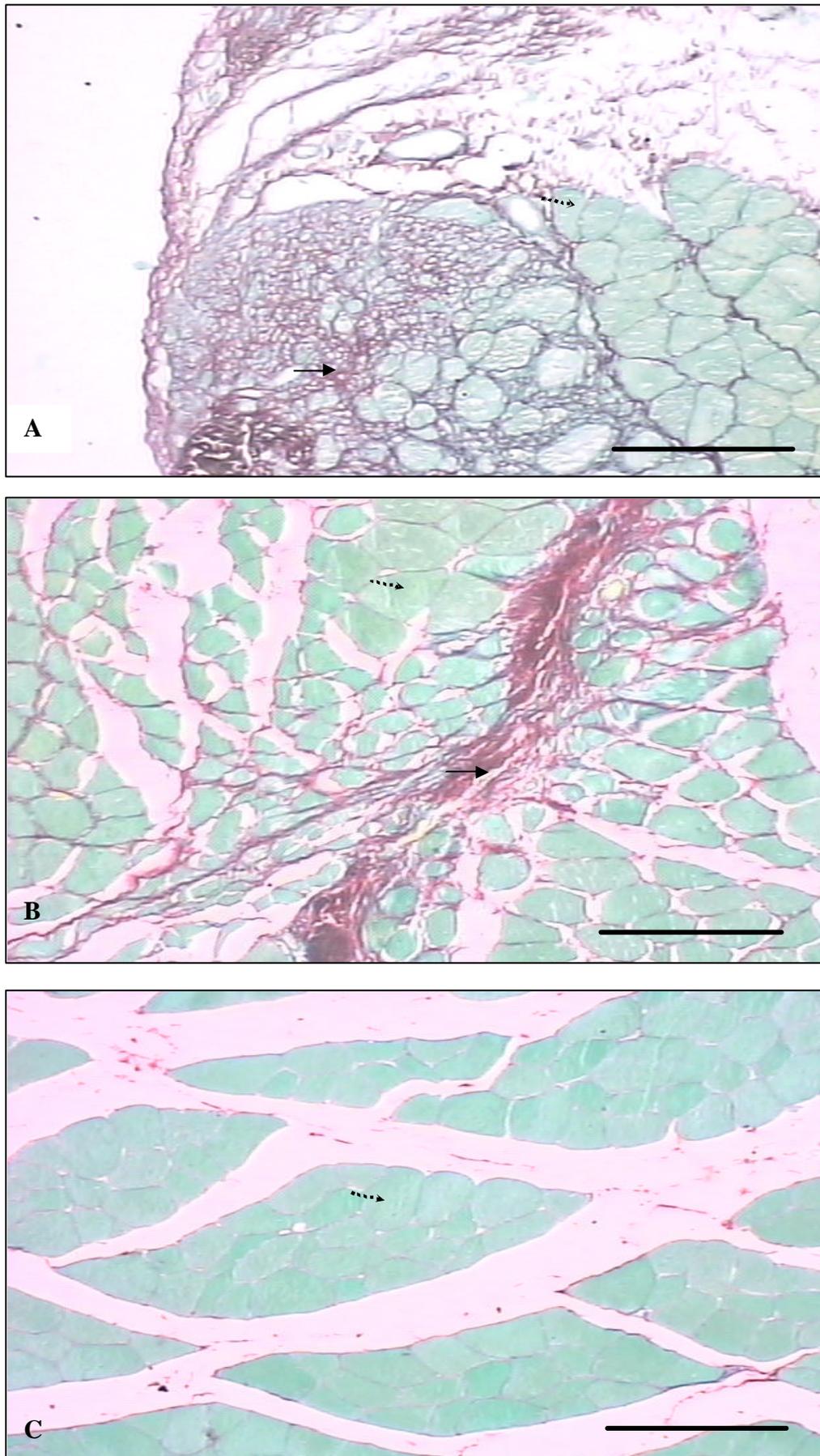


Figura 9 – Análise histológica do tecido muscular com 15 dias após lesão. A – Grupo lesado e tratado (GLT); B – Grupo lesado não tratado (GL); C- Grupo lesado e tratado (GCN). picosirius e fastgreen (barra = 100 μm). **Setas pontilhadas:** fibras musculares, **setas pretas:** tecido conjuntivo.

