

Laserterapia de baixa intensidade na expressão de colágeno após lesão muscular cirúrgica

Low-Level Laser Therapy in the expression of collagen after muscular surgical injury

Flávia Fonseca Moreira¹, Eustáquio Luiz Paiva de Oliveira², Fabiano Sousa Barbosa³, Julio Guilherme Silva⁴

¹ Fisioterapeuta, Especialista em Ciências da Reabilitação pela Faculdade de Minas/FAMINAS, Muriaé, MG – Brasil.

² Fisioterapeuta, Especialista em Ciências da Reabilitação pela Faculdade de Minas/FAMINAS, Mestrando em Neurociências pela Universidade Federal Fluminense/UFF, Niterói, RJ – Brasil.

³ Fisioterapeuta, Mestre em Biologia Celular e Estrutural pela Universidade Federal de Viçosa/UFV, Docente do Centro Universitário do Norte/UNINORTE, Manaus, AM – Brasil.

⁴ Fisioterapeuta, Doutor em Mapeamento Cerebral e Aprendizagem Motora pela Universidade Federal do Rio de Janeiro UFRJ/IPUB, Docente do Mestrado em Ciências da Reabilitação, UNISUAM – Rio de Janeiro, RJ – Brasil.

Faculdade de Minas/FAMINAS, Muriaé

ENDEREÇO PARA CORRÊSPONDÊNCIA:

Fabiano Sousa Barbosa
Centro Universitário do Norte – UNINORTE
Dept. de Fisioterapia – UNIDADE I
Av. Joaquim Nabuco, 1232,
Centro, CEP 69020-030 /
Manaus-AM
(92) 3212-5014
fabianoft@bol.com.br

APRESENTAÇÃO:
fev. 2010

ACEITO PARA PUBLICAÇÃO:
set. 2010

RESUMO: A laserterapia é um procedimento utilizado em larga escala nas lesões musculoesqueléticas, devido as suas diversas propriedades, antiinflamatórias, cicatrizantes entre outras. Além disso, há tipos distintos de aparelhos de laser. Mesmo com os diversos modelos experimentais existentes na literatura, não há um consenso sobre a faixa de utilização, bem como o tipo de laser que promove melhor reparo no tecido muscular. Este estudo visa analisar os efeitos da laserterapia de baixa intensidade na expressão de colágeno após lesão muscular. Camundongos *Swiss* albinos (n=18) foram submetidos à lesão muscular cirúrgica e divididos em dois grupos, controle (C) e teste (T). Os animais foram submetidos a uma irradiação diária de 5 J/cm² pelos lasers AsGaAl 830 nm e AsGa 904 nm e, em diferentes tempos de sacrifício (7 e 14 dias). Os resultados não demonstraram diferença estatística significativa na expressão de colágeno em ambos os grupos analisados. Contudo, os dados apontam que a dose de 5 J/cm² do laser AsGa 904 nm promoveu maior deposição de fibras colágenas após 14 dias de tratamento, sugerindo que a terapia seja efetiva na síntese de colágeno. Outros estudos experimentais, em humanos, devem ser propostos para maiores inferências sobre os resultados do laser no tratamento da lesão muscular.

PALAVRAS-CHAVE: Terapia por Laser de baixa intensidade, colágeno, músculo esquelético

ABSTRACT: The laser therapy is a procedure utilized at long scale in the musculoskeletal injuries, due its anti-inflammatory and reparatory proprieties and others. Besides, there are differents types of laser equipments. Despites with the many experimental models at literature, there is no consensus about the range of application as well as the type of laser that promote of the best repair in muscular tissue. The aim of this study is to analyze the effects of the low level laser therapy in the expression of collagen after muscular injury. Mice *Swiss* albinos (n=18) were subjected to the muscular surgical injury and separated in two groups, control (C) and test (T). The animals were submitted a daily radiation of 5 J/cm² for the lasers AsGaAl 830 nm and AsGa 904 nm and, in different times of sacrifice (7 and 14 days). The results didn't demonstrate significant difference in the expression of collagen in both analyzed groups. However, the data appear that the dose of 5 J/cm² of the laser AsGa 904 nm promoted larger deposition of fibers collagens after 14 days of treatment, suggesting that the therapy is effective in the synthesis of collagen. Others studies will be proposed at humans to bigger inferences about the results of laser in the treatment muscular injury.

