

# Avaliação da regeneração muscular em animais idosos após tratamento com laser de baixa intensidade

Evaluation of muscle regeneration in aged animals after treatment with low-level laser therapy

Adriana Pertille<sup>1</sup>, Aline B. Macedo<sup>2</sup>, Cássio P. V. Oliveira<sup>2</sup>

## Resumo

**Contextualização:** O processo de envelhecimento e suas consequentes alterações morfofisiológicas desencadeiam redução da habilidade regenerativa das células satélites, redução da vascularização tecidual e aumento da produção de fibroblastos, desenvolvendo-se um ambiente celular desfavorável para a regeneração muscular. **Objetivo:** Avaliar o efeito do tratamento com laser de baixa intensidade sobre a regeneração muscular de modelos experimentais idosos após contusão. **Método:** Foram utilizados 25 ratos machos, com 18 meses de idade, divididos em três grupos: grupo controle (CT), sem intervenção; grupo lesão (LE), com contusão muscular e sem tratamento e grupo laser (LA), com contusão muscular e tratado com laser de baixa intensidade, 830 nm, 30mW e 4 J/cm<sup>2</sup>. A contusão foi realizada no músculo tibial anterior, e as amostras coletadas após sete e 21 sessões de tratamento. O músculo foi designado às técnicas de Microscopia de Luz e *Immunoblotting*. **Resultados:** Após 21 dias de tratamento, houve redução significativa na área de inflamação/regeneração no grupo LA 21 comparado ao grupo LE 21. Na área de secção transversal das fibras em processo de regeneração, não houve diferença estatística entre os grupos LA e LE. A análise molecular evidenciou que o conteúdo de *MyoD* apresentou redução significativa no grupo LE 21 em relação ao CT. O conteúdo de Miogenina exibiu aumento no LE 21 comparado ao CT e, por fim, o conteúdo de TGF- $\beta$ 1 do grupo LE 21 aumentou em relação ao grupo CT. **Conclusão:** Para os parâmetros utilizados, o laser demonstrou eficácia na regeneração muscular em animais idosos somente por meio do seu efeito anti-inflamatório.

**Palavras-chave:** envelhecimento; regeneração; fisioterapia; terapia a laser de baixa intensidade.

## Abstract

**Background:** The aging process and its associated morphophysiological changes trigger a reduction in the regenerative ability of the satellite cells, a reduction of vascular tissue and an increase in the production of fibroblasts, developing a cellular environment unfavorable for muscle regeneration. **Objective:** The aim of this study was to evaluate the effect of low-level laser therapy on the muscle regeneration of old experimental rat models after contusion. **Method:** A total of 25 old rats, 18 months old, were divided into three groups: control group (CT) without treatment; injury group (IN) with muscle contusion and without treatment and laser group (LA) with contusion and low-level laser therapy, 830 nm, 30 mW e 4 J/cm<sup>2</sup>. The no invasive contusion was induced in the Tibialis Anterior muscle and the samples were collected after 7 and 21 treatment sessions. The muscle was evaluated by Light Microscopy and Immunoblotting. **Results:** After 21 days of treatment there was a significant reduction in the areas of inflammation/regeneration of the LA 21 group compared to IN 21 group. The cross-sectional area of the fibers in regeneration was not statistically different between the groups. Molecular analysis showed that the content of MyoD was statistically reduced in the IN 21 group compared to the CT group. The Myogenin content was increased in the IN 21 group compared to the CT group. Ultimately, the content of TGF- $\beta$ 1 on the IN 21 group was higher when compared to the CT group. **Conclusion:** Considering the parameters used, the laser therapy demonstrated to be effective for muscle regeneration in old rats, however only through its anti-inflammatory effect.

**Keywords:** aging; regeneration; physical therapy; low-level laser therapy.

**Recebido:** 03/02/2012 – **Revisado:** 29/05/2012 – **Aceito:** 03/06/2012

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia, Universidade Metodista de Piracicaba (UNIMEP), Piracicaba, SP, Brasil

<sup>2</sup>Laboratório de Plasticidade Neuromuscular, Programa de Pós-graduação em Fisioterapia, UNIMEP, Piracicaba, SP, Brasil

**Correspondência para:** Adriana Pertille, Programa de Pós-graduação em Fisioterapia, Universidade Metodista de Piracicaba, Rodovia do Açúcar, Km 156, Taquaral, CEP 13.400-911, Piracicaba, SP, Brasil, e-mail: apertille@unimep.br

## Introdução

A manutenção do potencial regenerativo do músculo esquelético depende da idade do indivíduo<sup>1</sup>. As alterações morfofisiológicas que ocorrem nos tecidos em decorrência do envelhecimento acarretam declínio da ativação e proliferação das células satélites, desequilíbrio nas vias de sinalização Notch e Wnt, lenta ativação de células inflamatórias, aumento da produção de fibroblastos, diminuição da vascularização, espessamento da lâmina basal e redução no nível de IGF-I. Em conjunto, essas alterações desencadeiam um ambiente celular desfavorável à regeneração muscular do idoso<sup>2-5</sup>.