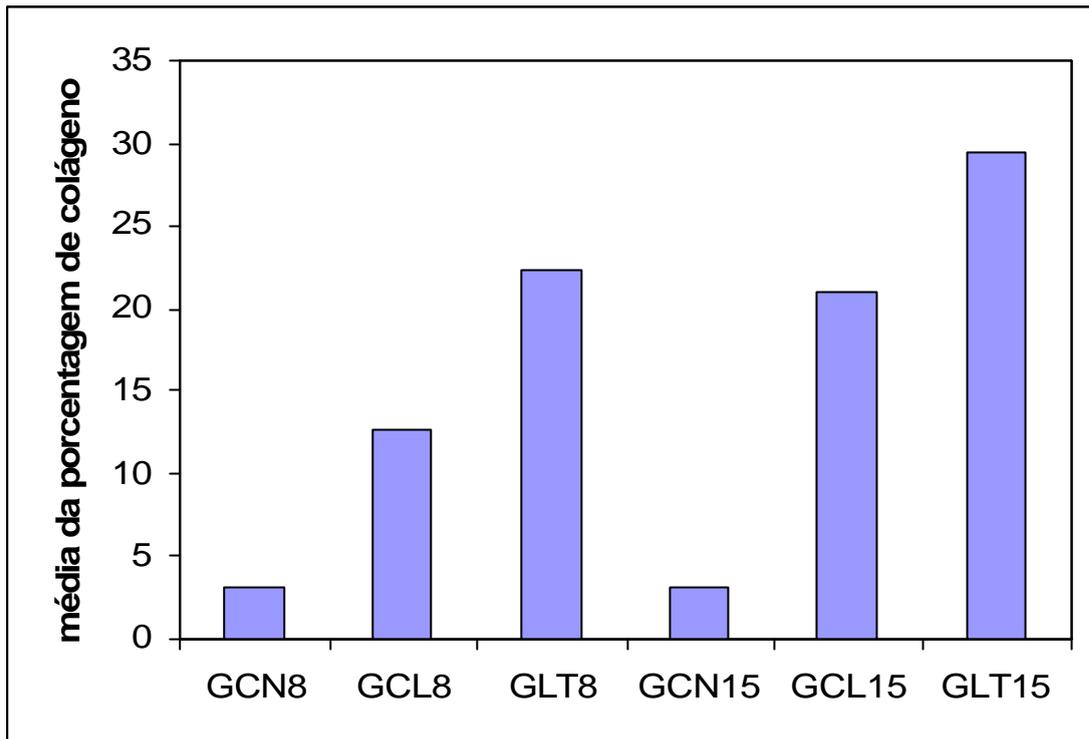


Figura 10 – Médias das porcentagens de colágeno entre os grupos controle normais, controles lesados e grupos lesado- tratados.

GCN8 – grupo controle normal sacrificado no 8º dia pós lesão, **GCN15** - grupo controle normal sacrificado no 15º dia pós lesão, **GCL8** - grupo controle lesado sacrificado no 8º dia pós lesão, **GCL15** – grupo controle lesado sacrificado no 15º dia pós lesão, **GLT8**- grupo lesado e tratado sacrificado no 8º dia pós lesão, **GLT15** – grupo lesado e tratado sacrificado no 15º dia pós lesão.

Tabela 3 - Média e desvio padrão da porcentagem de colágeno para os grupos controles e tratados, sacrificados no 8º e 15º dias após a lesão.

	GCN		GCL		GLT	
	8º dia	15º dia	8º dia	15º dia	8º dia	15º dia
Média	3,125	3,112	12,537	20,962	22,312	29,426
Desvio padrão	±0,80	±0,93	±1,55	±3,35	±1,55	±2,17

GCN – grupo controle normal, **GCL** – grupo controle lesado, **GLT** - grupo lesado e tratado

Tabela 4 – Análise estatística da porcentagem de colágeno entre os grupos controle, lesados e lesados tratados.

GRUPOS	MÉDIAS	P-VALUE
GCN8 GCL8	3,125 12,537	0,00
GCN8 GLT8	3,125 22,312	0,00
GCL8 GLT8	12,537 22,312	0,00
GCN15 GCL15	3,112 20,962	0,00
GCN15 GLT15	3,112 29,425	0,00
GCL15 GLT15	20,962 29,425	0,00
GCL8 GCL15	12,537 20,962	0,00
GLT8 GLT15	22,312 29,425	0,00
GCN8 GCN15	3,125 3,112	0,975

GCN8 – grupo controle normal sacrificado no 8º dia pós lesão, **GCN15** - grupo controle normal sacrificado no 15º dia pós lesão, **GCL8** - grupo controle lesado sacrificado no 8º dia pós lesão, **GCL15** – grupo controle lesado sacrificado no 15º dia pós lesão, **GLT8**- grupo lesado e tratado sacrificado no 8º dia pós lesão, **GLT15** – grupo lesado e tratado sacrificado no 15º dia pós lesão. Nível de significância entre os grupos $p < 0.05$.

Tabela 5 - Análise da celularidade e neovascularização em microscopia de luz e coloração por HE. Resultado das médias dos grupos sacrificados no 8º dia pós lesão. Grupo lesado não tratado e Grupo lesado e tratado.

Médias entre os grupos GL (Grupo lesado) e GLT (Grupo lesado e tratado)

GL x GLT 8 dias	GL (Grupo lesado)		GLT (Grupo lesado e tratado)		P < 0,05
	Média	DP	Média	DP	
Polimorfonucleados	2,25	0,70	2	0,53	0,20
Mononucleados	1,625	0,51	1,87	0,64	0,64
Fibroblastos	1,62	0,51	1,75	0,70	0,47
Neovascularização	1,25	0,46	1,5	0,75	0,43
Células gigantes	0,125	0,35	0,25	0,43	0,55

DP – Desvio padrão

Tabela 6 - Análise da celularidade e neovascularização em microscopia de luz e coloração por HE. Resultado das médias dos grupos sacrificados no 15º dia pós lesão. Grupo lesado não tratado e Grupo lesado e tratado.