KEY-WORDS: LOW-LEVEL Laser therapy, collagen, skeletal muscular

INTRODUÇÃO

O termo *laser* é um acrônimo para amplificação da luz por emissão estimulada de irradiação. Após ser idealizado em 1917, por Albert Einstein, que propôs os princípios físicos da emissão estimulada, o primeiro feixe de luz *laser* foi criado em 1960 e baseados nesses estudos vários aparelhos surgiram nas últimas décadas incluindo o *lasers*, Arseneto de Gálio (AsGa) e Arseneto de Gálio Alumínio (AsGaAl)^{1,2}.

Evidências dos efeitos bioestimulatórios da *laser*terapia de baixa intensidade tem sido descritas em décadas anteriores, e a partir disto inúmeros estudos têm sido conduzidos para estabelecer sua eficácia³. Para alguns autores^{4,5,6}, o *laser* tem sido usado para acelerar o reparo de diferentes tecidos, incluindo tecido muscular. Albertine *et al.*⁷ relataram um aumento no número de mitose e o desenvolvimento de células epiteliais, promovendo aumento da vascularização e síntese de colágeno pelos fibroblastos nos sítios da lesão, sendo esta síntese confirmada por estudos *in vitro*^{8,9,10}.

O colágeno é a proteína mais abundante da matriz extracelular, correspondendo 20-25% de todo conteúdo protéico. Os tipos I, III, IV e V são predominantes no tecido muscular¹¹, sendo o tipo I responsável por formar fibras paralelas que conferem força tênsil e rigidez¹². A força elástica do tecido conectivo é significativamente afetada dependendo da quantidade e organização de fibras colágenas que conseqüentemente afeta o suporte que é fornecido ao organismo¹³. A efetiva estimulação da proliferação de fibroblastos e conseqüentemente a formação de tecido conectivo foi sugerida por alguns autores^{14,15} posteriormente a exposição a *laser*terapia de baixa intensidade. Pugliese *et al.*¹⁶ mostraram resultados positivos relacionados ao colágeno, em modelo animal experimental, submetidos a irradiação por *laser* de baixa intensidade quando comparado com controle não irradiado. Biossíntese de colágeno também foi realçada por Garavello-Freitas *et al.*¹⁷, após utilização de *laser* de baixa intensidade. Eles observaram que a terapia induziu a formação de fibras mais compactas e dispostas paralelamente no modelo de reparo ósseo. Em experimento com ligamentos mediais

colaterais do joelho, após cirurgia, Fung *et al.*¹⁸ também relataram melhor organização e disposição de fibras colágenas.

Ribeiro *et al.*¹⁹, mostraram que a *laser*terapia de baixa intensidade estimulou a deposição de colágeno nos estágios finais da cicatrização por segunda intenção. Esta melhora na deposição de colágeno pode ser explicada pelo fato da *laser*terapia ser apta para regular a liberação de algumas citocinas responsáveis pela proliferação de fibroblasto e síntese de colágeno, tais como FGF-b (fator de crescimento fibroblástico beta) e TGF (fator de crescimento transformador), respectivamente¹⁶.

Recentemente Rodrigo *et al.*²⁰, relataram que a *laser*terapia de baixa intensidade modula a produção de colágeno em pacientes diabéticos e que esta biomodulação esta relacionada a vários mecanismos dentre eles a proliferação de fibroblasto mostrado por Maiya *et al.*²¹ através de estudos histopatológicos. Reis *et al.*²², descreveram que *laser*terapia acelera o processo de reparo tecidual associado com aumento na produção de fibras colágenas com melhor organização do tecido após 5 dias de tratamento. Estudos prévios com diferentes comprimentos de onda, tais como 633 nanômetros (nm)²³, 650 nm⁶, 780 nm²⁴, 785 nm³ e 808 nm²⁵ também mostraram efeitos positivos no reparo de tecidos bem como na síntese de colágeno.

