

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

**EFEITO DA RADIAÇÃO LASER DE BAIXA POTÊNCIA SOBRE O  
MÚSCULO GASTROCNÊMIO DE RATO SUBMETIDO À LESÃO  
MECÂNICA**

**Marcelo Marcos Medeiros Luz**

**São José dos Campos - SP  
2005**

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

**EFEITO DA RADIAÇÃO LASER DE BAIXA POTÊNCIA SOBRE O  
MÚSCULO GASTROCNÊMIO DE RATO SUBMETIDO À LESÃO  
MECÂNICA**

**Marcelo Marcos Medeiros Luz**

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

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Cláudia Santos  
Oliveira.

Co-Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Maria de  
Fátima Rodrigues Silva

**São José dos Campos - SP  
2005**

L994e

Luz, Marcelo Marcos Medeiros

Efeito da radiação laser de baixa potência sobre o músculo gastrocnêmio de rato submetido à lesão mecânica/

Marcelo Marcos Medeiros Luz. São José dos Campos:

UNIVAP, 2005.

74f: il; 30cm.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, 2005.

1. Terapia a Laser de baixa intensidade 2. Músculos 3. Fisioterapia Oliveira, Cláudia Santos, Orient. II. Título

CDU: 615.3

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processo fotocopiador ou transmissão eletrônica.

Aluno: Marcelo Marcos Medeiros Luz - 

Data: São José dos Campos, 30 de junho de 2005.

**“EFEITO DA RADIAÇÃO LASER DE BAIXA POTÊNCIA SOBRE O MÚSCULO  
GASTROCNEMIO DE RATO SUBMETIDO À LESÃO MECÂNICA”**

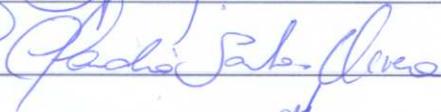
Marcelo Marcos Medeiros Luz

Banca Examinadora:

Prof. Dr. EGBERTO MUNIN (UNIVAP)



Profª. Dra. CLAUDIA SANTOS OLIVEIRA (UNIVAP)



Profª. Dra. MARIA DE FÁTIMA RODRIGUES SILVA (Univ. Rio Verde)



Prof. Dr. FOUED SALMEN ESPINDOLA (UFU)



Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco  
Diretor do IP&D - UniVap  
São José dos Campos, 27 de junho de 2005.

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha mãe Francisca Martins P. Luz,  
pelo amor incondicional e por sempre me incentivar  
a estudar mais; a minha filha Maria Fernanda G.R.Luz e a  
minha esposa Fernanda Giroto R. Luz,  
pela ajuda, paciência, apoio,  
compreensão e por fim pela nossa união  
em todas as etapas de nossas vidas.  
A Deus, por tudo.

## AGRADECIMENTO ESPECIAL

Agradeço de forma especial, as minhas orientadoras Profas. Dras. Cláudia Santos Oliveira e Maria de Fátima Rodrigues Silva, pelo incentivo, amizade, confiança, simplicidade e pelos seus valores como mestras, que certamente contribuíram para o meu crescimento, enriquecimento profissional e para a realização deste trabalho.

## AGRADECIMENTOS

Ao magnífico Reitor da Universidade do Vale do Paraíba Professor Dr. Baptista Gargione Filho, pelo seu espírito empreendedor que contribuiu no fornecimento de apoio financeiro e tecnológico para o desenvolvimento da pesquisa.

Ao Diretor do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco e ao Diretor da Faculdade de Ciências da Saúde, Prof. Dr. Renato Amaro Zângaro, pela oportunidade concedida ao meu crescimento profissional.

A minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dra. Cláudia Santos Oliveira pela ajuda, compreensão e apoio na elaboração deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Foued Salmen Espíndola e ao Prof. Dr. Egberto Mundin, que me deram a honra de compor a Banca Examinadora desta dissertação;

Aos Professores do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da UNIVAP pelos ensinamentos no decorrer do curso.

Ao Professor Dr. Marcelo Emílio Beletti pela ajuda e paciência dedicada no ensino da estatística e análise das lâminas utilizada no estudo.

Aos amigos Getúlio Antônio de Freitas Filho e Arthur Siqueira Rodrigues, pela amizade e companheirismo nas longas horas de viagens.

Aos amigos da UFU, Romeu, Ismair, Prof. Mundin e Vicente pelo essencial e inestimável apoio durante a experimentação.

Aos grandes amigos que pude formar durante a realização deste trabalho, Evandro Machado e Hugo Sanchez.

Ao grande amigo Jean Luiz de Sousa que sempre se fez presente. Aos colegas do curso de Pós-graduação em Engenharia Biomédica, pela amizade e companheirismo.

Às secretárias Cláudia e Ivone, e à equipe da Biblioteca Central da UNIVAP e Setorial do IP&D pela competência e profissionalismo.

Aos animais de experimentação (ratos) que tiveram suas vidas sacrificadas/ceifadas para a realização deste trabalho.

A todos aqueles que direta e indiretamente tiveram uma parcela de participação, colaborando no desenvolvimento do trabalho. Muito Obrigado!

## RESUMO

O músculo é um tecido biológico que possui plasticidade, sofrendo remodelamento frente a diversos estímulos. Também é o mais afetado por atividades do esporte e traumas, assim sendo a rápida recuperação deste tecido com a manutenção de suas propriedades mecânicas é importante para o indivíduo. Vários estudos indicam a eficiência do laser para a modulação da resposta inflamatória em tecidos da pele, tendões, músculos e ossos. O objetivo deste trabalho foi detectar quantitativa e qualitativamente os efeitos da radiação a *laser* de 785 nm no reparo do músculo gastrocnêmio pós-trauma mecânico. Foram utilizados 48 ratos da linhagem Wistar, que tiveram seus músculos gastrocnêmios lesados por meio de um impacto promovido pela queda de um pino de impacto sobre o músculo denominado Aparelho Promotor de Trauma Mecânico. Foram divididos aleatoriamente em três grupos: Grupo Controle (GCN), Grupo Lesado (GCL) e Grupo Lesado e Tratado (GLT), todos contendo 16 animais. O grupo GLT recebeu radiação de laserterapia do tipo pontual de contato com 10Jcm<sup>2</sup> no 1<sup>o</sup>, 3<sup>o</sup>, 5<sup>o</sup> e 7<sup>o</sup> dia. O grupo GL não recebeu a terapia *laser*, mas foi realizado efeito placebo utilizando o *laser* desligado. O Grupo GC não foi submetido ao trauma nem à terapia *laser*. Análises histomorfométrica foram realizadas no oitavo e décimo quinto dia após a lesão. As análises morfométricas indicaram que a terapia a **laser** melhorou a distribuição do colágeno no músculo, as análises histológicas mostraram que não houve alterações no processo inflamatório; quanto ao número de polimorfonucleares, fibroblastos, macrófagos e monócitos e nas células musculares em relação aos grupos controle. Portanto, concluiu-se que doses de 10/cm<sup>2</sup> de Al-Ga-As do laser de 785 nm não promoveram mudanças no processo inflamatório, mas melhoraram a distribuição das fibras colágenas entre as fibras musculares. O conhecimento de seus efeitos vem contribuir com a Fisioterapia oferecendo ao profissional uma alternativa de terapia que amenize ou evite a perda de fibras musculares e mudanças no tecido conjuntivo que altere a plasticidade muscular.

**Palavras chave:** Lesão, Músculo, Colágeno, Laser 785 nm, inflamação, histologia

## ABSTRACT

The muscle is a biological tissue that possesses plasticity, suffering a remodelling when under the influence of several stimulations. It is also the most affected by traumas and activities related to sports, in a way that a fast recovery of this tissue, maintaining its mechanical proprieties, is important to an individual. Many studies indicate the efficiency of laser to the modulation of the inflammatory response in skin tissues, tendons, muscles and bones. The goal of this study was to detect, concerning quantity and quality, the effects of the Al-Ga-As laser radiation on the repairing of the gastrocnemius muscle after a mechanical trauma. 48 mice of the Wistar lineage were used, having their gastrocnemius muscles injured due to an impact occasioned by a mechanical trauma-causing device. They were randomly divided in three groups: Control Group (CGN), Injured Group (GCL), and Injured and Treated Group (GLT), all containing 16 animals. The ITG received lasertherapy irradiation in puntual form with a 10 J/cm<sup>2</sup> intensity on the first, third, fifth and seventh days. The CGN didn't receive the lasertherapy, but a placebo effect was conducted using the Al-Ga-As laser switched off. The CGN wasn't subjected neither to the trauma nor to the lasertherapy. Histomorfometric analysis were held on the eighth and fifteenth days after the injury. The morfometric analysis indicated that the laser therapy improved the collagen tissue's distribution in the muscle, the histologic analysis showed that there were no alterations in the inflammatory process regarding the number of polymorphonuclear cells, fibroblasts, macrophages and monocytes and in the muscular cells in comparison with the control groups. As a consequence, it's possible to conclude that 10/cm<sup>2</sup> doses of Al-Ga-As of the 785 nm laser didn't cause changes in the inflammatory process, but improved the collagen fibers ditribution among muscular fibers. Therefore the knowlwdge of its effects comes as contribution to Physiotherapy offering to the professional an alternative therapy that decreases or even avoids the loss of muscular fibers, as well as **decreases** or even avoids changes in the conjunctive tissue that alter the muscular plasticity.