Médias entre os grupos GL (Grupo lesado) e GLT (Grupo lesado e tratado)

GL x GLT 15 dias	GL (Grupo lesado)		GLT (Grupo lesado e tratado)		P < 0,05
	Média	DP	Média	DP	
Polimorfonucleados	2,125	0,64	1,875	0,64	0,10
Mononucleados	1,75	0,70	1,5	0,53	0,24
Fibroblastos	2	0,53	1,87	0,35	0,58
Neovascularização	1,5	0,5	1,37	0,51	1,00
Células gigantes	0	0	0,125	0,35	0,33

DP – Desvio padrão

Tabela 7 - Análise da celularidade e neovascularização em microscopia de luz e coloração por HE. Resultado das médias dos grupos sacrificados no 8º e 15º dias após a lesão – Grupos lesados não tratados.

Médias entre grupos GL (Grupo lesado)

GL x GL	GL (Grupo lesado) 8 dias		GL (Grupo lesado) 15 dias		P < 0,05
	Média	DP	Média	DP	
Polimorfonucleados	2,25	0,70	2,125	0,64	0,71
Mononucleados	1,625	0,51	1,75	0,70	1,00
Fibroblastos	1,62	0,51	2	0,53	0,17
Neovascularização	1,25	0,46	1,5	0,5	0,61
Células gigantes	0,125	0,35	0	0	0,33

DP – Desvio padrão

Tabela 8 - Análise da celularidade e neovascularização em microscopia de luz e coloração por HE. Resultado das médias dos grupos sacrificados no 8º e 15º dias após a lesão – Grupos lesados e tratados.

Médias entre os grupos GLT (Grupo lesado e tratado)

GLT x GLT	GLT (Grupo lesado e tratado) – 8 dias		GLT (Grupo lesado e tratado) – 15 dias		P < 0,05
	Média	DP	Média	DP	
Polimorfonucleados	2	0,53	1,875	0,64	0,27
Mononucleados	1,87	0,64	1,5	0,53	0,33
Fibroblastos	1,75	0,70	1,87	0,35	0,66
Neovascularização	1,5	0,75	1,37	0,51	0,70
Células gigantes	0,25	0,43	0,125	0,35	0,55

DP – Desvio padrão

7. DISCUSSÃO

A terapia laser é um dos recursos utilizados em tratamentos fisioterapêuticos aplicados desde a superfície do organismo, como em casos de cicatrização de pele ao tratamento de lesões em tecidos profundos como o osso (BOURGUIGNON-FILHO et al, 2005). Apesar disso, ainda não existem protocolos padronizados para essas diversas aplicações. Neste trabalho foi utilizada a terapia laser de baixa potência no comprimento de onda de 785 nm. Esta escolha baseou-se em estudos realizados por Karu (2003), os quais mostram que os comprimentos de onda com maior potencial para penetração, capazes de atravessar o tecido epitelial, estão entre 750nm a 800 nm, estando, portanto, o comprimento de 785 nm dentro da faixa indicada como capaz de atingir a camada muscular.

Existem vários mecanismos para produção de lesão, como injeções de miotoxina e processos cirúrgicos (LEFAUCHEUR; SEBILLE, 1995; MINAMOTO, 1999; NICOLAU, 2001; ABOU HALA, 2003). Neste trabalho optou-se por utilizar uma forma de produção de lesão que se assemelhasse ao que ocorre na prática de esportes bem como em atividades de vida diária. Assim, foi utilizado o aparelho promotor de lesão, o qual possibilita a realização de lesões por meio de impacto. Ele se mostrou ideal por não ser invasivo, com boa reprodutibilidade e dessa forma, diminuiu os possíveis vieses na produção das lesões.

O músculo gastrocnêmio foi escolhido devido a suas dimensões, localização e por ser de grande importância na movimentação e manutenção de postura. O tamanho do músculo e sua localização facilitaram a realização da lesão, aplicação da terapia laser e também todo o procedimento de retirada do músculo para análise.

O tecido muscular adulto é capaz de se regenerar após uma injúria graças a células mioprecursoras presentes entre as membranas celulares e basais (MAURO, 1961). Vários estudos mostram que essas células sofrem influência de terapias laser sendo estimulada sua proliferação. Além das fibras musculares, o músculo é também formado por tecido conjuntivo, constituído principalmente de fibras colágenas, as quais formam estruturas que envolvem o tecido muscular e são importantes para distribuir as forças geradas pelas fibras musculares e fixarem os músculos aos ossos. Após uma lesão, o colágeno pode atuar no processo de cicatrização com o aumento de sua produção. Esta cicatrização por sua vez pode ser desvantajosa quando contribui para diminuir a capacidade funcional do tecido. Dessa forma, é importante compreender o efeito da terapia laser sobre o colágeno que envolve o tecido muscular.

A literatura traz que a aplicação da radiação laser durante a fase aguda diminui o processo inflamatório (STAINKI, et al, 1998; SCHINDL, et al., 2000), dessa forma foi decidido iniciar o protocolo de aplicação logo após a lesão seguida de três aplicações em dias alternados na dose de 4 J/cm^2 do laser de 785 nm.

A primeira aplicação de laser foi realizada 2 horas após a lesão, com o objetivo de observar os efeitos do laser na fase aguda e conseqüentemente nos primeiros estágios do reparo muscular.

Neste trabalho foi observado que não houve alterações no número de células relacionadas ao processo inflamatório quando comparados os grupos de animais lesados não

submetidos à terapia laser com os grupos de animais tratados com laser de baixa potência. Vários trabalhos utilizando o laser As - Ga tanto em lesão muscular por miotoxina quanto em cultura de células, também demonstram o mesmo efeito (BOUMA et al., 1996; OLIVEIRA et al., 1999).