A grande incidência de lesões musculares tem ocasionado aumento de estudos relacionados não somente ao processo de reparo, mas também aos recursos fisioterapêuticos<sup>6</sup>. Dentre os mais utilizados, o laser de baixa intensidade se destaca por desencadear a produção de adenosina trifosfato (ATP)<sup>7</sup>, favorecer a angiogênese e potencializar a entrada de células satélites quiescentes no ciclo celular<sup>8</sup>, sendo esses efeitos eficazes para tornar a regeneração muscular mais eficiente, reduzindo seu tempo e melhorando sua qualidade<sup>9,10</sup>.

Os efeitos do laser não estão restritos apenas à regeneração muscular. Oliveira et al.<sup>11</sup>, após indução de defeito ósseo na tíbia de ratos, observaram aumento da área de tecido ósseo neoformado induzido pela irradiação. Em processo de reparo tendíneo, Arruda et al.<sup>12</sup> identificaram que o tratamento com laser foi capaz de promover melhor grau de organização das fibras colágenas ao longo do eixo longitudinal. E, ainda, na cicatrização de ferida cutânea, Silveira et al.<sup>13</sup> observaram que o laser foi capaz de estimular a atividade antioxidante e proteger a célula contra danos oxidativos.

Embora bem fundamentados na literatura, a maioria dos estudos que utilizam o laser de baixa intensidade como recurso, seja em humanos, seja em modelos experimentais, são realizados em jovens ou adultos. Porém, sabe-se que o prejuízo da função muscular afeta sensivelmente a qualidade de vida do idoso, pois a perda de funcionalidade e a consequente dependência podem acarretar também problemas psicológicos e emocionais<sup>10</sup>.

Diante do aumento da expectativa de vida da população, é imprescindível para a prática clínica que o fisioterapeuta esteja bem fundamentado tanto nas especificidades do processo de regeneração muscular do idoso quanto na aplicabilidade e efetividade do laser de baixa intensidade, bem como sua respectiva dosimetria. Considerando os efeitos biológicos proporcionados pelo laser, tem-se a hipótese de que sua aplicação favorece o reparo tecidual mesmo com a disposição do processo de envelhecimento. Dessa forma, este estudo tem como objetivo avaliar o efeito do tratamento com laser de baixa intensidade sobre a regeneração muscular de modelos experimentais idosos após contusão.

## Método

Utilizaram-se 25 ratos machos da linhagem *Wistar*, com 18 meses de idade e peso corporal médio de 591,87±64.06 g. Os animais foram mantidos sob temperatura ambiente controlada, ciclo claro/escuro de 12 horas, com água e ração à vontade. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, SP, Brasil (Parecer 012/2010).

Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos experimentais (n=5): grupo controle (CT), os ratos permaneceram no biotério sem nenhum tipo de intervenção; grupo lesão (LE), os ratos foram submetidos à contusão, permanecendo sem tratamento, e grupo laser (LA), os ratos submetidos à contusão muscular receberam tratamento com laser de baixa intensidade. Os grupos LA e LE foram subdivididos com a finalidade de avaliar diferentes fases da regeneração muscular e, por essa razão, as terapias foram aplicadas durante sete sessões (LA 7) e durante 21 sessões de tratamento (LA 21), enquanto o grupo LE, apesar de não ter recebido tratamento, foi sacrificado no período correspondente (LE 7 e LE 21).

Para a realização da contusão não invasiva, os animais foram anestesiados via intramuscular com mistura de ketamina (0,09 mL/100 g) e xilazina (0,06 mL/100 g). Após anestesia e tricotomia, os animais foram posicionados no equipamento em decúbito lateral, com a pata direita voltada para cima e posicionada em flexão plantar máxima de tornozelo. Em seguida, uma carga de 284 g foi liberada da altura de 35 cm sobre o músculo tibial anterior (TA), totalizando três impactos consecutivos distribuídos na região proximal-média e medial do músculo<sup>14</sup>. Após o procedimento, realizou-se palpação e mobilização na pata direita para confirmação da ausência de fratura óssea.