**Key-Words:** Injury, Muscle, Collagen, Laser 785 nm, histology, inflammation

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1.1. Objetivo geral .....	4
1.1.2. Objetivos específicos .....	4
2. O LASER COMO RECURSO TERAPÊUTICO .....	5
2.1. Definição E Histórico .....	6
2.2. Características Do Laser .....	6
2.3. Efeitos Do Laser De Baixa Potência .....	7
2.4. O Laser Na Lesão Muscular .....	10
2.5. O Laser E O Colágeno .....	12
2.6. O Laser Arseneto De Gálio E Alumínio (Al-Ga-As) .....	13
3. O TECIDO MUSCULAR .....	15
3.1. A Estrutura Muscular .....	16
3.2. Colágeno Muscular .....	17
3.3. Lesão Muscular .....	19
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	26
4.1. Animais De Experimentação .....	27
4.2. Grupos Experimentais .....	27
4.3. Mecanismo De Lesão .....	28
4.4. Equipamento Promotor De Lesão .....	28
4.5. Equipamento De Laser .....	29
4.6. Terapia Com Laser De Baixa Potência .....	30
4.7. Coleta De Material .....	31
4.8. Análise Histológica .....	32
4.9. Coloração Por Vermelho Picrosirius .....	33
4.10. ANÁLISE Estatística .....	33
4.11. Análise De Imagem .....	33
5. RESULTADOS .....	34
5.1. Caracterização Por Microscopia Da Lesão Utilizada No Estudo .....	35
5.2. Caracterização Macróscopica Do Músculo LESADO .....	35
5.3. Caracterização do processo inflamatório dos músculos tratados .....	35

5.4. Aspectos Morfológicos Das Fibras Musculares 8 Dias Após A Lesão.....	36
5.5. Aspectos Morfológicos Das Fibras Musculares 15 Dias Após A Lesão.....	36
5.6. Análise Morfométrica Do Colágeno 8 Dias Após A Lesão .....	37
5.7. Análise Morfométrica DO Colágeno 15 Dias Após A Lesão .....	37
6. DISCUSSÃO .....	44
9. CONCLUSÃO .....	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	50

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Equipamento promotor de trauma mecânico (PTM).....	29
<b>Figura 2</b> – Equipamento Laser Physiolux Dual da Bioset – Al-Ga-As com comprimento de onda de 785 nm. ....	30
<b>Figura 3</b> – Técnica de aplicação do laser Al-Ga-As 785 nm sobre o músculo gastrocnêmio. ....	31
<b>Figura 4</b> – Técnica cirúrgica para retirada do músculo gastrocnêmio.....	31
<b>Figura 5</b> - Corte transversal do músculo gastrocnêmio corado com HE, 24 horas após a lesão. ....	36
<b>Figura 6</b> – Cortes transversais do músculo gastrocnêmio, corado com HE, 8 dias após a lesão causada por impacto .....	38
<b>Figura 7</b> – Cortes transversais do músculo gastrocnêmio, corado com HE, 15 dias após a lesão causada por impacto.....	38
<b>Figura 8</b> – Cortes transversais do músculo gastrocnêmio, corado com sirius red e fast green, 8 dias após a lesão causada por impacto .....	39
<b>Figura 9</b> - Cortes transversais do músculo gastrocnêmio, corado com sirius red e fast green, 15 dias após a lesão causada por impacto.....	40
<b>Figura 10</b> - Porcentagem de colágeno entre os grupos controle (lesados) e lesados / tratados.....	41

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Divisão dos animais em grupos e cronograma de sacrifício.....	27
<b>Tabela 2</b> – Protocolo de radiação com laser de As-Ga-Al.....	30
<b>Tabela 3</b> - Calculo da média e do desvio padrão para os grupos GC, GL e GLT nos 8° e 15° após lesão.....	42
<b>Tabela 4</b> – Análise histomorfometrica da porcentagem de colágeno entre os grupos grupos controle, lesados e tratados. ....	43

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- ADM** – Amplitude de Movimento
- ADP** – Adenosina Difosfato
- Al-Ga-As** – Arseneto de Gálio Alumínio
- AMP** - Adenosina Monofosfato
- Anilab** – Animais de Laboratório de Paulínia
- Ga-As** – Arseneto de Gálio
- ATP** – Adenosina Trifosfato
- FGF** – Fator de Crescimento de Fibroblastos
- cm** – Centímetro
- cm<sup>2</sup>** – Centímetro Quadrado
- CO<sub>2</sub>** - Dióxido de carbono
- DE** – Densidade de Energia
- DNA** – Ácido Desoxirribonucléico
- DP** – Densidade de Potência
- FHC** – Fator de Crescimento Hepáticos
- g** – grama
- GCL** – grupo controle lesado
- GCN** – grupo controle normal
- GLT** – grupo lesado tratado
- HeNe** – Hélio Neônio
- HILT** – High Intensity Laser Therapy
- Hz** – Hertz
- IGF1** – Fator de Crescimento Semelhante a Insulina
- J/cm<sup>2</sup>** – Joules por Centímetro Quadrado
- LAP** – Laser de Alta Potência
- LBP** – Laser de Baixa Potência
- LDH** – Lactatodesidrogenase
- LEA** - Laboratório de Experimentação Animal
- LIF** – Fator Inibidor de Leucemia
- LLLT** – Low Level Laser Therapy

**mg/kg** – Miligrama por kilograma  
**mL** – Mililitro  
**mmol/L** – Milimol por litro  
**ms** – Milisegundos  
**mW** – Miliwatts  
**N<sub>2</sub>** - Nitrogênio  
**nm** – Nanômetros  
**°C** – Graus Celsius  
**pH** – Potencial Hidrogeniônico  
**PSR** – Pricosirius red  
**PTM** – Promotor de Trauma Mecânico  
**RNA** – Ácido Ribonucléico  
**RNA<sub>m</sub>** – Ácido Ribonucleico Mensageiro  
**s** – Segundos  
**TLBP** – Terapia Laser de Baixa Potência  
**U/L** – Unidades por Litro  
**UFU** – Universidade Federal de Uberlândia  
**V** – Volts  
**W** – Watts  
**W/cm<sup>2</sup>** – Watts por centímetro quadrado  
**μm** – Micrômetro

## **1. INTRODUÇÃO**

A perspectiva para a utilização do **laser** de baixa potência como forma terapêutica tem sido investigada desde a década de 60. Os estudos realizados mostram que esta forma de radiação pode estimular processos biológicos, em especial, os processos de reparo tecidual (MESTER *et al.* 1969).

Dentre os tecidos biológicos, o músculo é o mais plástico, ou seja, 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 da 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.

Essas 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, as quais contribuem para mudanças das funções propriedades biomecânicas do músculo (WILLIAMS; GODSPINK, 1984; TIBARY *et al.*; 1972; WILLIAN; GODSPINK, 1984; JARVINEN *et al.*, 2002)

As intervenções fisioterapêuticas procuram amenizar estes efeitos adversos como diminuir o tempo de imobilização, estímulo de movimentos controlados e aplicações de terapias que atuando na diminuição do processo inflamatório e que estimulam o reparo do tecido muscular com a 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. A alteração destes parâmetros pode 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*, não há 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.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Investigar os efeitos de 4 aplicações de  $10 \text{ J/cm}^2$  de laser de 785 nm, em dias alternados e iniciados 2 horas após a lesão sobre o processo inflamatório e fibras do tecido conjuntivo no músculo esquelético de ratos submetidos à lesão por trauma mecânico.

### 1.1.2 Objetivos específicos

Analisar o efeito da terapia **laser** sobre a distribuição e quantidade do colágeno sobre o músculo lesionado por meio de estudos histomorfométricos;

Avaliar o efeito da terapia **laser** proposta sobre a evolução do processo inflamatório no músculo lesionado por meio de estudos histológicos.

## **2. O LASER COMO RECURSO TERAPÊUTICO**

## 2.1 DEFINIÇÃO E HISTÓRICO

O termo **laser** é um acrônimo para *Lihgt Amplification by Stimulated Emission of Radiation* cujo significado é amplificação da luz por emissão estimulada de radiação. Os princípios que delinearão a geração deste tipo de luz foram desenvolvidos por Albert Einstein e Maiman, na década de 60 produziu 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 (MAIMAN, 1960; MESTER, *et al.* 1969).

A radiação **laser** é uma onda eletromagnética constituída por um feixe de fótons coerentes e 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 Arseneto de Gálio ou Arseneto de Gálio e Alumínio, levando assim à produção de um feixe de luz, que pode ser visível ou não, dependendo do comprimento de onda (LEHMANN; LATEUR, 1994; KARU *et al.*, 1995; BAXTER, 1998).

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

## 2.2 CARACTERÍSTICAS DO LASER

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 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 espacial e temporal** (BAXTER, 1998; 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, não obstante a luz é absorvida em tecidos superficiais e profundos gerando alterações metabólicas celulares (HACZEKI; TAMURA 1989).

A possibilidade de estimulação em pequenos pontos e a emissão de altas densidades de energia fazem 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 potência 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).

### **2.3 EFEITOS DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA**

O **laser** terapêutico induz as alterações atérmicas nos tecidos estimulados e interage com os mesmos distribuindo sua radiação enquanto transita nos tecidos, por causa da variabilidade nos índices refrativos dos tecidos, provocam alargamento

espacial do feixe e perda de coerência. O **laser** é capaz de estimular tecidos específicos, devido à função fotorreguladora das células orgânicas (GUIRRO; GUIRRO, 2002).

Segundo Karu *et al.* (1995) e Pogrel *et al.* (1997), existem fotorreceptores celulares, sensíveis a determinados comprimentos de onda, que ao absorverem fótons desencadeiam reações químicas, desta forma aceleram, em curto prazo, a síntese de ATP (glicolítica e por oxidação fosforilativa) e, em longo prazo, pela transcrição e replicação do DNA (REDDY *et al.*, 1998; SCHINDL *et al.*, 2000).

O **laser**, de modo geral, modula vários processos biológicos, aumentando a atividade mitocondrial, a síntese de ATP (adenosina trifosfato) e o consumo de oxigênio, facilitando a cicatrização tecidual, promovendo a angiogênese e a regeneração em vários tecidos (KARU *et al.*, 1995; BEN-DOV *et al.*, 1999; SHEFER *et al.*, 2002; SHEFER *et al.*, 2003).

O efeito da terapia **laser** sobre tecidos biológicos depende de vários fatores. 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 interferem no efeito da terapia (KARU *et al.*, 1995; SCHINDL *et al.*, 2000; AMARAL *et al.*, 2001; PEREIRA *et al.*, 2002).

Outros efeitos bioquímicos são as liberações 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).

O efeito bioelétrico é explicado pela produção de ATP (adenosina trifosfato) e mobilidade iônica, levando à potencialização da bomba de sódio e potássio e o efeito

bioestimulante no qual ocorre a normalização do contingente energético do indivíduo (GUIRRO; GUIRRO, 2002).

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, a reabsorção de exsudatos, eliminação de substâncias alógenas e estímulo à microcirculação, à interferência na mensagem elétrica, através da manutenção do potencial de membrana, estímulo na liberação de beta endorfinas, redução na síntese de prostaglandinas, alterando no metabolismo das serotoninas, e mantendo o equilíbrio energético no local da lesão através da manutenção da permeabilidade normal de vênulas e arteríolas.

Cotran e Robbins (2000), 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 à modulação celular. O efeito antiedematoso também é explicado pelo estímulo à 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 resultado estimulante deve ter intensidade entre 0.5 J/cm<sup>2</sup> e 4.0 J/cm<sup>2</sup>, 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 em que a proliferação e regeneração celular são baixas, como no caso dos músculos.