Com relação à presença de fibras colágenas, houve diferença entre os grupos controle e tratados. No 8º dia houve aumento da quantidade de fibras colágenas no grupo tratado em relação ao grupo controle lesado não tratado e controle normal. No 15º dia também ocorre o aumento da deposição de colágeno no grupo tratado com laser em relação aos grupos controle lesado não tratado e controle normal. Em ambos os casos houve diferença estatisticamente significativa com prevalência de fibras colágenas nos grupos tratados.

Quando comparamos os grupos tratados no 8º e 15º dias, houve diferença estatisticamente significativa com prevalência de colágeno no 15º dia. Quando analisamos somente os grupos lesados e não tratados, ocorre o mesmo, com prevalência de colágeno na fase tardia do processo de reparação muscular.

A utilização de terapia laser 904 nm na dose de 4 J/cm² promoveu a deposição de colágeno em tendões de ratos submetidos à tenotomia do tendão calcâneo, tanto na fase inicial quanto tardia da lesão (TAVARES et al., 2005). No presente trabalho, a dose de 4 J/cm² de laser de 785nm utilizada, também promoveu a deposição do colágeno tanto na fase inicial quanto tardia da lesão, visto que, na comparação entre as quantidades de colágeno nos grupos tratados e lesados não tratados houve a prevalência do colágeno tanto no 8º e 15º dias após a lesão nos grupos submetidos a terapia laser.

A radiação laser pode atuar tanto sobre a proliferação de fibroblastos quanto sobre a produção de colágeno (KARU et al., 1995; FISCHER et al., 2000; SCHINDL et al., 2000; AMARAL et al., 2001; PEREIRA et al., 2002). Em nosso estudo, foi observado que a terapia proposta não surtiu efeito sobre a proliferação dos fibroblastos, portanto, sugere-se que o aumento da síntese do colágeno foi desencadeado pelos fibroblastos presentes no local da lesão.

Estudos realizados por Reddy e colaboradores (1998) mostram que a terapia laser estimula a produção de colágeno em tendão lesionado por cirurgia. Análises bioquímicas revelaram que a quantidade de ligações cruzadas entre as fibras colágenas do grupo tratado era semelhante ao grupo controle indicando que a terapia laser atua de maneira a acelerar a renovação do colágeno.

Segundo Schindl et al. (2000) e Pereira et al. (2002), o efeito cicatrizante do laser é em grande parte explicado pela sua capacidade de aumentar a síntese de colágeno, atuando como mecanismo de exportação do colágeno para o meio extracelular. Em estudos *in vitro* revelaram que a aplicação do laser pode aumentar em 50% os fibroblastos em tecidos humanos (AMARAL et al., 2001). A radiação a laser nos fibroblastos causa um aumento direto na produção do procolágeno, sendo isto em parte explicado pela alteração nos níveis sintetizados de RNAm, induzidos pelo laser de baixa intensidade (SKINNER et al., 1996; YAMAMOTO et al., 1996).

Quando uma terapia laser é aplicada, pode-se obter efeitos tanto estimulatórios quanto inibitórios sobre a proliferação celular ou ativação de seu metabolismo. A lei de Arndt-Schultz indica que existem densidades que não alteram a resposta biológica, doses que

estimulam e doses que inibem a resposta (SOMMER et al., 2001). Estudos *in vitro* utilizando laser de 904 nm mostraram que a irradiação de 3 a 4 J/cm² promove o aumento do número de fibroblastos e que a dose de 5 J/cm² não surtiu efeitos sobre o crescimento celular (PEREIRA, et al., 2002). Já Schindl e colaboradores (2000) encontraram que em cultura de fibroblastos doses acima de 10 J/cm² inibem a produção de colágeno. A dose de 4 J/cm² escolhida neste estudo foi utilizada na expectativa de abordar sua eficiência no rearranjo do colágeno e eficácia quanto ao parâmetro biomodulador sobre fibras colágenas.

Skinmer e colaboradores (1996) encontraram que a radiação laser de 904 nm em cultura de fibroblastos aumentou a síntese de colágeno e não alterou o número de células, resultado também demonstrado em nosso experimento com o laser de 785nm. Eles encontraram também que a síntese de colágeno foi maior quando foram feitas aplicações por mais de quatro dias. Pogrel e colaboradores (1997) ao utilizarem radiação laser de 830 nm, com diferentes doses e tempos de aplicação, em cultura de fibroblastos e encontraram que não houve estímulo à proliferação, migração e adesão de fibroblastos. Outros trabalhos utilizando o mesmo comprimento de onda mostraram que este atua sobre o processo de cicatrização acelerando suas fases, abreviando a fase de exudação e acelerando a fase de reparação, e ainda, diminuindo o edema, melhorando o tecido de granulação nas lesões, estimulando a proliferação de fibroblastos e miofibrosblastos e deste modo aumentando a deposição organizada de colágeno, além de estimular a formação de retículo endoplasmático, de mitocôndrias e de miofibrilas (MEDRADO et al., 2003; PUGLIESE et al., 2003).

Outro trabalho utilizando comprimentos de onda de 635 nm e 780 nm, próximos ao utilizado neste trabalho mostrou não haver efeito sobre o crescimento do colágeno. E ainda o laser a 3-4 J/cm² tem intenso efeito sobre o crescimento do colágeno (PEREIRA et al., 2002).