## Tratamento

### *Laser de baixa intensidade*

Os animais dos grupos LA 7 e LA 21 receberam tratamento com laser de baixa intensidade através do aparelho *laserpulse* da IBRAMED®, classe 3B, diodo de arseneto de gálio-alumínio (GaAlAs), comprimento de onda de 830 nm, emissão contínua, potência de saída de 30 mW, área do feixe de 0,07 cm<sup>2</sup> e densidade de energia de 4 J/cm<sup>2</sup>. A terapia foi aplicada por meio da técnica pontual, distribuída em 2 pontos, sendo um ponto realizado imediatamente em cima da lesão e o outro no terço distal do músculo, com distância de 1 cm. A aplicação de cada ponto teve duração de 16 segundos, e foi utilizado filme transparente de policloreto de vinil (PVC) na caneta emissora de laser<sup>15</sup>. Previamente, o equipamento

foi calibrado pelo medidor de potência laser (Modelo *Laser Check*, COHERENT).

O tratamento teve início 24 horas após a contusão e ocorreu diariamente, com intervalos de 24 horas, frequência de cinco vezes por semana e intervalo de dois dias, totalizando sete ou 21 sessões, de acordo com o grupo.

### Eutanásia

Para a eutanásia dos animais, utilizou-se alta dose de anestésico, via intraperitoneal, seguida de perfusão cardíaca com 60 mL de solução *Phosphate Buffered Saline* (PBS). Posteriormente, o músculo TA direito foi retirado e dividido em duas partes iguais, sendo uma destinada à análise histológica e a outra destinada à técnica de *Immunoblotting*.

### Análise histológica

As amostras foram fixadas em suporte de madeira com *tragacanth gum*, em seguida, congeladas em isopentano a  $-80^{\circ}\text{C}$  e nitrogênio líquido a  $-159^{\circ}\text{C}$ . Para confecção das lâminas, os músculos foram seccionados transversalmente com espessura de 8  $\mu\text{m}$ , utilizando criostato (Microm-HS505E) e, então, corados com hematoxilina e eosina (HE).

Por meio de microscópio de luz (*Olympus, Optical Co. Ltd, Tokyo, Japan*) e software *Image Pro-Plus*<sup>®</sup> 6.2 (*Media Cybernetics*), analisou-se, de forma quantitativa, dois cortes aleatórios de cada animal através das objetivas de 4X e 20X. Na análise da área de inflamação/regeneração, mensurou-se a área do músculo em estágio de inflamação e regeneração, caracterizada por apresentar intenso infiltrado inflamatório e fibras em processo de regeneração. Os resultados foram obtidos calculando-se a proporção dessa área com o corte do músculo inteiro. Outra análise realizada foi a quantificação da área de secção transversal (AST) das fibras com o intuito de verificar sua maturação durante a regeneração, na qual se mensuraram e compararam as fibras musculares que apresentavam núcleo centralizado, indicativo de regeneração, e fibras normais. Para essa análise, foram mensuradas, em cada corte, 400 fibras em regeneração e 200 fibras normais.

### Análise molecular

Pela técnica de *Immunoblotting*, foi quantificado o conteúdo de *MyoD*, *Miogenina* e *TGF- $\beta$ 1* nos grupos experimentais. Os músculos foram homogeneizados em solução tampão contendo inibidores de protease e fosfatase (Triton 1%, pirofosfato de sódio 100 mM, 0,1 mg/mL de aprotinina, PMSF 2 mM e  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  10 mM). Os extratos foram centrifugados por 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  e o sobrenadante, tratado com tampão Laemmli (SDS 10%, glicerol 50%, azul de bromofenol 0,1%, tris-HCl 100 mM (pH 7,4). Então, 50 mg de proteína foram aplicados em gel

SDS-poliacrilamida 12%. As proteínas foram transferidas do gel para a membrana de nitrocelulose, utilizando o equipamento de eletrotransferência da Bio-Rad. As membranas foram bloqueadas por 1 hora, em temperatura ambiente, com 5% de leite desnatado diluído em solução basal (Trisma base 10 mM, NaCl 150 mM e *Tween-20* 0,02%). As membranas foram incubadas com anticorpos primários a  $4^{\circ}\text{C}$  durante a noite, lavadas com solução basal e incubadas com anticorpos secundários conjugados em peroxidase por 2 horas em temperatura ambiente. Para detectar as bandas imunorreativas, as membranas foram expostas ao kit de quimioluminescência (*Super Signal West Pico Chemiluminescent, Pierce*) por 5 minutos. A distribuição homogênea do carregamento das amostras foi verificada por meio da marcação com o corante Ponceau. A densitometria óptica das bandas foi quantificada pelo programa *Image J* (*The National Institute of Health, EUA*).