Guirro e Guirro (2002) descreveram um esquema orientador, no qual o efeito analgésico é atingido de 2 a 4 J/cm<sup>2</sup>, o efeito antiinflamatório e circulatório de 1 a 3 J/cm<sup>2</sup>, e o efeito cicatrizante de 3 a 6 J/cm<sup>2</sup>.

## 2.4 O LASER NA LESÃO MUSCULAR

Segundo Amaral *et al.* (2001), Shefer *et al.* (2002) e Shefer *et al.* (2003), o **laser** tem demonstrado grande utilidade na cicatrização e regeneração do tecido muscular, principalmente quando aplicado nos instantes iniciais da lesão. Existem evidências de que ele favorece a regeneração e a maturação celular neste tecido, aumentando a mobilidade mioblástica, induzindo a proliferação de células satélites e proteínas regulatórias do ciclo celular, aumentando o número de miofibrilas jovens e a neoformação de vasos sanguíneos intramúsculo na área irradiada e aumento na síntese de ATP (adenosina trifosfato).

Amaral *et al.* (2001), ainda relatam em seus estudos que com a dose de 2.6 J/cm<sup>2</sup> pode-se ter mudanças significantes com o laser He-Ne, como o aumento de fibras e maior densidade mitocondrial, indicando regeneração muscular.

Corroborando com o supracitado Bulyakova *et al.* (2002), relatam que o **laser** realmente estimula a regeneração e o aumento da secção transversal do tecido muscular lesado, por meio do estímulo à formação de miofibrilas, estimulando a formação de novos capilares na região irradiada e com isso, aumento do fluxo sanguíneo e inibição do processo inflamatório local. A comprovação deste fato deu-se após submeter ratos com o músculo lesado à radiação iônica e posteriormente aplicando laser nos mesmos.

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, inibe a sua diferenciação. Eles também concluíram que a idade 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 têm papel fundamental na regulação da transcrição do RNA mensageiro. Outro fator estimulante da 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 realizados sobre o efeito da terapia laser Al-Ga-As (670nm) em feridas cutâneas nas doses de 4 e 8 J/cm<sup>2</sup> mostraram que a dose de 4 J/cm<sup>2</sup> foi mais eficiente que a dose de 8 J/cm<sup>2</sup> 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 organizado 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 à 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 Ben-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.

## 2.5 O LASER E O 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* revelou-se 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, causado pelo laser de baixa intensidade (SKINNER *et al.*, 1996; YAMAMOTO *et al.*, 1996).

Schindl *et al.* (2000), citam que o aumento da síntese de DNA nos fibroblastos foi conseguido com a intensidade de 0.5 J/cm<sup>2</sup>, e que o laser estimula o fator de crescimento dos fibroblastos e miofibroblastos, e conseqüentemente a síntese colágena.

No entanto, Skinner *et al.* (1996), conseguiram este mesmo efeito com a intensidade variando entre 0,09-0,5 J/cm<sup>2</sup>. 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 obtiveram resultados significativos 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 (BEN-DOV *et al.*, 1999; BULYAKOVA *et al.*, 2002).

A aplicação do laser leva à proliferação fibroblástica, à síntese colágena e à formação de matriz extracelular. O estímulo ao tecido conjuntivo leva à diferenciação dos miofibroblastos, que têm 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  $1 \text{ J/cm}^2$  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 sendo de 3 a 10 minutos, e verificaram que tempos mais prolongados de terapia a laser não causam efeito cumulativo, portanto, não se preconizam fazer aplicações prolongadas para obtenção de maiores sínteses de procolágeno.

## **2.6 O LASER ARSENETO DE GÁLIO E ALUMÍNIO (AL-GA-AS)**

O laser Arseneto de gálio e alumínio (Al-Ga-As) é uma forma de laser invisível ao olho humano, com comprimento de onda geralmente de 830 nm, e na Europa tem sido muito difundido e utilizado pelos profissionais da saúde, principalmente por fisioterapeutas (POGREL *et al.*, 1997).

Nicolau (2001) utilizou este laser com comprimento de onda de 660 nm em ratos submetidos à lesão óssea do fêmur e analisando os resultados através da histomorfometria concluiu que este recurso induz à remodelação óssea, além disso, fez uma ampla pesquisa sobre a atuação desta forma de laser em lesões ósseas que comprovaram sua eficiência neste tipo de lesão.

Morrone *et al.* (2000a), utilizaram em seus estudos o laser Al-Ga-As com comprimento de onda de 780 nm, com o intuito de regeneração óssea e cartilaginosa, e verificou que este recurso acelerou a cicatrização nestes tecidos estudados.

Morrone *et al.* (2000b), verificaram ainda que o laser ora citado também produz efeitos biológicos em células sem lesão prévia, atuando sobre os íons cálcio e na fosfatase alcalina. O laser utilizado em tal experimento era de 780 nm, e o autor sugere a sua utilização em cartilagem articular lesada e não-lesada.

A utilização deste laser também foi comprovada nos estudos de Bülow *et al.* (1994), que observaram sua eficácia em osteoartrite de joelho em pacientes na redução da dor provocada por esta doença.

A eficácia do laser Al-Ga-As (780 nm) no processo inflamatório como auxílio na redução da dor é de grande utilidade, já que estimula a liberação de opióides endógenos no organismo após a aplicação do laser, sendo assim, sua aplicação deve ser utilizada nos momentos iniciais de qualquer tipo de lesão aos tecidos biológicos (HONMURA *et al.*, 1993).

A radiação laser, neste caso com comprimento de onda de 810 nm, também foi eficaz no aumento do fluxo microcirculatório arterial e capilar, podendo desta forma atuar em processos algicos agudos ou crônicos e inflamações agudas ou crônicas (TULLBERG *et al.*, 2003).

### **3. O TECIDO MUSCULAR**

### 3.1 A ESTRUTURA MUSCULAR

O músculo é constituído por vários tipos de tecidos, dentre eles o tecido nervoso, o vascular e o conjuntivo. As fibras musculares são células com aspecto longo e fino, com vários núcleos localizados na periferia e apresentando células satélites, as quais são mioblastos inativos ativados em lesão muscular (ALBERTS *et al.*, 1998; WILMORE; COSTILL, 2001; POWERS; HOWLEY, 2002).

A membrana celular no músculo é denominada sarcolema, o retículo endoplasmático chama-se retículo sarcoplasmático (armazena o cálcio muscular), o citoplasma é chamado de sarcoplasma, e este contém as proteínas e organelas musculares, além das miofibrilas. As miofibrilas são estruturas numerosas subdivididas em várias estruturas denominadas sarcômeros, que abrigam proteínas contráteis, as miosinas, as quais constituem os filamentos grossos, a actina formadoras dos filamentos finos que também apresentam tropomiosina e troponina em sua constituição (McARDLE *et al.*, 1998; WILMORE; COSTILL, 2001; POWERS; HOWLEY, 2002).

A denominação músculo estriado se deve à alternância de bandas claras e escuras ao longo das fibras, mais especificamente nos sarcômeros musculares, ou unidade funcional da fibra, sendo as primeiras denominadas banda I - formada pelos filamentos de actina - e a segunda banda A – filamentos de miosina (WILMORE; COSTILL, 2001; POWERS; OWLEY, 2002).

Os músculos individuais são separados 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 é o endomísio. A função destas camadas de tecido conjuntivo é permitir que a força de contração gerada em cada fibra individualmente atue sobre o músculo inteiro, pois na maioria das vezes as fibras não se estendem por todo o músculo (NISHIMURA; TAKAHASHI, 1996; McARDLE *et al.*, 1998; FISCHER *et al.*, 2000; WILMORE; COSTILL, 2001; POWERS; HOWLEY, 2002).

Ambas proteínas intramusculares, o colágeno e a elastina, promovem a elasticidade e a flexibilidade. Grande parte da fibra muscular é formada pelo citoesqueleto, este composto por filamentos de proteínas ordenadas simetricamente no sarcoplasma (HAMILL; KNUTZEN, 1999; FISCHER *et al.*, 2000).

### 3.2 COLÁGENO MUSCULAR

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

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. Relatam, também, que o colágeno tipo I tem grande importância na força tênsil tecidual e papel na limitação da elasticidade, enquanto o colágeno tipo III tem estrutura e função semelhante e possui maior número de fibras elásticas.

No músculo esquelético adulto, cinco tipos de colágeno são encontrados: os tipos I, III, IV, V e VI, sendo 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).

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, é rico em substância intracelular, 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 alteram 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.

Os músculos dos membros superiores e inferiores têm relação direta com a concentração de colágeno, desta forma os músculos de resistência, ou de contração lenta, têm maior quantidade de colágeno comparado aos músculos de geração de força, ou contração rápida (LISTRAT *et al.*, 1999).

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 de limitar a expansão e evitar a laceração do tecido (PUGLIESE *et al.*, 2003).

No processo de lesão muscular observam-se altos níveis do fator de crescimento (TGF- $\beta$ 1), o qual estimula a deposição de colágeno (SATO *et al.*, 2003).

### **3.3 LESÃO MUSCULAR**

Os traumas musculares podem acarretar lesões de grande magnitude, macrotraumas, ou lesões de pequena magnitude, microtrauma, com resposta inflamatória dependente da magnitude e do grau de vascularização do músculo atingido (MERRICK, 2002).

A magnitude da resposta inflamatória é de suma importância, pois esta resposta agrega vários tipos de leucócitos, resultando no aumento do edema tissular e efeitos danosos a células periféricas ao local, aumentando o dano final e o tecido necrosado (JÄRVINEN, 1975; HERBERT *et al.*; 2001).

Segundo Järvinen (1975), Minamoto *et al.* (1999) e Sato *et al.* (2003), independentemente do tipo e do mecanismo de lesão existem alterações morfológicas e metabólicas que devem ser consideradas.

Independente do tipo de lesão (mecânica, térmica, isquêmica, ou por substâncias tóxicas) à 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).

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 (COTRAN; ROBBINS, 2000).

Como consequência do trauma, há a ruptura da membrana celular: o sarcolema, causando extrusão das organelas para o meio extracelular. O sarcolema, formado principalmente por componentes lipídicos, é uma membrana com relativa fragilidade, desta forma pequenos traumas podem levar a deterioração sarcoplasmática, no entanto o sarcolema tem capacidade regenerativa que restaura sua propriedade contrátil (GONZALEZ-SERRATOS *et al.*, 1996).