De acordo com Letho et al. (1985), a produção de colágeno em músculo lesionado inicia-se dois dias após a lesão e é mais intensa entre os 5º e 21º dias e diminui logo após. No presente trabalho estudo observou-se que no 8º e 15º dia ainda havia produção de colágeno. Como não foi observada a proliferação de fibroblastos, sugere-se que a irradiação laser estimulou a síntese de colágeno.

Amaral *et al.* (2001), avaliaram o efeito do laser HeNe com comprimento de onda de 632.8 nm e potência de 2,6 mW, com doses 2,6, 8,4 e 25 J/cm² aplicados durante cinco dias consecutivos, sobre a pele do músculo tibial anterior lesado, e constataram que somente a dose de 2,6 J/cm² proporcionou aumento da fibra muscular e densidade mitocondrial.

A recuperação muscular pode ocorrer também pelo reparo do tecido muscular por meio do preenchimento da área de lesão por células miogênicas as quais irão recuperar a fibra lesada ou pela formação de nova fibra muscular a partir de células mio-precursoras (ROTH; ORUN, 1985). Neste trabalho não foram observadas alterações no tamanho da fibra, na posição do núcleo que pudessem indicar a regeneração muscular tanto no grupo tratado quanto no controle. Oliveira e colaboradores (1999), em seus estudos sobre o efeito do laser AsGa (904 nm) com doses de 3 e 10 J/cm² na regeneração de músculo esquelético lesado com miotoxina observaram também que ambas as doses não promoviam efeitos sobre o processo de regeneração muscular.

Sabemos que entre as principais funções do colágeno no tecido muscular está a transmissão da força produzida pelos feixes de miofibrilas para todo o tecido muscular, serve de passagem para vasos e nervos e também atua na limitação da elasticidade. A organização

do colágeno no músculo sadio ou lesionado é de suma importância para a funcionalidade muscular, podendo o excesso aliado à desorganização causar barreiras mecânicas que inibem a função e/ou regeneração muscular.

No campo da fisioterapia, a reabilitação com sucesso depende do retorno da funcionalidade do músculo acometido, vários protocolos de tratamentos são empregados com o objetivo de promover uma restauração tecidual rápida, mas sem alteração nas atividades normais. A terapia laser é um método muito usado dentro dos mais variados protocolos empregados, e o que se tem visto é que a terapia laser, apesar de muito estudada, ainda gera controvérsias e dúvidas sobre seu efeito na cicatrização do tecido muscular.

8. CONCLUSÃO

Segundo a metodologia utilizada para análise, a terapia laser de baixa potência com laser Al-Ga-As com comprimento de onda de 785 nm com potência de 4 J/cm² aplicado logo após a lesão seguida de quatro aplicações em dias alternados indicou que:

- Houve aumento estatisticamente significativo de colágeno no músculo tratado com laser, porém, sem o aumento do número de fibroblastos, sugerindo que a terapia promove o aumento da síntese de colágeno.
- Este procedimento terapêutico não alterou a resposta inflamatória quanto ao número de polimorfonucleares e células mononucleadas no tecido lesado.
- Sugere-se que sejam feitas investigações, através de testes biomecânicos, no sentido de descobrir se o aumento na deposição do colágeno promovida pelo laser promove alguma limitação na elasticidade muscular.

REFERÊNCIAS

- ABOU HALA, A. Z. **Efeito da Radiação Laser e da Radiação Infravermelha em Músculo Tibial Anterior de Rato Submetido ao Processo de Fadiga Muscular**.58f. 2003. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica). UNIVAP – Universidade do Vale Paraíba. São Jose dos Campos – SP.2003.
- AHTIKOSKI, A. M.; KOSKINEN, S. O. A.; VIRTANEN, P.; KOVANEN, V.; TAKALA, T. E. S. Regulation of synthesis of fibrillar collagens in rat skeletal muscle during immobilization in shortened and lengthened positions. **Acta Physiol Scand**. v. 172. p.131-140.2001.
- ALBERTS, B.; RAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M. ROBERTS, K. WATSON, J.D. **Biologia Molecular da Célula**. 3.ed. Porto Alegre: Artes Médicas. 1998.
- ANDERS, J.J.;BORKE, R.C.; WOOLERY, S.K.; VAN DE MERWE, W.P. Low power laser irradiation alters the rate of regeneration of the rat facial nerve. **Laser in Surgery and Medicine**. v. 13, n. 1, p. 72-75.1993.
- ALLBROOK, D. Muscle Regeneration. **Physiotherapy**. v.59, p.240-247. 1973.
- AMARAL, A. C.; PARIZOTTO, N. A.; SALVINI, T .F. Dose-dependency of Low-energy HeNe laser effect in regeneration of Skeletal muscle in mice. **Lasers Med Sci**. v.16, p.44-51. 2001.
- ASAKURA, A. Sterm cells in adult skeletal Muscle. **TCM**. v.13, n.3, p.123 – 126, 2003.
- BAXTER, G.D. **Therapeutic laser**. Edinburg: Churchil Livingstone, 1997.
- BEN-DOV, N.; SHEFER, G.; IRINITCHEV, A.; WERNIG, A.; ORON, U.; HALEVY, O. Low-energy laser irradiation affects satellite cell proliferation and differentiation in vitro. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1448, p.372-380. 1999.
- BERETTA, D.C. **Influência da estimulação elétrica transcutânea na cicatrização do tendão do ventre lateral do músculo gastrocnêmio em coelhos**. 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências veterinárias) UFU – Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia – MG. 2005.
- BISCHOFF, R. A satellite cell mitogen from crushed adult muscle. **Dev. Biol** v.115, p.140 - 147. 1986.
- BODINER-FOWLER, S. Skeletal muscle regeneration after injury: an overview. **Journal of Voice**. v.8, n.1, p.53-62.1994.
- BORGES, D.S. et al. Influência do laser de Arseneto de Gálio sobre a dor no modelo experimental de contorção. **Rev Bras Fisio**. v.1, n.1,p.1-19.1996.
- BOURGUIGNON-FILHO, A.M.; FEITOSA, A.C.R.; BELTRÃO, G.C.; PAGNONCELLI, R. M.Utilização do Laser de Baixa Intensidade no Processo de Cicatrização Tecidual. **Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial** v.46, p.37 – 43, 2005