Foram utilizados os seguintes anticorpos primários: (1) *MyoD* (m-318), *rabbit policlonal*, Santa Cruz: sc-760; (2) *TGF- $\beta$ 1, mouse monoclonal*, *Sigma-Aldrich*, T7039; (3) *Miogenin, mouse monoclonal*, *Sigma* M5815. Os anticorpos secundários correspondentes foram: (1) *Goat anti-rabbit IgG-HRP*, sc-2004 (Santa Cruz) e (2) *Goat anti-mouse IgG-HRP*, sc-2005 (Santa Cruz).

### Análise estatística

Na análise estatística, aplicou-se o teste Shapiro-Wilk para verificar a normalidade da amostra. Mediante a distribuição normal dos dados, foi utilizado o teste ANOVA one-way seguido do teste Tukey, sendo os dados apresentados por meio de média e desvio-padrão. Para os dados com distribuição não normal, aplicou-se o teste Kruskal-Wallis e, posteriormente, o teste Student-Newman-Keuls. Nesse caso, os dados são apresentados em mediana, primeiro quartil e terceiro quartil. As análises foram processadas por meio dos softwares BioEstat 5.0 e SPSS 13.0, considerando-se significância de 5%.

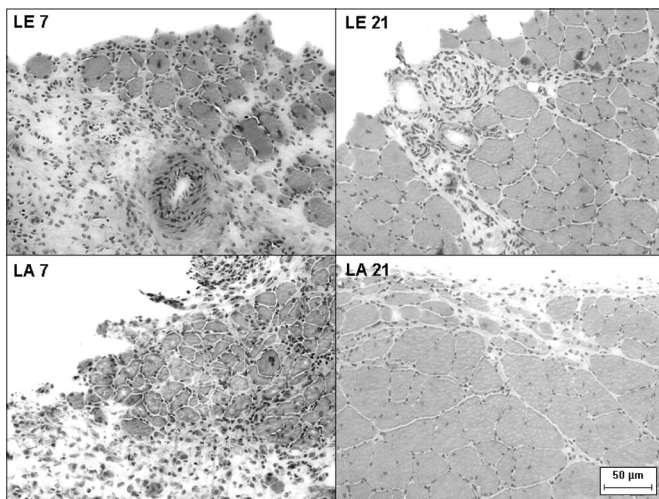
## Resultados

### Análise histológica

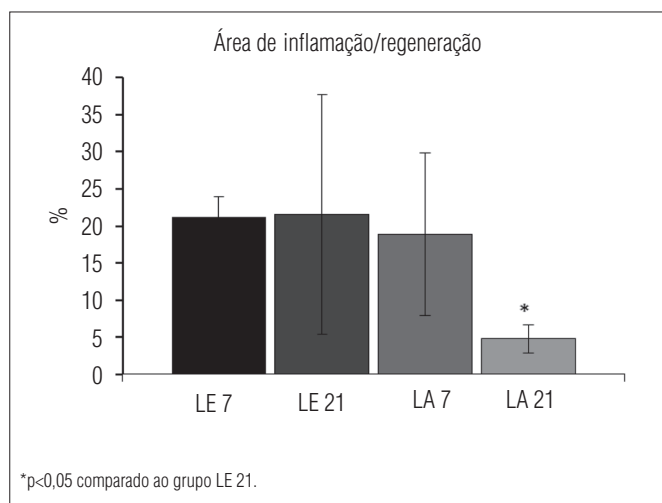
A análise histológica possibilitou visualizar e quantificar a área da lesão que, por sua vez, apresentou-se restrita à superfície do músculo TA e caracterizada pelo intenso infiltrado inflamatório, além de fibras em regeneração. No estágio inicial da regeneração, as fibras musculares apresentaram pequeno diâmetro, citoplasma escasso e fortemente basófilo, núcleo centralizado e aumentado em decorrência da intensa síntese protéica. Com o

avanço na reparação, elas exibiram aumento aparente da proporção citoplasma/núcleo, núcleo com tamanho próximo ao normal, menor AST quando comparadas às fibras normais, e redução de infiltrado inflamatório ao seu redor<sup>16-18</sup> (Figura 1).