Após um trauma, ou outro mecanismo de lesão, tem-se uma lesão primária diretamente decorrente ao mecanismo, e em decorrência dos danos e do processo de defesa têm-se a lesão secundária. Na lesão primária há acometimento de vários tecidos relacionados ao músculo, como o conjuntivo e nervoso; nesta lesão ocorre hemorragia seguida por coagulação e formação de hematoma, edema, diminuição do fluxo sanguíneo e resposta inflamatória, ocasionando lesão do sarcolema e organelas celulares, alteração da homeostase e conseqüentemente morte/necrose celular. A lesão secundária ocorre por mecanismo enzimático - os lisossomos ativam enzimas como as proteases, fosfolipases e hidrolases, as quais lesam as fibras musculares; e por hipóxia - a hemorragia, a hemostasia, o espasmo e o processo inflamatório prejudicam o fluxo

sangüíneo nas áreas adjacentes a lesão, levando à diminuição de oxigênio (MERRICK, 2002).

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 à deposição de tecido conjuntivo e formação de cicatriz muscular, além disso, durante este período as células satélites são ativadas e se proliferam no sítio da lesão. Com o aumento destas células precursoras de mioblastos, elas se fundem para formar miotúbulos, os quais se maturam para formar novas células musculares (KASEMKIJWATTANA *et al.*, 2002).

O músculo esquelético tem uma considerável capacidade de regeneração resultante de uma lesão parcial ou total da fibra muscular, sendo 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 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.

Sobre a vascularização, Järvinen (1975) e Lefaucheur e Sébille (1995) afirmaram que possui um papel chave no sucesso da reparação tecidual no músculo, devendo ser regulada para que não prejudique o processo cicatricial.

De acordo com Danilov *et al.* (1996), a fase proliferativa inicia-se em 36 horas após a lesão e inclui a ativação de fatores de crescimento e células miogênicas, proliferação e aparecimento de mioblastos.

Todo músculo lesionado segue fases de degeneração e regeneração. Nos 3 primeiros dias o músculo encontra-se em processo inflamatório agudo e segue em regeneração até o 21º dia após a lesão. Nas primeiras horas e dias pós-lesão, existe uma reação catabólica levando à quebra de proteínas musculares, seguida por uma reação anabólica com formação de tecido cicatricial e novas fibras musculares. O sarcolema ao redor da lesão é infiltrado por fibroblastos e fibras colágenas, sendo que a produção colágena pós-lesão inicia-se no 5º dia e continua até o 21º dia, decaindo sua produção após esta data (FISCHER *et al.*, 2000; AMARAL, *et al.*, 2001).

Ainda sobre a cronologia da cicatrização muscular 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), do 2º ao 4º dia miofibrilas com coloração clara aparecem na zona central da lesão, do 3º ao 4º os fagócitos aparecem e são observados até o 6º dia, e observa-se ainda nestes dias degradação da matriz extracelular. A fosfatase alcalina desaparece entre os dias 2 e 3. No 5º dia algumas fibras em regeneração começam ser observadas junto as miofibrilas que sobreviveram ao trauma e o diâmetro destas novas fibras cresce até o 14º dia. A partir do 10º dia o músculo em regeneração começa a ser reinervado, sendo esta primordial para a maturação das novas de novas miofibrilas. A acetilcolinesterase é observada na periferia das miofibrilas sobreviventes no dia 11, e junto aos miotúbulos regenerados no dia 14. No 18º dia todas as miofibrilas regeneradas aparecem com o núcleo centralizado e sua organização em fascículos se iguala ao músculo adulto. A resposta fibrótica muscular aumenta significativamente entre os dias 10 e 14 pós-lesão, diminuindo substancialmente sua produção após esta data (KASEMKIJWATTANA *et al.*, 2002).

O processo inflamatório muscular provoca alterações nos níveis de trocas iônicas na membrana do sarcolema, como nos casos dos íons sódio, potássio e cálcio, alterando por consequência a homeostasia da célula, podendo levar à morte de fibras musculares. Dentre os íons, o influxo do cálcio é o maior responsável pela morte celular (RENAUD *et al.*, 1996; MERRICK, 2002).

Além disso, em uma lesão do tecido muscular observa-se também edema celular, aumento da permeabilidade na microcirculação, produção de radicais livres pelas células lesadas, os quais ocasionam maior lesão celular, mudanças eletrolíticas nas mitocôndrias e degradação da membrana fosfolipídica (GRISOTTO *et al.*, 2000).

Segundo Hurme 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 síntese destas células deve começar antes que o tecido de granulação e cicatricial se prolifere excessivamente e atrapalhe a regeneração através do intervalo dos cotos das miofibrilas lesionadas.

A destruição mitocondrial é o maior causador de morte de fibras musculares por levar à diminuição na produção de ATP. A morte mitocondrial pode ser por 3 causas: 1- hipóxia ou isquemia; 2- reperfusão com sangue concentrado de radicais livres, os quais lesam as organelas celulares; e 3- influxo de cálcio, devido a este íon ser um regulador das enzimas mitocondriais (MERRICK, 2002).

A matriz extracelular pode promover a regeneração muscular de várias maneiras. Primeiramente, fazer com que as membranas basais das células necróticas auxiliem a fusão das células precursoras (células satélites) aos miotúbulos. Secundariamente serve como reservatório de vários fatores de crescimento e ainda serve como regulador do processo de regeneração. E 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 a perda de seu alinhamento natural e desorganiza as fibras musculares (JÄRVINEN, 1975; ALBERTS, 1998).

Marques (2000) relata ainda que, quanto maior o tempo de imobilização do músculo maior, será a deposição de colágeno, e conseqüentemente maior o tempo necessário para recuperação da força e amplitude de movimento do segmento.

O processo de regeneração muscular caracteriza-se por necrose do tecido muscular, inflamação local e proliferação de células satélites, sendo estas consideradas precursoras de novas células musculares no músculo lesado (BEN-DOV *et al.*, 1999).

As células satélites foram descritas inicialmente por Alexander Mauro em 1961, quando ao realizar estudos de microscopia eletrônica de fibras musculares esqueléticas de sapo, observou a presença de células mononucleadas intimamente associadas a essas fibras, localizadas entre a membrana plasmática e membrana basal. (MAURO, 1961).

Elas são capazes de se multiplicarem e têm uma considerável motilidade. Funcionam como progenitoras de núcleos de miofibrilas e são provavelmente adicionadas durante o crescimento pós-natal do músculo e durante a regeneração muscular funcionam como células-tronco da miogênese para produzir mioblastos que se alinham, usando como suporte as lâminas basais remanescentes, ou migram nos interstícios para produzir uma nova fibra (CAMPION, 1984; RANTENEN *et al.*, 1995).

Após uma lesão ou outro tipo de estímulo, as células satélites tornam se ativas, proliferam por divisão mitótica e se fundem umas às outras para formar novas fibras musculares esqueléticas. Enquanto a lâmina basal permanecer íntegra, os mioblastos fusionam dentro dela para formar miotúbulos que, quando maduros, originam novas fibras. Em contrapartida, o rompimento da lâmina basal produz o reparo por fibroblastos do local lesado com a formação de tecido cicatricial (MORGAN ; PARTRIDGE, 2002).

Sobre os fatores de crescimento que estão envolvidos na diferenciação e proliferação de células musculares, é claro que existem muitos fatores de crescimento envolvidos, como o fato inibidor de leucemia (LIF), que estimula a proliferação de mioblastos, dentre outros (KUREK *et al.*, 1996).

Muitos fatores de crescimento têm-se mostrado estimulantes de células musculares lesadas ou não-lesadas, dentre eles destaca-se o IGF1 - *Insulin-like* fator de crescimento (KASEMKIJWATTANA *et al.*, 2002; SATO *et al.*, 2003). Além deste, Menetrey *et al.* (2000), descrevem como sendo grandes ativadores para formação de mioblastos o fator de crescimento de fibroblastos (b-FGF) e o fator de crescimento neuronal (NGF).

A extensão da lesão muscular, assim como o seu tratamento são muito importantes, pois a regeneração muscular é um processo complexo, que provoca as mudanças no aspecto morfológico das fibras regeneradas, podendo afetar a desempenho muscular pós-lesão (MINAMOTO *et al.*, 1999).

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

#### 4.1 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<sup>®</sup> e água *ad libidum* enquanto durou o tratamento.

#### 4.2 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<sup>o</sup> e 15<sup>o</sup> dias após o início do experimento. A divisão dos grupos, o número de animais de cada grupo e o cronograma, estão representados 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	8 <sup>o</sup> , 15 <sup>o</sup> dias
LESADOS (GCL)	16	8, 8	8 <sup>o</sup> , 15 <sup>o</sup> dias
LESADOS E TRATADOS (GLT)	16	8, 8	8 <sup>o</sup> , 15 <sup>o</sup> 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 feita 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, desenvolvido por Cruz e colaboradores (2002).

### **4.3 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.

### **4.4 EQUIPAMENTO PROMOTOR DE LESÃO**

O equipamento promotor de trauma mecânico (PTM) desenvolvido por Cruz e colaboradores (em processo de patente, 2002) 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 largado causando um impacto provocando a lesão muscular. (figura 1).



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

#### **4.5 EQUIPAMENTO DE LASER**

O equipamento utilizado foi o Laser Physiolux 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 pulsada. Esta caneta foi desenvolvida e cedida pela empresa Bioset Indústria de Tecnologia Eletrônica Ltda (Figura 2).



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

#### 4.6 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  $10 \text{ J/cm}^2$ . Os animais foram posicionados sobre uma plataforma, em decúbito ventral com hiperextensão do membro inferior direito. A TLBP 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  $90^\circ$ . 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 As-Ga-Al.