Apesar dos inúmeros estudos demonstrando os benefícios desta terapia, ainda encontramos resultados contraditórios na literatura devido aos diferentes modelos experimentais, protocolos de tratamento e *lasers* utilizados, sendo necessários novos estudos que ratifiquem os achados prévios. Pautado nesta prerrogativa este trabalho teve como objetivo investigar os efeitos dos *lasers* Arseneto de Gálio Alumínio (AsGaAl 830 nm) e Arseneto de Gálio (AsGa 904 nm) na expressão de colágeno após lesão muscular induzida cirurgicamente no músculo gastrocnêmico de camundongos.

METODOLOGIA

Animais

Camundongos da linhagem *Swiss* albino (n=18), machos, adultos, pesando

em média 35g provenientes do Biotério da Faculdade de Minas (FAMINAS) foram utilizados neste experimento. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada (+/- 24° C), com ciclo claro/escuro de 12 / 12 horas, recebendo ração específica para espécie e água *ad libitum*. Todos os experimentos foram realizados respeitando as normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação animal²⁶ após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com animais da Faculdade de Minas (FAMINAS), sob o protocolo n° 010/2008.

Procedimento cirúrgico

Os animais foram anestesiados por injeção intraperitoneal com ketamina e xilazina (90 mg/kg e 10 mg/kg de peso corporal, respectivamente; Dopalen, SP, Brasil) e após tricotomia e assepsia foi realizada uma incisão longitudinal na pata traseira direita de cada animal para expor o músculo gastrocnêmio. Após a exposição do tecido muscular uma incisão cirúrgica longitudinal foi produzida conforme descrito por Cressoni *et al.*³.

Grupos experimentais e protocolo de tratamento

Após divisão em grupos teste (T), submetidos à irradiação pelo *laser*, e grupo controle (C), não submetidos à irradiação, foram subdivididos em seis subgrupos com três animais cada, de acordo com os modelos de *lasers* e tempo de sacrifícios em dias, designados: T 830nm (7 e 14 dias), T 904nm (7 e 14 dias) e o grupo controle C (7 e 14 dias). Decorridos 24 horas da indução da lesão iniciou o protocolo de tratamento com uma única irradiação diária através da técnica pontual, no sítio da lesão, em todos animais do grupo teste. Os animais do grupo controle foram submetidos ao tratamento com o aparelho desligado, de forma placebo.

Aparelho Laser

Para condução dos experimentos terapêuticos utilizamos dois aparelhos geradores de raios *lasers* com o modelo e os parâmetros descritos a seguir:

AsGaAl, com comprimento de onda 830 nanômetros, infravermelho, potência

de 30 mW, com emissão pulsada, potência média de 0,03 W, área do feixe de 0,1 cm² na frequência de 20Hz, densidade de energia 5 J/cm². A irradiação foi feita por 16,6 segundos, modelo LASERPULSE (IBRAMED, Amparo, SP, Brasil).

AsGa, com comprimento de onda de 904 nanômetros, infravermelho, com emissão pulsada, potência de 70Wpico, potência média de 0,04 W, área do feixe de 0,1 cm², duração dos pulsos de 60nseg, na frequência de 9,5KHz, densidade de energia 5 J/cm², com uma energia por ponto de 0,5 J. A irradiação foi feita por 15 segundos, modelo LASERPULSE (IBRAMED, Amparo, SP, Brasil).

Análise histológica

Os músculos gastrocnêmicos foram fixados em tampão *Milloning* por 24 horas e emblocados em *paraplast* (parafina) e posteriormente cortados (5µm) em micrótomo. Após desparafinização e hidratação os cortes foram corados pela técnica especial de Picrosíríus (*Aldrich, Milwaukee, USA*) para visualização de colágeno (identifica positivamente as fibras pela cor avermelhada).