A comparação da área de inflamação/regeneração entre os grupos demonstrou que o grupo LA 21 exibiu redução significativa quando comparado ao grupo LE 21. Tal resultado demonstra que, em sete sessões de tratamento, o laser não foi eficiente para reduzir a área da lesão, visto que não houve diferença entre os grupos LE 7 e LA 7. No entanto, com o aumento na quantidade de sessões de tratamento, o laser revelou efeito anti-inflamatório eficaz para regeneração muscular de ratos idosos. A análise intragrupo evidenciou a eficácia do laser, pois os grupos LA 7 e 21 sessões demonstraram redução significativa na área da lesão, enfatizando o avanço da regeneração muscular após 21 sessões de tratamento (Figura 2).



**Figura 1.** Processo de regeneração muscular nos grupos: lesão 7 (LE 7), lesão 21 (LE 21), laser 7 (LA 7) e laser 21 (LA 21).



**Figura 2.** Área em processo de inflamação/regeneração nos grupos lesão 7 (LE 7), lesão 21 (LE 21), laser 7 (LA 7) e laser 21 (LA 21). (Média±DP).

As fibras musculares dos grupos LE 7 e LA 7 apresentaram AST semelhantes entre si e significativamente reduzidas em comparação às fibras do grupo CT, indicando que as células desses grupos estavam em fase inicial de regeneração e não atingiram valores próximos à normalidade. Após 21 sessões de tratamento, apesar da AST das fibras musculares apresentarem valores próximos ao normal, não houve diferença estatística entre os grupos tratados em relação ao LE. A comparação intragrupo demonstrou diferença na AST das fibras musculares do grupo LA 7 e 21, sugerindo a maturação das fibras musculares ao longo do tempo. Porém, para os parâmetros utilizados neste estudo, o laser não foi capaz de acelerar a maturação das fibras musculares de ratos idosos, sugerindo que a regeneração ocorreu de forma espontânea e não acelerada pelo tratamento (Tabela 1).

## Análise molecular

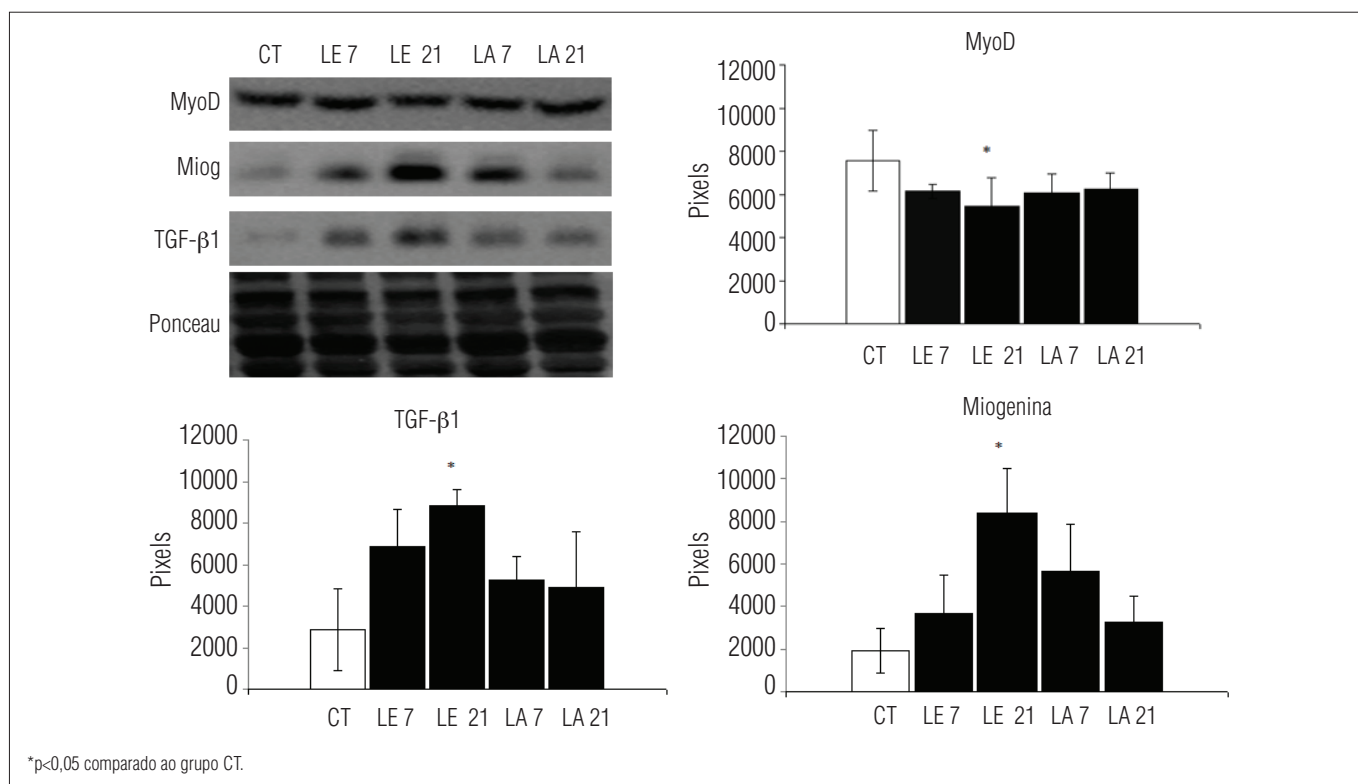
Um marcador peculiar à fase de ativação e proliferação das células satélites é a expressão de *MyoD*. Os achados demonstram que o grupo LE 21 apresentou o conteúdo de *MyoD* reduzido em relação ao grupo CT. Considerando que nenhum dos grupos experimentais apresentou conteúdo de *MyoD* elevado em relação ao grupo CT, sugere-se que as fases de ativação e proliferação das células satélites já tenham ocorrido nos períodos estudados, dessa maneira o conteúdo de *MyoD* apresenta-se normalizado (Figura 3).