Parâmetro de radiação	Valores
Densidade de Energia (dE)	$10 \text{ J/cm}^2$
Potência de pico	70 mW
Comprimento de Onda	785 nm
Área do feixe	$0,08 \text{ cm}^2$
Regime de emissão	pulsado

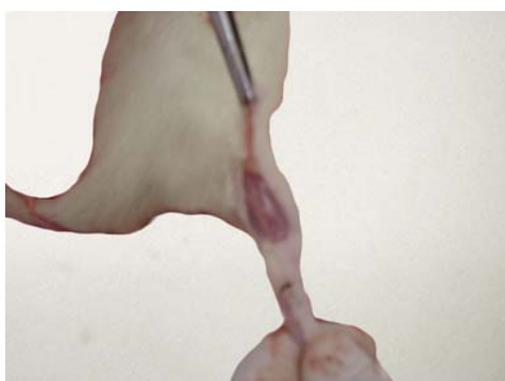


**Figura 3** – Técnica de aplicação do laser 785 nm sobre o músculo gastrocnêmio.

#### **4.7 COLETA DE MATERIAL**

Ao final da fase experimental, os animais foram submetidos à anestesia utilizando injeção intraperitoneal de Rompum<sup>®</sup> e Ketalar<sup>®</sup> 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 excesso de CO<sub>2</sub> e decapitação. Os músculos Gastrocnêmio foram retirados por meio de equipamentos cirúrgicos. Uma parte dos músculos foi fixada em solução formol a 10% e a outra submetida ao congelamento em N<sub>2</sub> líquido.

No momento da coleta observou-se a coloração do músculo e aderências da pele na musculatura (Figura 4).



**Figura 4** – Técnica cirúrgica para retirada do músculo gastrocnêmio.

#### 4.8 ANÁLISE HISTOLÓGICA

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

Para processar o material, utilizou-se a técnica histológica clássica de 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 espessura de sete 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 aconteceu na estufa para fusão da parafina impregnada no tecido.

E - Coloração – Foi realizada a coloração por hematoxilina/eosina (MICHALANY, 1980), seguida de desidratações.

F - Montagem - Foi feita colocando-se uma gota de Entelan<sup>®</sup> sobre o corte, posteriormente coloca-se uma lamínula e esta foi comprimida sobre o corte de modo a

espalhar o Entelan<sup>®</sup> em fina camada entre a lâmina e lamínula. Repetiu-se este procedimento na montagem de cada lâmina.

O tecido foi cortado no sentido transversal com cortes de 9  $\mu\text{m}$ .

#### **4.9 COLORAÇÃO POR VERMELHO PICROSIRIUS**

Coloração do colágeno com o picrosirius red. Foram obtidos cortes de 6- $\mu\text{m}$  do músculo Gastrocnêmio. A coloração do colágeno é 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<sup>®</sup>.

#### **4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Todas as variáveis aferidas no estudo foram analisadas com o auxílio do programa S-Plus. 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 %( $p < 0,05$ ).

#### **4.11 ANÁLISE DE IMAGEM**

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

## **5. RESULTADOS**

## **5.1 CARACTERIZAÇÃO POR MICROSCOPIA DA LESÃO UTILIZADA NO ESTUDO**

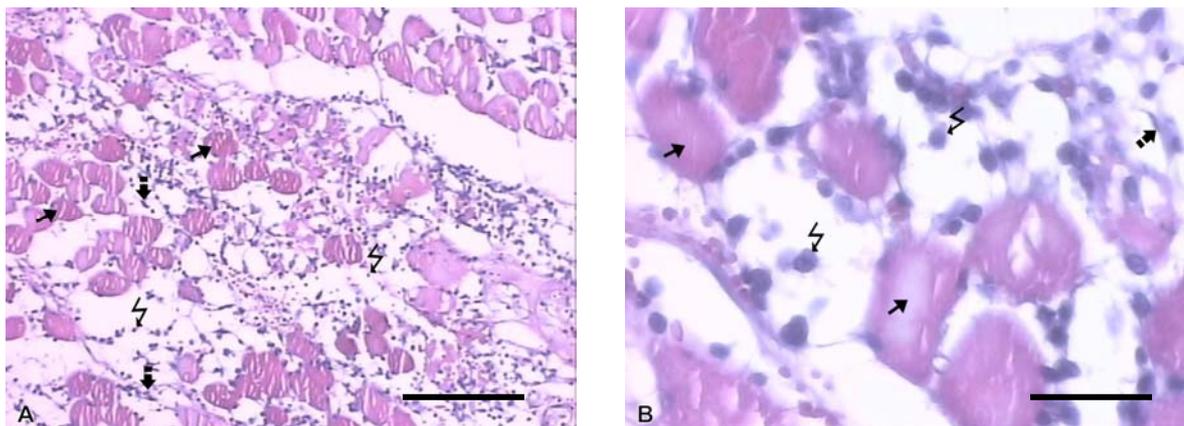
Como estudo piloto do mecanismo do trauma, foram sacrificados 02 animais 48 horas pós-lesão e submetidos a análise histológica pela coloração por HE do músculo gastrocnêmio lesado. Foram observados infiltrado de polimorfonucleados, pequenas áreas hemorrágicas e edema. Não foram observados sinais agudos de lesão como necrose de fibras musculares, ou com núcleos grandes e centralizados. A contagem de células foi feita classificando o número de células de ausente a três cruzes (Figura 5A e B).

## **5.2 CARACTERIZAÇÃO MACRÓSCOPICA DO MÚSCULO LESADO**

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.

## **5.3 CARACTERIZAÇÃO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO DOS MÚSCULOS TRATADOS**

Para caracterização do processo inflamatório foi realizado 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 a presença de: células gigantes, células musculares pequenas, fibroblastos, células mononucleadas(macrófagos, monócitos e linfócitos) e neovascularização.



**Figura 5** - Fotomicrografias de cortes transversais do músculo gastrocnêmio corado com HE, 24 horas após a lesão (barra A= 100 µm e B= 25 µm).

⇔ Fibroblasto, → Fibras musculares e ⚡ Mononucleados.

#### 5.4 Aspectos Morfológicos Das Fibras Musculares 8 Dias Após A Lesão

A análise do tecido muscular corado por HE após 8 dias da lesão mostrou haver ainda células relacionadas ao processo inflamatório como: células gigantes, fibroblastos e mononucleados (macrófagos, monócitos) e linfócitos tanto no grupo tratado quanto não tratado. Observa-se também que a neovascularização ocorre em ambos os grupos. A análise estatística demonstrou não haver diferenças significativas do número de células e de vasos neoformados entre os grupos tratados e não tratados (Figuras 6).

#### 5.5 ASPECTOS MORFOLÓGICOS DAS FIBRAS MUSCULARES 15 DIAS APÓS A LESÃO

Após 15 de lesão do tecido muscular, a análise histológica dos cortes corados por HE, ainda 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 entre os grupos tratados e não tratados (Figuras 7).

Não foi observado diferença estatisticamente significativa quanto ao número de células do processo inflamatório e de neovascularização entre os grupos lesados de 8 e 15 dias tanto nos tratados quanto no não tratados.

## **5.6 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DO COLÁGENO 8 DIAS APÓS A LESÃO**

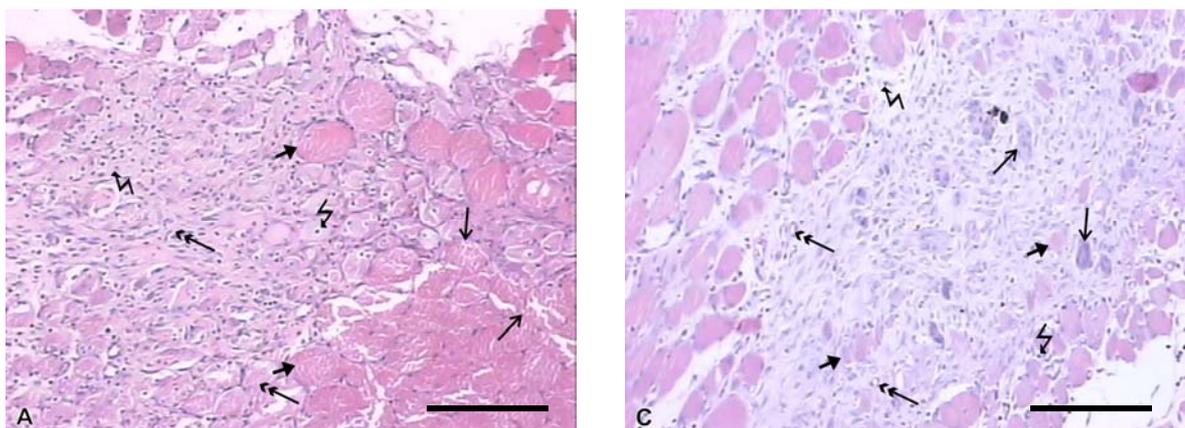
A coloração dos tecidos utilizando *fastgreen* para corar músculo e *siriusred* para corar colágeno permitiu o contraste para delimitar a área de colágeno e fazer sua quantificação utilizando o programa Hlimge. (Figura 8)

A figura 8-A e 8-C mostram a distribuição do colágeno e fibras musculares, após oito dias da lesão, no grupo tratado e no grupo lesado não tratado respectivamente. Observa-se que o grupo tratado apresenta fibras musculares maiores que no grupo controle, com fibras colágenas distribuídas entre elas. No grupo lesado não tratado as fibras musculares são menores e estão agrupadas, ao passo que o colágeno está localizado em separado das fibras musculares. A análise estatística da distribuição deste colágeno indica que a quantidade de colágeno é maior no grupo lesado e tratado quanto comparada ao grupo não tratado.

A figura 8-D mostra que no padrão de normalidade, ou seja, músculo não lesado, oito dias após o início do experimento, as fibras musculares apresentam tamanhos semelhantes com quantidade menor de colágeno distribuído entre estas quando comparados ao músculo lesado.

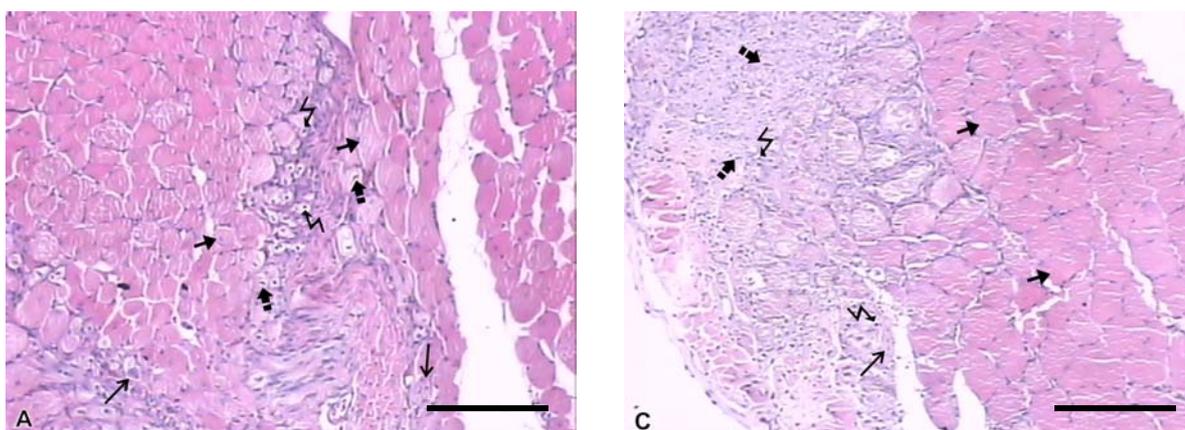
## **5.7 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DO COLÁGENO 15 DIAS APÓS A LESÃO**

A figura 9-A e 9- C mostram a distribuição do colágeno e fibras musculares, após quinze dias da lesão, no grupo tratado e no grupo lesado não tratado respectivamente. Observa-se também que o grupo tratado apresenta poucas fibras colágenas distribuídas entre as fibras musculares. O grupo lesado não tratado ainda apresenta fibras colágenas agrupadas separadas do tecido muscular.