Análise Morfométrica

A visualização e captação das imagens deram-se através de um sistema de captura e análise de imagem computadorizado constituído de uma câmara digital

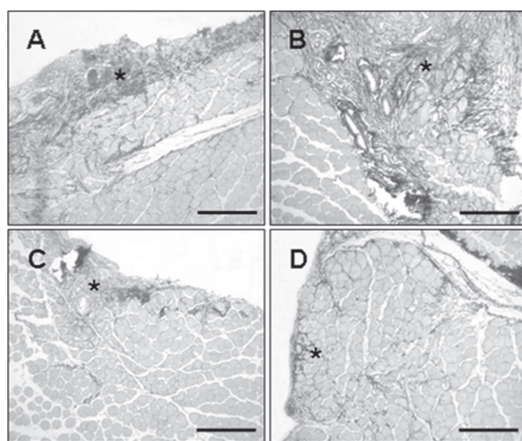


Figura 1 Fotomicrografia do músculo gastrocnêmio após coloração especial por picrosíríus (A,B,C,D) e análise histomorfométrica da expressão de colágeno na área de lesão (E). Fotomicrografia de 7 (A,B) e 14 (C,D) dias após tratamento pelos lasers AsGaAl 830 nm (A,C) e AsGa 904 nm (B,D). Os asteriscos indicam a expressão de colágeno na área da lesão. As barras representam à média e seu respectivo desvio padrão (E). Três animais foram incluídos por grupo. A análise estatística foi baseada na análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey sendo * $p < 0,05$.

acoplada ao microscópio *Axioplan* (*Carl Zeiss, Oberkochen, Germany*), transmitindo as imagens a um microcomputador e posteriormente analisado pelo *software Image-pro Plus 4.5* (*Media Cybernetics Inc., Silver Spring, MD*). A área de cada imagem foi medida automaticamente por diferencial colorimétrico. O analisador fornece ao sistema o padrão de cor a ser quantificado, e o sistema identifica a cor, preenche a área de interesse e processa a mensuração em µm².

Análise estatística

Para análise estatística utilizamos o *software GraphPad Prism™* (*GraphPad Software Inc. San Diego, CA*). Diferenças entre grupos foram acessadas utilizando o teste de análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey. Todos os resultados foram apresentados em média e desvio padrão, considerando como significante $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

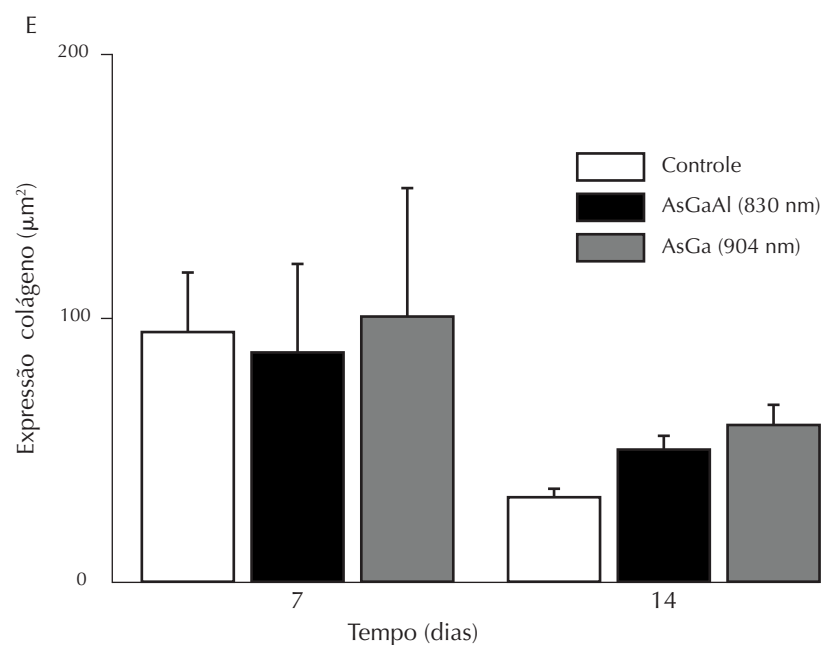
A lesão muscular após sete dias mostrou extensa área de deposição de colágeno tanto no grupo AsGaAl 830