O conteúdo de Miogenina, um marcador característico da fase de diferenciação das células satélites em fibras musculares durante o processo de regeneração, apresentou-se semelhante nos grupos CT, LE 7 e LA 7. Logo, nesse primeiro momento, a regeneração parece ter acontecido de forma espontânea, não havendo contribuição da terapia. A análise realizada na fase tardia da regeneração exibiu aumento significativo no grupo LE 21 em relação ao grupo CT, enquanto o grupo LA 21 apresentou conteúdo semelhante ao grupo CT. Tais resultados podem sugerir retardo na regeneração muscular do grupo LE 21, uma vez que o grupo LA 21 exibiu conteúdo reduzido de Miogenina provavelmente por ter passado pela fase de diferenciação celular, diferentemente do grupo LE 21, que ainda se

**Tabela 1.** AST das fibras musculares dos grupos experimentais. (Mediana±Q1-Q3).

Grupo	Área das fibras com núcleo periférico (µm <sup>2</sup> )	
	Mediana	Q1 - Q3
Controle	2913,39	2462,95-2920,24
Área das fibras com núcleo centralizado (µm <sup>2</sup> )		
Lesão 7	836,78*	836,78-870,37
Lesão 21	1424,28	1424,28-1668,98
Laser 7	1066,87*†	820,79-1270,73
Laser 21	2633,21	1747,21-3300,47

\*p<0,05 comparado ao grupo CT. †p<0,05 comparado ao grupo LA 21.



**Figura 3.** Imagens das bandas de proteínas e do carregamento das amostras (Ponceau). Exibição dos conteúdos de *MyoD*, *Miogenina* e *TGF-β1* nos grupos controle (CT), lesão 7 (LE 7), lesão 21 (LE 21), laser 7 (LA 7) e laser 21 (LA 21) (Média±DP).

encontrava nessa fase. Porém, não é possível afirmar eficácia do tratamento proposto, já que não houve diferença entre os grupos tratado e lesão (Figura 3).

Mediante a predisposição do ambiente celular envelhecido para a formação de fibrose durante o processo de regeneração muscular, também se considerou importante verificar o conteúdo de uma citocina envolvida na formação de colágeno, o *TGF-β1*. O grupo LE 21 apresentou o conteúdo de *TGF-β1* significativamente elevado em comparação ao grupo CT. Apesar de o grupo LA ter sido semelhante ao CT, não é possível afirmar a influência do laser em prevenir a formação de fibrose, pois não houve diferença entre os grupos tratado e lesão (Figura 3).

## Discussão

De acordo com o que foi previamente proposto neste estudo, o tratamento com laser de GaAlAs, aplicado com densidade de energia de 4 J/cm<sup>2</sup>, demonstrou propriedade para reduzir o processo inflamatório da lesão após 21 sessões de tratamento em modelo experimental idoso.

A lesão do tipo contusão selecionada para esta pesquisa é semelhante às lesões originadas por traumas de força compressiva que ocorrem no decorrer da vida, principalmente

durante a prática de esportes, sendo assim de extrema relevância clínica<sup>19</sup>. O músculo TA foi eleito para receber a contusão pela sua localização superficial, facilitando o acesso à lesão.