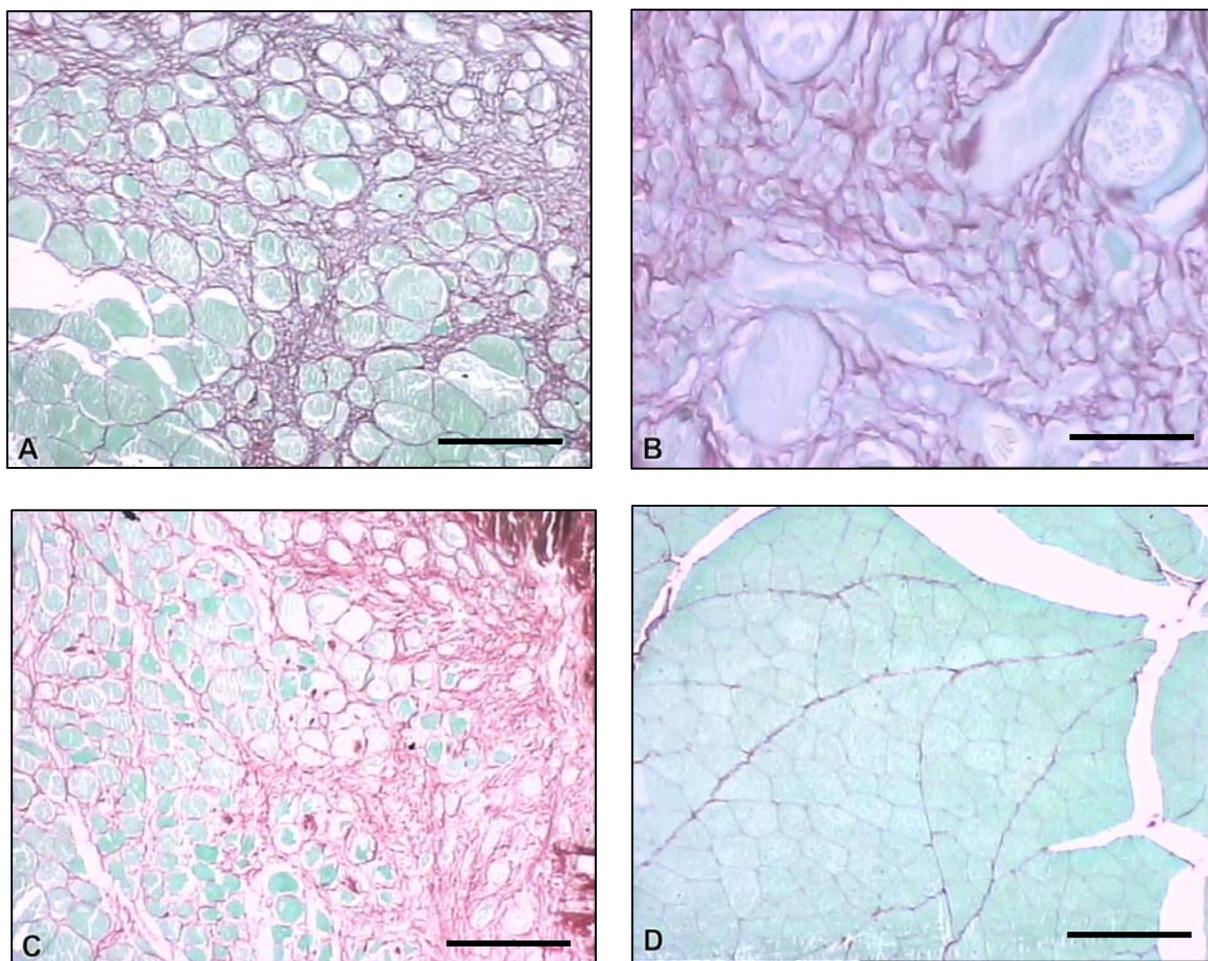
**Figura 6** – Fotomicrografias de cortes transversais do músculo gastrocnêmio, corado com HE, 8 dias após a lesão causada por impacto. Músculo lesado e tratado e músculo lesado não tratado, respectivamente (barra= 100  $\mu$ m).

→ Fibras musculares, ⚡ Mononucleados; →> Neovascularização e → Células Gigantes.

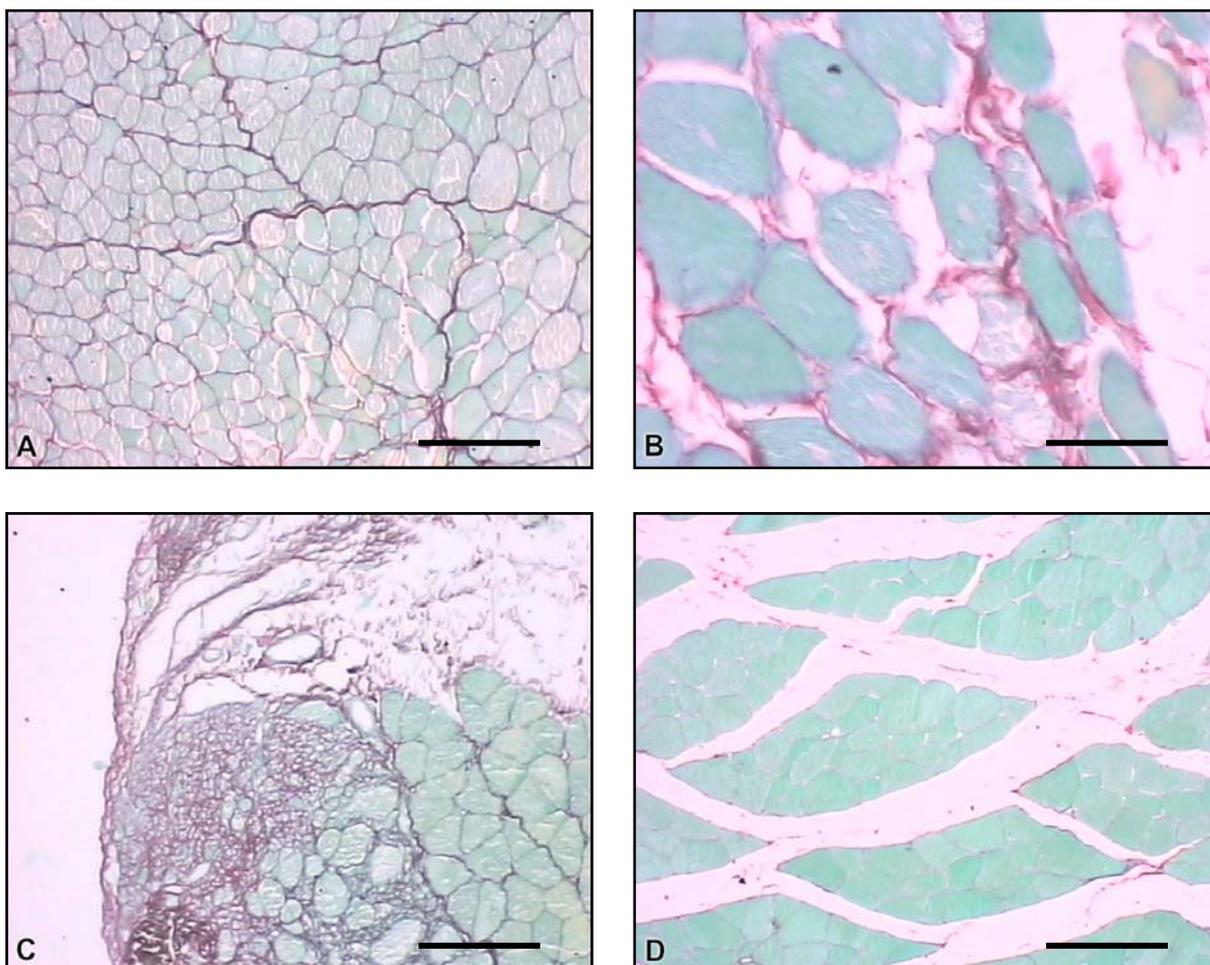


**Figura 7** – Fotomicrografias de cortes transversais do músculo gastrocnêmio, corado com HE, 15 dias após a lesão causada por impacto. Músculo lesado e tratado, e controle, músculo lesado não tratado, respectivamente (barra= 100  $\mu$ m).

→> Fibroblasto, → Fibras musculares, ⚡ Mononucleados e → Células Gigantes.