nm (Figura 1A) quanto no AsGa 904 nm (Figura 1B). Já após quatorze dias, a expressão de colágeno diminuiu em ambos os subgrupos (Figuras 1C e 1D).

Ao comparar os resultados obtidos posteriormente à técnica histológica, foi observado que com sete dias de tratamento com os lasers não houve diferença estatística significativa na deposição de colágeno entre os diferentes grupos. Os resultados mantiveram-se limítrofes entre os grupos controle (94,72 ± 40,01), AsGaAl 830 nm (89,97 ± 53,34), com um discreto aumento do grupo AsGa 904 nm (98,07 ± 95,60) em relação aos demais (Figura 1E).

Após quatorze dias de tratamento os grupos AsGa 904 nm (59,98 ± 18,81) e AsGaAl 830 nm (50,46 ± 13,37) mostraram maior deposição de colágeno em relação ao grupo controle (33,09 ± 6,68), entretanto, não observamos diferenças estatísticas significativas sendo $p = 0,15$ e $p = 0,19$, respectivamente (Figura 1E).

Os resultados apresentados na figura 1E mostraram uma diminuição na expressão de colágeno, entre sete e quatorze dias após tratamento, no grupo controle e em ambos os lasers analisados, porém sem diferença estatística.



DISCUSSÃO

Existem vários modelos de indução de lesão tais como: miotoxinas²⁷, criolesão²⁸, entretanto, neste estudo optamos por utilizar um modelo descrito por Cressoni *et al.*³, através de lesão cirúrgica.

Sintetizadas inicialmente como cadeias precursoras, as moléculas de colágeno, juntam-se para formar o pró-colágeno no retículo endoplasmático rugoso (RER) que é transportado para o exterior da célula pelo complexo Golgi onde o processo de formação de fibras colágenas é concluído²⁹. Autores sugerem que a *laser*terapia de baixa intensidade é capaz de aumentar a síntese de colágeno, atuando como mecanismo de exportação do colágeno para o meio extracelular^{30,31}. Pogrel *et al.*³² and Schindl *et al.*³³, também sugerem a utilização do *laser* para aumentar a síntese de colágeno e de fibroblastos, citando como base para tal sugestão, estudos *in vitro* nos quais foram aplicados *laser* e resultados significativos foram obtidos quanto ao aumento dos fibroblastos e do colágeno. Semelhante ao encontrado pelos autores supracitados nossos resultados também apresentaram um aumento na deposição de colágeno no grupo irradiado em relação ao grupo não irradiado.

A síntese de colágeno ocorre em conjunto com a degradação de colágeno por matriz metaloproteases (MMPs)^{33,34}. Gavish *et al.*²⁴ estudando a atividade de MMPs após utilização da terapia *laser* encontrou uma atividade modulada e expressão de MMP2 e uma regulação na expressão de collagenase (MMP-1) e de inibidores de MMPs (TIMP2) em parceria com o aumento na síntese colágeno.

Uma das limitações do nosso estudo, foi a não realização de uma análise entre a relação das enzimas supracitadas e seus respectivos inibidores com o aumento da expressão de colágeno descoberta nos nossos resultados. Isto promoveria um custo muito elevado, o que comprometeria os insumos disponibilizados e inviabilizaria o desenvolvimento do presente trabalho. Estudos utilizando diversos tipos de irradiação ou diferentes protocolos de aplicação mostram diferentes efeitos sobre o colágeno.