Ao estudar regeneração muscular em animais idosos, é preciso considerar a instalação do processo de envelhecimento e o efeito que ele desencadeia na regeneração. O declínio na quantidade de células satélites quiescentes no músculo esquelético, somado ao conjunto de fatores que prejudicam sua ativação e proliferação, resulta no comprometimento da funcionalidade dessas células e, consequentemente, na deficiência da capacidade regenerativa do músculo esquelético de indivíduos idosos<sup>20,21</sup>.

A alteração no potencial miogênico das células satélites também foi visualizada por Beccafico et al.<sup>22</sup> em cultura de células musculares de jovens (idade média de 30 anos) e idosos (idade média de 83 anos). Após sete dias de diferenciação celular *in vitro*, a quantidade de células satélites não foi significativamente diferente entre os grupos, apesar de se apresentar reduzida no idoso. Entretanto, a análise do índice de fusão (IF), estabelecido como a pontencialidade dos mioblastos mononucleados fundirem-se em miotúbulos multinucleados, indicou que o IF foi significativamente reduzido nas células musculares de idosos, comparadas com as dos jovens. Tais resultados sugerem que o déficit da capacidade regenerativa do músculo, em virtude do envelhecimento, não

ocorre apenas pela redução na quantidade de células satélites quiescentes, mas, provavelmente, pelo comprometimento durante a fase de diferenciação.

Marcadores-chave característicos do processo de regeneração muscular foram estudados por van der Poel et al.<sup>23</sup> e comparados entre animais jovens, adultos e idosos. As análises realizadas durante 12, 24, 36, 48 e 72 horas após a lesão verificaram que os níveis basais de citocinas inflamatórias (TNF  $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , INF  $\gamma$ , CD18 e IL-18) eram elevados nos animais idosos, quando comparados com animais jovens e adultos, além de essas citocinas permanecerem aumentadas nos animais idosos mesmo após 72 horas da lesão. Apesar de o presente estudo não ter quantificado citocinas inflamatórias, essa desregulação oriunda do envelhecimento também pode ser observada por meio da morfometria, uma vez que o grupo LE 21 exibiu intenso infiltrado inflamatório, mesmo após longo período da lesão.

Estudos envolvendo regeneração muscular em animais jovens podem favorecer o entendimento da fase inflamatória prolongada em virtude do envelhecimento. Winkler et al.<sup>24</sup> realizaram lesão no músculo sóleo de animais jovens e observaram que, após quatro semanas da lesão, não havia inflamação no local, apenas tecido fibroso denso em desenvolvimento, diferentemente do que foi observado neste estudo.

O processo de regeneração muscular desencadeia a ativação das células satélites e, com elas, são expressos marcadores específicos em cada fase que percorrem. A fase inicial de ativação e proliferação das células é caracterizada pela expressão de *MyoD*, a qual exibe aumento 3 horas após a lesão, atingindo seu pico em 12 horas e, depois desse período, volta a se normalizar<sup>25,26</sup>. No presente estudo, as amostras foram coletadas após sete e 21 sessões de tratamento, o que justifica o conteúdo de *MyoD* estar semelhante ou até mesmo reduzido nos grupos experimentais em comparação ao grupo CT.

Com o avançar da regeneração, é expressa a Miogenina, um marcador peculiar da fase de diferenciação das células satélites para reparo ou formação de novos mioblastos. Em animais jovens, seu conteúdo apresenta aumento por volta do 3º dia após a lesão, atingindo seu pico no 7º dia, e normalizando-se em seguida<sup>25,26</sup>. Em contrapartida, esses dados não foram semelhantes aos achados do presente estudo, uma vez que o conteúdo de Miogenina do grupo LE 21 exibiu aumento significativo em comparação ao grupo CT, mesmo após quatro semanas da lesão muscular. Tal fato pode ser atribuído ao retardo no processo de diferenciação celular em virtude do envelhecimento no modelo experimental utilizado.

O grupo que recebeu tratamento, apesar de apresentar o conteúdo de Miogenina semelhante ao do grupo CT, não

diferiu do grupo LE. Dessa forma, não é possível afirmar os benefícios do laser para promover a regeneração muscular de animais idosos, considerando os parâmetros utilizados.