BOUMA M.G.; BUURMAN W.A. Low energy laser irradiation fails to modulate the inflammatory function of human monocytes and endothelial cells. **Laser Sug. Med.** v.19. p.207-215. 1996.

BRUGNERA, A. J. ; PINHEIRO, A. L. B. **Lasers na Odontologia.** São Paulo: Pancast 1998, p.100-115.

BULYAKOVA, N. V.; ZUBKOVA, S. M.; AZAROVA. V. S.; VARAKINA, N. I.; MIKHAILIK, L. V. Effect of pulsed laser radiation on regeneration of injured muscles with different regeneration capacities and state of the Thymus. **Doklady Biological Science.** v.382, n.2, p.65-70. 2002.

COLLS, J. Enfoque conceptual de las radiaciones eletromagnéticas. **Boletim Del Centro de Documentacion Laser de Meditec.** n.15/16, p.1-5, 1988.

COTRAN, R.S.; ROBBINS, S.L. **Patologia funcional e estrutural.** Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2000. p.44-47.

FISCHER, B. D.; RENNIE, S.; WARREN, S.; MAGEE D.; KOH, J. The effects of low power laser therapy muscle haling following acute blunt trauma. **J Phys Ther Sci.** v.12, n.1,p.49-55. 2000.

FREITAS, I.G.F.; BARANAUSKAS, V.M.A. Laser effects on osteogenesis. **Applied Surface Sci.** n. 154-155, p.548-554, 2000.

GUIRRO, E. ;GUIRRO, R. **Fisioterapia Dermato-funcional.** 2.ed. São Paulo. Ed. Manole, 2002.

GUM, S. L.; REDDY, K.; BITTEL-STEHNO, L.; ENWEMEKA, C. S. Combined ultrasound, electrical stimulation and laser promote collagen synthesis with moderate changes in tendon biomechanics. **Am J Phys Med Rehabil.** v.76, p.288-296, 1997.

HACZEKI, O. ; TAMURA, M. Near infrared quadruple wl spectrophotometry of the rat head. **Adv Exper Med Biol.** v.248, p.63-66.1989.

HURNE, T.; KALIMO, H. Activation of myogenic precursor cells after muscle injury. **Medicine and Science Sports Medicine.** v.24, n.2, p.197-205.1992.

HUSMANN, I.; SOULET, L.; GAUTRON, J.; MARTELLY I.; BARRITAUULT, D. Growth Factors in Skeletal Muscle Regeneration. **Cytokine & Growth Factor Reviews.** v.7, n.3, p.249-258, 1996.

JÄRVINEN, M. healing of a crush injury in rat striated muscle: study of the effect of early mobilization and immobilization on the repair processes. **Acta Path Micorbiol Scand.** v 83, p.269-282. 1975.

JARVINEN T.A.; JOZSA L.; KANNUS P.; JARVINEN T.L.; JARVINEN M. Organization and distribution of intramuscular connective tissue in normal and immobilized skeletal muscles. An immunohistochemical, polarization and scanning electron microscopic study. **J. Muscle Res Cell Motil.,** v.23, p. 24554- 24559, 2002.

KARU, T. **Low-Power Laser Therapy.**[s.l.]: Biomedical Photonics Handbook. 2003. 26p.