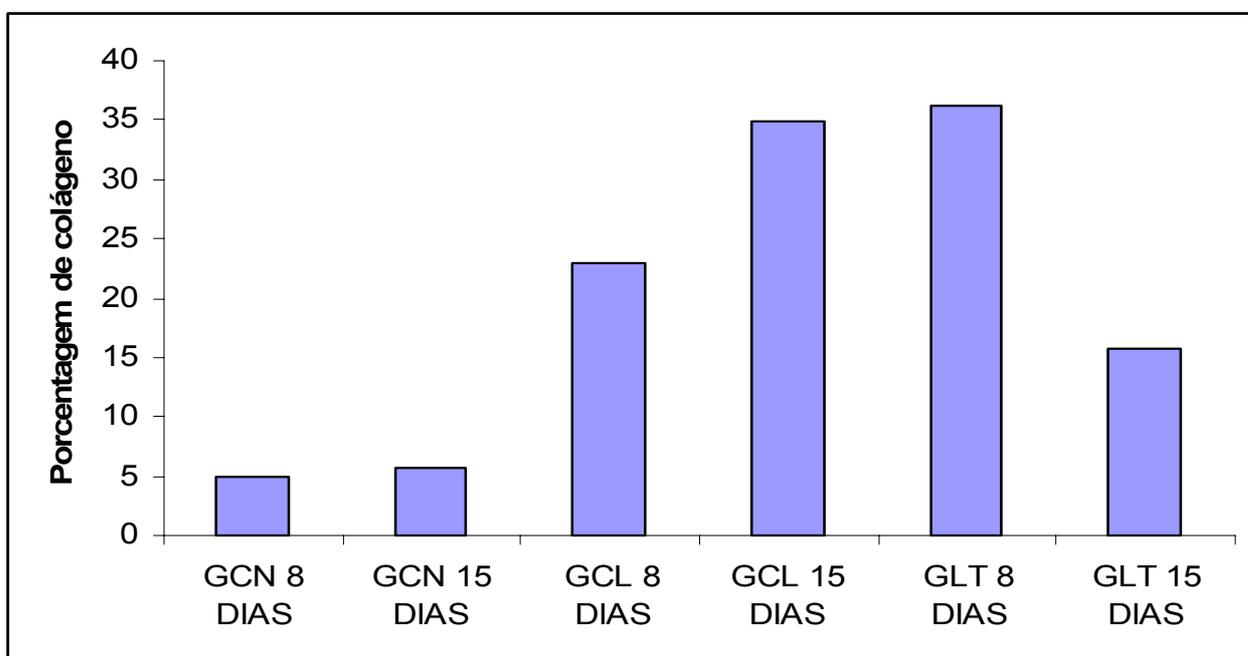


**Figura 8** – Fotomicrografias de cortes transversais do músculo gastrocnêmio, corado com *sirus red* e *fast green*, 8 dias após a lesão causada por impacto. A) músculo lesado e tratado, B) músculo lesado e tratado, C) controle, músculo lesado e não tratado e D) controle, músculo não lesado (barra em A, C e D= 100  $\mu\text{m}$ , em B= 25 $\mu\text{m}$ ).



**Figura 9** – Fotomicrografias de cortes transversais do músculo gastrocnêmio, corado com *sirius red* e *fast green*, 15 dias após a lesão causada por impacto. A) músculo lesado e tratado, B) músculo lesado e tratado, C) controle, músculo lesado e não tratado e D) controle, músculo não lesado (barra em A, C e D= 100  $\mu\text{m}$ , em B= 25 $\mu\text{m}$ )

A figura 10 e as tabelas 3 e 4 apresentam a porcentagem e a análise estatística da quantidade de colágeno entre as fibras musculares nos grupos controles e tratados. Observa-se que os grupos controles normais apresentam a mesma porcentagem de colágeno. Nos grupos lesados a quantidade de colágeno foi maior que nos controles normais mostrando que a lesão provocou aumento da quantidade dessas fibras. Comparando-se os grupos lesados com lesados e tratados 8 dias após a lesão, observa-se que a quantidade de colágeno é maior no grupo tratado.



**Figura 10** – Porcentagem de colágeno entre os grupos controle, lesados e lesados / tratados.

**GCN** – grupo controle, **GCL8**- grupo lesado 8 dias, **GCL15** – grupo controle lesada 15 dias, **GLT8**- grupo lesado e tratado 8 dias, **GLT15** grupo lesada e tratado 15 dias.

A comparação entre o grupo lesado e grupo tratado quinze dias após a lesão mostra que a quantidade de colágeno diminuiu no grupo tratado. A comparação entre os grupos que sofreram radiação mostra que houve uma diminuição do colágeno no décimo quinto dia com relação ao oitavo dia após a lesão. As análises estatísticas mostram significância entre todas as médias (tabela 4).

A análise qualitativa da distribuição de colágeno entre grupos lesados e grupos tratados indicou que no grupo tratado o colágeno ficou distribuído entre as fibras musculares ao passo que no grupo lesado a quantidade de colágeno ficou mais concentrada em um só ponto sugerindo uma melhor distribuição deste no grupo tratado (Figuras 8 e 9).

**Tabela 3** - Média e desvio padrão da porcentagem de colágeno para os grupos controles e tratados 8 e 15 dias após a lesão.

	GCN		GCL		GLT	
	8 dias	15 dias	8 dias	15dias	8 dias	15dias
<b>Média</b>	5,00625	5,616667	23,02917	34,875	36,16667	15,75
<b>Desvio Padrão</b>	±1,521615	±2,201515	±7,919007	±14,08948	±5,849301	±7,05102

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

<b>GRUPOS</b>	<b>MÉDIAS</b>	<b>P-VALUE</b>
GCN8	5.27	0
GCL 8	25.08	
GCN8	5.27	0
GLT8	30.0	
GCN15	5.26	0
GCL15	34.3	
GCN15	5.27	0.002
GLT15	14.34	
GCL8	24.08	0
GLT8	30.0	
GCL15	34.3	0.0268
GLT15	14.3	
GCLT8	30.0	0
GLT15	14.34	

**GCN** – grupo controle, **GCL8**- grupo lesado 8 dias, **GCL15** – grupo lesada 15 dias, **GLT8**- grupo lesado e tratado 8 dias, **GLT15** – grupo lesado tratado 15 dias. Nível de significância entre os grupos  $p < 0.05$ .

## **6. DISCUSSÃO**

Para analisar o efeito da laserterapia sobre lesão muscular buscou-se inicialmente, uma forma de produção de lesão que se assemelhasse ao que ocorre na prática de esportes bem como em atividades de vida diária. Em estudos sobre lesões musculares são utilizados diversos mecanismos para a produção da lesão como, injeção de miotoxinas, cirurgias, dentre outras. Estes mecanismos apresentam variáveis intervenientes como contaminações e resposta inflamatória do próprio ato cirúrgico (LEFAUCHEUR; SEBILLE, 1995; MINAMOTO, 1999; NICOLAU, 2001; ABOU HALA, 2003).

Neste trabalho foi utilizado o aparelho promotor de lesão proposto por Cruz *et al.* (2002), o qual possibilitou realizar facilmente as lesões por meio de impacto. Ele se mostrou ideal por não ser invasivo, melhor reprodutível e dessa forma, diminuiu os possíveis vieses na produção das lesões.

O músculo gastrocnêmio foi escolhido por ser responsável por suas dimensões e por ser responsável pelo movimento e manutenção de postura. O tamanho do músculo e sua localização facilitaram a realização da lesão e aplicação da terapia.

A terapia laser ainda não apresenta protocolos de aplicação padronizados. A escolha do comprimento de onda foi baseada em revisões de literatura em que estudos realizados por Karu (1993) mostram que os comprimentos de onda com maior potencial para penetração sendo capaz de atravessar o tecido epitelial estão entre 750 a 800 nm. Neste trabalho foi utilizado o comprimento de 785 nm o qual representa um comprimento de onda dentro da faixa capaz de atingir a camada 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.

Estudos indicam dependendo da dose utilizada pode-se ter efeitos estimulatórios ou inibitórios sobre o crescimento de fibroblastos e sugere que doses acima de 10 J/cm<sup>2</sup> inibe a produção de colágeno (SCHINDL, *et al.*, 2000). A dose de 10 J/cm<sup>2</sup> escolhida neste estudo foi utilizada na expectativa de abordar sua eficiência no rearranjo do colágeno com a expectativa de abordar sua eficácia quanto ao parâmetro biomodulador sobre fibras colágenas para assim impedir quadros de retrações musculares pelo seu excesso em detrimento do crescimento de fibras musculares.

No presente trabalho, observou-se um aumento na quantidade de colágeno no grupo tratado no oitavo dia após a lesão. Como a contagem de fibroblastos mostrou não haver aumento do número dessas células sugere-se o aumento deveu-se ao aumento na síntese de colágeno. Após quinze dias da lesão observou-se uma diminuição da quantidade de colágeno sugerindo que houve um rearranjo do colágeno ou que a metodologia utilizada não foi eficiente para permitir a análise dos resultados.

Estudos utilizando diversos tipos de radiação ou diferentes protocolos de aplicação mostram diferentes efeitos sobre o colágeno. A radiação laser pode atuar tanto sobre a proliferação de fibroblastos quanto sobre a produção de colágeno. Estes efeitos dependem da densidade de energia, número de aplicações e comprimentos de onda utilizados (KARU *et al.*, 1995; FISCHER *et al.*, 2000; SCHIND *et al.*, 2000; AMARAL *et al.*, 2001; PEREIRA *et al.*, 2002).

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. 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 miofibroblastos 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).

O 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/cm<sup>2</sup> tem intenso efeito sobre o crescimento do colágeno (PEREIRA *et al.*, 2002).

Neste trabalho foi observado que não houve alterações no número de células relacionadas ao processo inflamatório. Vários trabalhos utilizando o laser Ga-As tanto

em lesão muscular por miotoxina quanto em cultura de células também demonstram o mesmo efeito (BOUMA *et al.*, 1996; OLIVEIRA *et al.*, 1999).

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, posição do núcleo que pudessem indicar a regeneração muscular. Oliveira e colaboradores, 1999, em seus estudos sobre o efeito do laser AsGa (904 nm) com doses de 3 e 10 J/cm<sup>2</sup> na regeneração de músculo esquelético lesados com miotoxina demonstrou que ambas as doses não promoveram efeitos sobre o processo de regeneração muscular.

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/cm<sup>2</sup> aplicados durante cinco dias consecutivos, sobre a pele do músculo tibial anterior lesado, e constataram que somente a dose de 2.6 J/cm<sup>2</sup> proporcionou aumento da fibra muscular e densidade mitocondrial.

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.

## **7. 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 10 J/cm<sup>2</sup> aplicado logo após a lesão seguida de quatro aplicações em dias alternados indicou que:

- Houve aumento na síntese do colágeno apresentando uma melhor distribuição entre as fibras musculares, sugerindo que esta intervenção pode prevenir quadros de retrações musculares e diminuição de ADM;
- Este procedimento terapêutico não alterou a resposta inflamatória do tecido lesado;
- O rearranjo das fibras colágenas a partir do décimo quinto dia após lesão muscular mostra que é importante fazer novas investigações no sentido de confirmar e descrever as razões deste evento.
- Parece que a utilização dos parâmetros de avaliação histomorfométrica não foi eficaz para detectar efeito da terapia laser sobre o tecido muscular lesado

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

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.

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.

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.

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. **Lasers in Surgery and Medicine**. v. 13, n.1, p.72-75.1993.

BAXTER, D. Laserterapia de baixa intensidade. In: KITCHEN, S. BAZIN, S. **Eletroterapia de Clayton**. 10.ed. São Paulo: Manole, 1998. cap. 13, p. 191-210.