A irradiação pode atuar tanto na proliferação de fibroblastos quanto sobre a produção de colágeno. Estes efeitos dependem da densidade de energia, número de aplicações e de comprimento de ondas utilizados^{30,31,35,36,37}. Schindl *et al.*³⁰, relata que dependendo da dose utilizada podem-se ter efeitos estimulatórios ou inibitórios, sugerindo que dose acima de 10 J/cm² inibe a produção de colágeno. Pereira *et al.*³¹, utilizando 3-4 J/cm² observaram intenso efeito sobre o crescimento de colágeno. Neste estudo utilizamos 5 J/cm² e encontramos efeitos semelhantes ao encontrado por Pereira *et al.*³¹.

Skinmer *et al.*³⁸, utilizaram comprimento de onda de 904 nm em cultura de fibroblastos e encontraram aumento na síntese de colágeno, mas não encontraram alteração no número de células. Observaram também que esta síntese foi maior quando as aplicações foram superiores a 4 dias. Pogrel e colaboradores³² utilizando 830 nm em cultura de fibroblastos, com diferentes dose e tempos de aplicação, observaram que não houve proliferação, migração e adesão destas células. Outros estudos com o mesmo comprimento de onda mostraram

sua atuação no processo de cicatrização acelerando suas fases, abreviando a fase de exsudação 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^{16,39}. Nossos resultados mostraram um aumento na deposição de colágeno tanto com 830 nm quanto 904 nm, corroborando com o encontrado por Medrado *et al.*³⁹ e Pugliese *et al.*¹⁶.

CONCLUSÃO

Nosso estudo apresentou limitações por se tratar de um estudo com uma amostra (número de animais) reduzida (n=18). Entretanto, os nossos resultados estão em consonância com os dados da literatura internacional sobre o tema. Isto sugere que a terapêutica experimental proposta se assemelham aos achados da literatura referente a sua influencia na síntese e deposição de colágeno.

Podemos concluir que nossos resultados que apesar de não encontrarmos diferenças significativas, novos estudos devem ser propostos para elucidar os reais mecanismos de atuação do *laser* de baixa intensidade nas lesões musculares. Especialmente, sobre a precisão entre os *lasers*; novos protocolos; um maior *n* amostral, bem como diferentes técnicas de análise como: a zimografia e os testes mecânicos para maiores inferências sobre os benefícios da *laser*terapia nas lesões musculares.

REFERÊNCIAS

- 1 Tumilty, S, Munn, J, McDonough, S, Hurley, D A, Basford, J R, Baxter, G D (2010). Low Level Laser Treatment of Tendinopathy: A Systematic Review with Meta-analysis. *Photomed. Laser Surg.* 28,3-16.
- 2 Tajali, SB, Macdermid, JC, Houghton, P, Grewal, R. Effects of low power laser irradiation on bone healing in animals: a meta-analysis. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research.* 2010,5:1.
- 3 Cressoni MDC, Giusti HHKD, Casarotto RA, Anaruma CA. The Effects of a 785-nm AlGaInP Laser on the Regeneration of Rat Anterior Tibialis Muscle After Surgically-Induced Injury. *Photomed. Laser Surg.* 2008;26(5):461-466.
- 4 Aimbire F, Albertini R, Pacheco MT, Castro-Faria-Neto HC, Leonardo PS, Iversen VV *et al.* Low level laser therapy induces dose-dependent reduction of TNF levels in acute inflammation. *Photomed. Laser Surg.* 2006;24:33-37.
- 5 Gál P, Vidinsky B, Toporcer T, Mokry M, Mozes S. Longauer F *et al.* Histological assessment of the effect of laser irradiation on skin wound healing in rats. *Photomed. Laser Surg.* 2006;24:480-488.

Referências (cont.)