- KARU, T.; PYATIBRAT, L.; KALENDO, G. Irradiation with He-Ne laser increase ATP level in cells cultivated in vitro. **Journal Photochemistry and Photobiol.** v.27, n.3, p.219-223.1995.
- KASEMKIJWATTANA, C.; MENETREY, J. BOSCH, P.; SOMOGYI, G.; MORELAND, M. S.; FU, F. H.; BURAMAPANITKIT, B.; WATKINS, S. S.; HUARD, J. H. Use of growth factors to improve muscle healing after strain injury. **Clinical Orthopaedics and Related Research.** v.370, p.272-285. 2000.
- LAAKSO, L.; RICHARDSON, C.; CRAMOND, T. Factors affecting low level laser therapy. **Australian Journal of Physiotherapy.** v. 39, n.2, p.95-99. 1993.
- LEFAUCHEUR, J. P. and SÉBILLE, A. The cellular events of injured muscle regeneration depend on the nature of the injury. **Neuromusc Disord.** v.5, n.6, p.501-509. 1995.
- LEHMANN, J.F. ; LATEUR,B.J. Diatermia e calor superficial, laser e crioterapia. In: **Tratado de Medicina Física e Reabilitação de Krusen.** Rio de Janeiro. Manole. 1994, p. 277-316.
- LISTRAT, A.; PICARD, B.; GEAY, Y. Age-related changes and location of type I, III, IV, V and VI collagens during development of four foetal skeletal muscles of double-muscled and normal bovine animals. **Tissue & Cell.** v.31,n.1, p.17-27, 1999.
- MARQUES, A.P. **Cadeias Musculares.** São Paulo. Manole. 2000, p.7-12.
- MAURO, A. Satellite cells of skeletal muscle fibers. **J Biophys Biochem Cytol,** p. 493-495, sept.1961.
- McARDLE, W.D.;KATCH, F.I.; KATCH, V.L. **Fisiologia do Exercício: energia, nutrição e desempenho humano.** 4.ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 1998.
- MEDRADO, A. P.; PUGLIESE, L. S.; REIS, S. R. A.; ANDRADE, Z. A. Influence of low level laser therapy on wound healing and its biological action upon myofibroblasts. **Lasers in Surgery and Medicine,** v. 32, p.239-244. 2003
- MESTER, A. F. ; MESTER, A. Wound Healing. **Lasers Therapy.;** v.1, n.1, p.7-12. 1989.
- MESTER, E. Experimentation on the interaction between infrared laser and wound healing. **Exper Chirurg,** v.2, p.94, 1969.
- MESTER, E; KORENVI-BOTH, A; SPIRY, T; TISZA S. The effect of laser irradiation on the regeneration of muscle fibers (preliminary report). **Z Exp Chir.** v.8, p. 258-62, 1975.
- MICHALANY, J. **Técnica histológica em anatomia patológica.** São Paulo: Ed. Pedagógica e Universitária, 1980. 277p.
- MINAMOTO, VB; GRAZZIANO, CR; SALVINI, TF. Effect of single and periodic contusion on the rat soleus muscle at differ-ent stages of regeneration. **Anatomical Record,** v.254, p. 281-287,1999.
- NICOLAU, RENATA AMADEI. **Efeito do laser de baixa potência (As-Ga-Al) em tecido ósseo de rato submetido à lesão, analisado por histomorfometria óssea.** 2001. Dissertação

(Mestrado em Engenharia Biomédica) UNIVAP – Universidade do Vale do Paraíba. São José dos Campos – SP. 2001.

NISHIMURA, A. L.; TAKAHASHI, K. Relationship between structural properties of intramuscular connective tissue and toughness of various chicken skeletal muscles. **Meat Science.**; v.43, n.1, p.46-49. 1996

OLIVEIRA NUNO M. L., Nivaldo A . Parizzoto, Tania F. Salvini. GaAs (904-Nm) Laser Radiation Does Not Affect Muscle Regeneration in Mouse Skeletal Muscle. **Laser in Surgery and Medicine.** v.25, p.13-21, 1999.

PEREIRA, A. N.; EDUARDO, C. P.; MATSON, E.; MARQUES, M.M. Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. **Lasers in Surgery and Medicine.** v. 31, p.263-267.2002.

POGREL, M. A.; CHEN, J. W.; ZHANG, K. Effects of low-energy gallium-aluminum-arsenide laser irradiation on cultured fibroblasts and keratinocytes. **Lasers in Surgery and Medicine.** v.20, p.426-432.1997.

PUGLIESE, L. S.; MEDRADO, A. P.; REIS, S. R. A.; ANDRADE, Z. A. The influence of low-level laser therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers. **Pesqui. Odontol Bras.** v.17, n.4, 2003.

REDDY, G. K.; BITTEL-STEHNO, L.; ENWEMEKA, C. S. Laser photostimulation of collagen production in healing rabbit achilles tendons. **Lasers in Surgery and Medicine.** v.22, n.55, p.281-287.1998.

ROACH, D. M.; FITRIDGE, R. A.; LAWS, P. E.; MILLARD, S. H.; VARELIAS, A.; COWLED, P. A. Up-regulation of MMP-2 and MMP-9 leads to degradation of type IV collagen during skeletal muscle reperfusion injury; protection by the MMP inhibitor, doxycycline. **Eur J Vasc Endovasc Surg.** v.23, p.260-269.2002.

ROTH, D.; ORON, U. Repair mechanisms involved in muscle regeneration following partial excision of the rat gastrocnemius muscle. **Espl. Cell Biol.**, v.53, p.107-114, 1985.

SEALE, P.; RUDNICKI, M.A. A new look at the origin, function, and "stem-cell" status of muscle satellite cells. **Dev. Biol.**, .v. 218, p.115–124. 2000.

SCHINDL, A.; SCHINDL, M.; SCHÖN, H. P.; SCHINDL, L. Low-intensity laser therapy: a review. **Journal of Investigative Medicine.** v.48, n.5, p.312-236. 2000

SHEFER, G.; BARASH, I.; ORON, U.; HALEVY, O. Low-energy laser irradiation enhances de novo protein synthesis via its effects on translation-regulatory proteins in skeletal muscle myoblasts. **Biochimica et Biophysica Acta.** n.1593, p.131-139, 2003.