BAXTER, G. D. **Therapeutic Lasers**. New York: Churchill Livingstone, 1994.p.259.

BEN-DOV, N.; SHEFER, G.; IRINITCHEV, A.; WERNIG, A.; ORON, U.; HALEVY, O. Low-energy laser irradiation affect6s satellite cell proliferation and differentiation in vitro. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1448, p.372-380. 1999.

BIBIKOVA, A.; BELKIN, V.; ORON, U. Enhancement of angiogenesis in regenerating gastrocnemius muscle of the toad (*Bufo viridis*) by low-energy laser irradiation. **Anat Embryol**. v.190, p.597-602.1994.

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.

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

BÜLOW, P. M.; JENSEN, H.; DANNESKIOLD-SAMSOE, B. Low power Ga-Al-As laser treatment of painful osteoarthritis of the knee. A double-blind placebo-controlled study. **Scand J Rehabil Med**.v. 26, n.3, p.155-9. 1994.

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;

BURT, J. D.; SIDDINS, M.; MORRISON, W. A. Laser photoirradiation in digital flexor tendon repair. **Plastic Reconstructive Surgery**. v.108, n.3, p.688-694. 2001;

CAMPION, D. R. The skeletal muscle satellite cell: a review. **International Review of Cytology**, v. 87, p. 225-51, 1984.

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.

DANILOV, R. K.; ODINTSOVA, I. A.; NAIDENOVA, L. U. G. The regeneration of skeletal muscle after gunshot injury. **Morfologia**.; v.110, n.5, p.86-90. 1996.

DOLBER, P. C.; SPACH, M. S. Picrosirius red staining of cardiac muscle following phosphomolybdic acid treatment. **Stain Technol**. v.62, p.23-26. 1987.

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.

GENOVESE, W. J.; **Laser de baixa intensidade – Aplicações Terapêuticas em Odontologia**. São Paulo: Lovise, 2000. p.47.

GONZALEZ-SERRATOS, H.; ROZYCKA, M.; CORDOBA-RODRIGUEZ, R.; ORTEGA, A. membrane healing and restoration of contractility after mechanical injury in isolated skeletal muscle fibers of the frog. **Cell Biology**. v.93, n.12, p.5996-6001.1996.

GRISOTTO, P. C.; SANTOS, A. C.; COUTINHO-NETTO, J.; CHERRI, J.; PICCINATO, C. E. Indicators of oxidative injury and alterations of the cell membrane in the skeletal muscle of rats submitted to ischemia and reperfusion. **Journal of Surgical Research**. v.92, n.1, p.1-6.2000.

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**. 1997; 76:288-296.

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

HAMILL, J. ; KNUTZEN, K. M. **Bases Biomecânicas do Movimento Humano**. São Paulo: Manole, 1999.

HERBERT, K. J.; HICKEY, M. J.; LEPORÉ, D. A.; KNIGHT, L. K.; MORRISON, W. A.; STEWART, A. G. Effects of the endothelin receptor antagonist Bosentan on ischemia/reperfusion injury in rat skeletal muscle. **European Journal of Pharmacology**. v.424, p.59-67.2001.

HONMURA, A.; ISHII, A.; YANASE, M.; OBATA, J.; HARUKI, E. Analgesic effect of Ga-Al-As diode laser irradiation on hyperalgesia in carrageenin-induced inflammation. **Lasers Surg Méd**. v. 13, n.4, p.463-469.1993.

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.

JARVINEN TA; JOZSA L; KANNUS P; JARVINEN TL; 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 n 3, p. 24554- 24559, 2002.

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.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 9.ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 1999.

KARU, T. The Science of Low-power Laser Therapy. **Australia: Gordan and Breach Science Publishers**, 1998.

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.

KUREK, J.; BOWER, J.; ROMANELLA, M.; AUSTIN, L. Leukemia inhibitory factor treatment stimulates muscle regeneration in the mdx mouse. **Neurosci Lett**. v.212, n.3, p.167-170.1996.

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-musclled and normal bovine animals. **Tissue & Cell**. 1999; 31(1):17-27.

LOPES, LA; BRUGNERA, AJ. Aplicações Clínicas do laser não-cirúrgico. In: BRUGNERA, AJ;

MAIMAN, T, H. Stimulated optical radiation in ruby. **Nature**. 1960; 187: 493.

MARQUES, A.P. **Cadeias Musculares**. São Paulo. Manole. 2000, p.7-12.

MATAMALA, F.; VEUTHEY, C.; MOLINA, B.; SILVA, H.; HENRÍQUEZ, J. Efecto del láser infrarrojo de uso clínico sobre el perineuro de nervio isquiático de conejo. **Archivos de medicina veterinária**.; v.33, n.2, p.253-259. 2001

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**. 4ª 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

MENETREY, J.; KASEMKIJWATTANA, C.; DAY, C. S.; BOSCH, P.; VOGT, M.; FU, F. H.; MORELAND, M. S.; HUARD, J. Growth factors improve muscle healing in vivo. **J Bone Joint Surg Br**.; v.82, n.1, p.131-137. 2000

MERRICK, M. A. Secondary injury after musculoskeletal trauma: a review and update. **Journal of Athletic Training**.; v.37, n.2, p.209-217. 2002

MESTER, A. F. ; MESTER, A. Wound Healing. **Lasers Therapy**.;v. 1, n.1, p.7-12. 1989

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 n 4, p. 258-62, 1975.

MESTER, R; KORENY-BOTH, A; SPIRY, T. The biomedical effects of laser application. **Laser in Surgery and Medicine**. V. 5, p. 31-39, 1985.

MINAMOTO, V.B.; GRAZZIANO, C. R.; SALVINI, T. F. Effects of single and periodic trauma contusion on the rat soleus muscle at different stages of regeneration. **The Anatomical Record**. 1999. 254: 281-287.

MINAMOTO, VB; GRAZZIANO, CR; SALVINI, TF. Effect of single and periodic con-tusion on the rat soleus muscle at differ-ent stages of regeneration. **Anatomical Record**, V.254, p. 281-287,1999.

MORGAN, J. E.; PARTRIDGE, T. A. Muscle satellite cells. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**; v.35, p.1151-1156. 2003.

MORRONE, G.; GUZZARDELLA, G. A.; TIGANI, D.; TORRICELLI, P.; FINI, M.; GIARDINO R. Biostimulation of human chondrocytes with Ga-Al-As diode laser: in vitro research. **Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol**; v.28, n.2, p.193-201. 2000

MORRONE, G.; GUZZARDELLA, G. A.; TORRICELLI, P.; FINI, M.; GIARDINO R. In vitro experimental research of rabbit condrocytes biostimulation with diode laser Ga-Al-As: a preliminary study. **Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol**; v.26, n.4, p.437-439. 1998.

MORRONE, G.; GUZZARDELLA, G. A.; TORRICELLI, P.; ROCCA, M.; TIGANI, D.; BRODANO, G. B.; FINI, M.; GIARDINO, R. Osteochondral lesion repair of the knee in the rabbit after low-power diode Ga-Al-As laser biostimulation: an experimental study. **Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol**. v.28, n.4, p.321-336.2000.

NICOLAU, RENATA AMADEI. **Efeito do Laser De Baixa Potencia (As-Ga-Al) em Tecido Ósseo de Rato Submetido à Lesão, Analisando por Histomorfometria Óssea**. 2001. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica). UNIVAP – Universidade do Vale Paraíba. São Jose dos Campos - SP.

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**. 25:13-21. 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.

PINHEIRO, ALB. **Laser na odontologia Moderna**. São Paulo: Pancast. 1998. p. 100-120.

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.

RANTANEN, J.; HURME, T.; LUKKA, R.; HEINO, J.; KALIMO, H. Satellite cell proliferation and the expression of myogenin and desmin in regenerating skeletal muscle: evidence for two different populations of satellite cells. **Lab Invest.**,vol. 72(3), p. 341-7, 1995.

REDDY, G. K.; BITTEL-STEHRNO, 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.

RENAUD, J.M.; GRAMOULINI, A.; LIGHT, P.; CONTOIS, A. Modulation of muscle contractility during fatigue end recovery by ATP-sensitive potassium channel. **Acta Physiol Scand.** v.156, p. 203-212.1996.

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.

ROSE, SJ; ROTHERTEIN, JM. Muscle biology and physical therapy. **Phys. Therapy.** V.62, p.1754-1756. 1982.

ROSE, SJ; ROTHERTEIN, JM. Muscle biology and physical therapy. **Phys. Therapy.** V.62, p.1754-1756. 1982.

SATO, K.; LI, Y.; FOSTER, W.; FUKUSHIMA, K.; BADLANI, N.; ADACHI, N.; USAS, A.; FU, F. H.; HUARD, J. Improvement of muscle healing through enhancement of muscle fibrosis regeneration and prevention of fibrosis. **Muscle & Nerve.** v.28, n.3, p.365-372.2003.

SATO, T.; KAWATANI, M.; TAKESHIGE, C.; MATSUMOTO, I. Ga-Al-As laser irradiation inhibits neuronal activity associated with inflammation. **Acupunct Electrother Res.** v.19, n.(2-3), p.141-151.1994.

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

SCHINDT, ANDREAS; eat al. Low-Intensity Laser Therapy: A Review. **Journal of Investigative Medicine.** Vol.48. No. 5

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, n.3, p.188-192. 1996.

SOTELO, P. R.; SOSA, V. M. R.; MARTÍNEZ, R. T.; BARRY, H. G. El láser de helio-neon en la regeneración del nervio ciático seccionado y suturado. **Rev. Cubana Cir.** v.35, n.2, p. 84-89.1996

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.

SWEAT, F.; PUCHTLER, H.; ROSENTHAL, S. Sirius red F3BA as stain for connective tissue. **Arch Pathol.** v.78, p.69-72. 1964.

TULLBERG, M.; ALSTERGREN, P. J., ERNBERG, M. M.. Effects of low-power laser exposure on masseter muscle pain and microcirculation. **Pain.**; v.105, p.89-96. 2003

VEÇOSO, M.C. **Laser em Fisioterapia.** São Paulo, Lovise. 1993.

VEÇOSO, M.C. **Laser em Fisioterapia.** São Paulo. Lovise, 1993, p.65.

VICENZO, G. et al., Influência do Laser de baixa energia no processo de consolidação de fraturas de tibia: estudo experimental em ratos. **Revista Brasileira de Ortopedia,** São Paulo, v.36, n. 5, p 174-178, 2001.

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