- 6 Martins RABL, Albertini R, Martins PSLP, Bjordal JM, Neto HCCF. Spontaneous effects of low level laser therapy (650 nm) in acute inflammatory mouse pleurisy induced by carrageenan. *Photomed. Laser Surg.* 2005;23:377–381.
- 7 Albertini R, Aimbire FS, Correa FI, Ribeiro W, Cogo JC, Antunes E *et al.* Effects of different protocol doses of low power galliumaluminum- arsenate (Ga-Al-As) laser radiation (650 nm) on carrageenan -induced rat paw o edema. *J. Photochem. Photobiol. B.* 2004;74:101–107.
- 8 Lam TS. Laser stimulation of collagen synthesis in human skin fibroblast cultures. *Lasers Life Sci.* 1986;1:61–77.
- 9 Labbe RF, Skogerboe KJ, Davis HA, Rettmer RL. Laser photobioactivation mechanisms: In vitro studies using ascorbic acid uptake and hydroxyproline formation as biochemical markers of irradiation response. *Lasers Surg Med.* 1990;10(2):201–207.
- 10 Skinner SM, Gage JP, Wilce PA, Shaw RM. A preliminary study of the effects of laser radiation on collagen metabolism in cell culture. *Aust Dent J.* 1996;41(3):188–192.
- 11 Takala TE, Virtanen P. Biochemical composition of muscle extracellular matrix: the effect of loading. *Scand J Med Sci Sports.* 2000;10(6):321–325.
- 12 Letho M, Duance VC, Restall D. Collagen and fibronectin in a healing skeletal muscle injury. *J Bone Joint Surg Br.* 1985;67B(5):820–828.
- 13 Borges LF, Gutierrez PS, Marana HRC, Taboga SR. Picrosirius-polarization staining method as an efficient histopathological tool for collagenolysis detection in vesical prolapse lesions. *Micron.* 2007;38:580–583.
- 14 Basford JR. Laser therapy: scientific basis and clinical role. *Orthopedics* 1993; 16: 541–547.
- 15 Weiss N, Oron U. Enhancement of muscle regeneration in the rat gastrocnemius by low energy laser irradiation. *Anat. Embryol.* 1992;186:497–503.
- 16 Pugliese LS, Medrado AP, Reis SR, Andrade ZA. The influence of low-level laser therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers. *Pesqui Odontol Brás.* 2003;17:307–313.
- 17 Garavello-Freitas I, Baranauskas V, Joazeiro PP, Padovani CR, Dal Pai-Silva MDA Cruz-Hofling MA. Low-power laser irradiation improves histomorphometrical parameters and bone matrix organization during tibia wound healing in rats. *J. Photochem. Photobiol B.* 2003;70:81–9.
- 18 Fung DT, Ng GY, Leung MC, Tay DK. Effects of a therapeutic laser on the ultrastructural morphology of repairing medial collateral ligament in a rat model. *Lasers Surg Med.* 2003;32:286–93.
- 19 Ribeiro MAG, Junior RLCA, Barreto ALS, Oliveira VGM, Santos TB, Dantas CDF. Morphological analysis of second-intention wound healing in rats submitted to 16 J/cm² I 660 nm laser irradiation. *Indian J Dent Res.* 2009;20(3).
- 20 Rodrigo SM, Cunha A, Pozza DH, Blaya DS, Moraes JF, Weber JBB, Oliveira MG. Analysis of the Systemic Effect of Red and Infrared Laser Therapy on Wound Repair. *Photomed. Laser Surg.* 2009;27:929–935.
- 21 Maiya GA, Kumar P, Rao L. Effect of low heliumneon (He-Ne) laser irradiation on diabetic wound healing dynamics. *Photomed. Laser Surg.* 2005;23:187–190.
- 22 Reis SRA, Medrado AP, Marchionni AMT, Figueira C, Fracassi LD, Knop LAH. Effect of 670-nm Laser Therapy and Dexamethasone on Tissue Repair: A Histological and Ultrastructural Study. *Photomed. Laser Surg.* 2008;26:307–13.
- 23 Gonçalves WLS, Souza FM, Conti CL, Cirqueira JP, Rocha WA, Pires JGP *et al.* Influence of He-Ne laser therapy on the dynamics of wound healing in mice treated with anti-inflammatory drugs. *Braz J Med Biol Res.* 2007;40:877–84.
- 24 Gavish L, Perez L, Gertz SD. Low-Level Laser Irradiation Modulates Matrix Metalloproteinase Activity and Gene Expression in Porcine Aortic Smooth Muscle Cells. *Lasers Surg Med.* 2006;38:779–786.
- 25 Kim YD, Kim SS, Kim SJ, Kwon DW, Jeon ES, Son WS. Low-level laser irradiation facilitates fibronectin and collagen type I turnover during tooth movement in rats. *Lasers Med Sci.* 2010;25(1):25–31.
- 26 Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA. Princípios éticos para o uso de animais de laboratório. Disponível em: <<http://www.cobea.org.br>> Acesso em: 02/05/2007.
- 27 Doin-Silva R, Baranauskas V, Rodrigues-Simioni L, Cruz-Hofling MA. The Ability of Low Level Laser Therapy to Prevent Muscle Tissue Damage Induced by Snake Venom. *Photochem Photobiol.* 2009;85:63–9.
- 28 Warren GL, O'Farrell, Summan M, Hulderman T, Mishra D, Luster MI, Kuziel WA *et al.* Role of CC chemokines in skeletal muscle functional restoration after injury. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004; 286(5):C1031–6.
- 29 Pacifici M, Iozzo RV. Remodeling of the rough endoplasmic reticulum during stimulation of procollagen secretion by ascorbic acid in cultured chondrocytes. A biochemical and morphological study. *J Biol Chem.* 1988;263(5):2483–92.
- 30 Schindl A, Schindl M, Schon HP, Schindl L. Low-intensity laser therapy: a review. *J Investig Med.* 2000;8(5):312–36.
- 31 Pereira AN, Eduardo CP, Matson E, Marques MM. Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. *Lasers Surg Med.* 2002;31:263–7.