SHEFER, G.; PARTRIDGE, T. A.; HESLOP, L.; GROSS, J. G.; ORON, U.; HALEVY, O. Low-energy laser irradiation promotes the survival and cell cycle entry of skeletal muscle satellite cells. **Journal of Cell Science.** v.115, n.7, p.1461-1469,2002.

SKINNER, S. M.; GAGE, J. P.; WILCE, P. A; SHAW, R. M. A preliminary study of the effects of laser radiation on collagen metabolism in cell culture. **Australian Dental Journal.** v.41, p.188-192, 1996.

SOMMER, A. P.; PINHEIRO, A. L.B.; ADAM, R.; MESTER, R. P. F. WHELAN, T. H. Biostimulatory Windows in Low-Intensity Laser Activation: Laser, Scanners, and, NASA's Light- Emitting Diode Array System. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**. v. 19, p. 29-33, 2001.

STAINKI, D. R.; RAISER, A. G.; GRAÇA, D. L.; BECKER, C.; FERNANDEZ, G. M. S. The gallium arsenide (GaAs) laser radiation in the radial nerve regeneration submitted to secondary surgical repair. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v.35, n.1, p.37-40.1998.

TAVARES, M. R.; MAZZER, N.; PASTORELLO, M. Efeito do laser terapêutico na cicatrização tendinosa: estudo experimental em ratos. **Fisioterapia Brasil**. v.6, p.96-101, 2005.

WILLIAMS, P. E.; GOLDSPIK, G. Connective tissue changes in immobilized muscle. **Journal of Anatomy**. v.138, p.343-350, 1984.

WILMORE, J.H.; COSTILL, D.L. **Fisiologia do Esporte e do Exercício**. 2.ed. São Paulo:Manole. 2001.

ZAMMIT P.S.; BEAUCHAMP J.R. The skeletal muscle satellite cell: stem cell or son of stem cell?. **Differentiation** v.68, n.4-5, p.193-204, 2001.

YAMAMOTO, Y; KONO, T.; KOTANI, H.; KASAI, S.; MITO, M. Effect of low-power laser on procollagen synthesis in human fibroblasts. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**. v.14, n.3, p.129-132. 1996.

ANEXOS

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVAP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo n.º L098/2005/CEP, intitulado “*Efeito da irradiação laser de baixa potência Arsenieto de Gálio Alumínio (AsGaAl) 785 nm sobre a cicatrização de lesão muscular: estudo experimental*”, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Newton Soares da Silva, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal (COBEA/Junho de 1991) e segue as Normas Para a Prática Didático-Científica da Vivisseção de Animais (Lei 6638 de 08/05/1979) sendo, portanto, **aprovado** por esta Comissão de Ética em Pesquisa.

Informamos que o pesquisador responsável por este Protocolo de Pesquisa deverá apresentar a este Comitê de Ética um relatório das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação.

São José dos Campos, 17 de junho de 2005.



PROF. DR. LANDULFO SILVEIRA JUNIOR
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa da UNIVAP

Análise da celularidade e neovascularização em microscopia de luz e coloração por HE do tecido muscular de ratos submetidos a lesão e não tratados, sacrificados no 8º dia pós lesão.

<i>Grupo controle lesado/ 8º dia pós lesão</i>								
Animal	1	2	3	4	5	6	7	8
Polimorfonucleados	+++	++	++	+	+++	++	++	+++
Mononucleados	++	++	++	++	+	+	++	+
Fibroblastos	+	++	++	+	++	++	++	+
Neovascularização	+	+	+	+	++	++	+	+
Células gigantes	-	-	-	-	-	+	-	-

Análise da celularidade e neovascularização em microscopia de luz e coloração por HE do tecido muscular de ratos submetidos a lesão e não tratados, sacrificados no 15º dia pós lesão.

<i>Grupo controle lesado/ 15º dia pós lesão</i>								
Animal	1	2	3	4	5	6	7	8
Polimorfonucleados	++	++	+++	++	+++	+	++	++
Mononucleados	+	++	+++	++	+	++	+	+
Fibroblastos	+++	++	++	++	++	+	++	++
Neovascularização	++	++	++	+	+	+	+	+
Células gigantes	-	-	-	-	-	-	-	-

Análise da celularidade e neovascularização em microscopia de luz e coloração por HE do tecido muscular de ratos submetidos a lesão e tratados, sacrificados no 8º dia pós lesão.

<i>Grupo lesado tratado/ 8º dia pós lesão</i>								
Animal	1	2	3	4	5	6	7	8
Polimorfonucleados	+	++	++	++	++	++	++	++
Mononucleados	+	++	++	++	+	++	+	+
Fibroblastos	+	++	++	+	+++	++	++	+
Neovascularização	++	+	+	+	++	+	+++	+
Células gigantes	-	-	+	-	-	-	+	-

Análise da celularidade e neovascularização em microscopia de luz e coloração por HE do tecido muscular de ratos submetidos a lesão e tratados, sacrificados no 15º dia pós lesão.

<i>Grupo lesado tratado/ 15º dia pós lesão</i>								
Animal	1	2	3	4	5	6	7	8
Polimorfonucleados	+	++	++	+	++	+	++	++
Mononucleados	+	++	+	++	+	+	+	+
Fibroblastos	++	++	++	+	++	++	++	++
Neovascularização	++	+	+	+	+	++	++	+
Células gigantes	-	-	+	-	-	-	-	-