Referências (cont.)

- 32 Pogrel MA, Chen JW, Zhang K. Effects of low-energy gallium-aluminum-arsenide laser irradiation on cultured fibroblasts and keratinocytes. *Lasers Surg Med.* 1997;20:426-32.
- 33 Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2001;17:463–516.
- 34 Galis ZS, Muszynski M, Sukhova GK, Simon-Morrissey E, Unemori EN, Lark MW *et al.* Cytokine stimulated human vascular smooth muscle cells synthesize a complement of enzymes required for extracellular matrix digestion. *Circ Res.* 1994;75(1):181–9.
- 35 Karu T, Pyatibrat L, Kalendo G. Irradiation with HeNe laser increase ATP level in cells cultivated in vitro. *J Photochem Photobiol B.* 1995;27(3):219-23.
- 36 Fischer BD, Rennie S, Warren S, Magee D, Koh J. The effects of low power laser therapy muscle healing following acute blunt trauma. *J Phys Ther Sci.* 2000;12(1):49-55.
- 37 Amaral AC, Parizotto NA, Salvini TF. Dose-dependency of low-energy HeNe laser effect in regeneration of skeletal muscle in mice. *Lasers Med Sci.* 2001;16: 44-51.
- 38 Skinner SM, Gage JP, Wilce PA, Shaw RM. A preliminary study of the effects of laser radiation on collagen metabolism in cell culture. *Aust Dent J.* 1996;41(3):188-92.
- 39 Medrado ARAP, Pugliese LS, Reis SRA, Andrade ZA. Influence of low level laser therapy on wound healing and its biological action upon myofibroblasts. *Lasers Surg Med.* 2003;32:239–44.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos as Prof. Dr. Jussara Machado Lagrota Candido e Prof. Dr. Carla Eponina de Carvalho Pinto (Universidade Federal Fluminense – UFF), por nos proporcionar suporte técnico e, pelo apoio cedido a este estudo e as Funcionárias do laboratório de Imunopatologia da UFF, Bartira Davi e Nina Cortez pelo auxílio com a técnica histológica.