Os mesmos marcadores miogênicos foram observados por van der Poel et al.<sup>23</sup>, em que a expressão de *MyoD* em animais jovens e adultos apresentou aumento significativo após 72 horas da lesão, enquanto, no mesmo período, esse aumento não foi visualizado nos animais idosos. Com relação à Miogenina, após sete dias da lesão não foi detectável aumento significativo em sua expressão nos animais idosos; entretanto, nesse mesmo período, houve aumento de 90% nos animais jovens e adultos.

O TGF- $\beta$ 1 é uma citocina caracteristicamente expressa durante a formação de fibras colágenas, sendo, assim, comumente utilizada para investigar a formação de fibrose. Contudo, essa citocina também exerce influência sobre o estado de quiescência das células satélites, como foi verificado por Rathbone et al.<sup>27</sup>. A adição de TGF- $\beta$ 1 durante as primeiras 48 horas de cultura de células satélites de ratos adultos foi capaz de reduzir a quantidade de *MyoD*, demonstrando que o TGF- $\beta$ 1 interfere na ativação celular, fazendo com que as células permaneçam em estado de quiescência. Nesse sentido, o aumento no conteúdo de TGF- $\beta$ 1, observado no grupo LE 21, também pode ter contribuído para o retardo no processo de regeneração.

O laser com diodo de GaAlAs (830 nm) foi selecionado para esta pesquisa devido ao seu alto comprimento de onda, tendo em vista a necessidade de o feixe atingir o músculo, uma vez que é essa propriedade que define a profundidade de penetração do laser no tecido irradiado. A densidade de energia estabelecida foi de 4 J/cm<sup>2</sup> por ponto por ser indicada para processo inflamatório agudo<sup>28</sup>.

Assim como no presente trabalho, a efetividade da terapia laser (633 nm) aplicada com baixa dose foi verificada por Iyomasa et al.<sup>29</sup>, que utilizaram 5 J/cm<sup>2</sup> e 10 J/cm<sup>2</sup> de laser HeNe após contusão no músculo TA de gerbilos jovens. Após o tratamento durante sete dias consecutivos, visualizaram aumento da atividade mitocondrial nas fibras musculares, aumento de fibroblastos e macrófagos e estímulo da angiogênese, sugerindo efetividade de ambas as doses utilizadas para a regeneração muscular. A efetividade do laser para redução do processo inflamatório também foi visualizada no presente estudo, contudo, com a diferença de que esse efeito foi evidente após 21 sessões de tratamento, podendo esse retardo ser atribuído ao envelhecimento.

Rennó et al.<sup>30</sup> analisaram o padrão regenerativo do músculo de animais adultos após aplicação do laser de 830 nm na tentativa de investigar a ação da laserterapia aplicada com alta dosagem, uma vez que utilizaram densidade de energia de

50 J/cm<sup>2</sup> em um único ponto. Ao término das seis sessões de tratamento, os resultados revelaram que o laser proporcionou redução da resposta inflamatória por meio da análise histológica, e ainda, por meio da imunohistoquímica, demonstrou diminuição na expressão de COX-2, desencadeando efeitos positivos no metabolismo do músculo após lesão.

Apesar da frequente utilização desse recurso na clínica, ainda não há uma padronização na literatura com relação aos parâmetros ideais a serem utilizados para a regeneração muscular. Neste estudo, preconizou-se por aplicar a terapia diariamente, utilizando-se baixa dosagem (densidade de energia de 4 J/cm<sup>2</sup>), visando ao acúmulo dos efeitos ao longo do período de tratamento composto por sete e 21 sessões. Contudo, levando em consideração os achados de outros estudos e o atraso natural da regeneração durante o envelhecimento, sugere-se que os parâmetros

utilizados não foram suficientes para estimular o tecido de forma efetiva. Novos estudos devem ser realizados utilizando densidade de energia elevada e diferentes períodos de análise em virtude do atraso na regeneração que ocorre com o envelhecimento.

## Conclusão

Considerando-se as análises morfológicas e moleculares realizadas, assim como os parâmetros utilizados, conclui-se que o laser demonstrou eficácia para a regeneração muscular em animais idosos, somente pelo seu efeito anti-inflamatório, tendo em vista que o tratamento não influenciou o conteúdo das proteínas estudadas.

## Referências

- Chargé SB, Brack AS, Hughes SM. Aging-related satellite cell differentiation defect occurs prematurely after Ski-induced muscle hypertrophy. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002;283(4):1228-41.
- Desaki J. Regeneration of muscle fibers in the extensor digitorum longus muscle of the aged rat. *J Electron Microscop* (Tokyo). 2008;57(2):59-66.
- Silva H, Conboy IM. Aging and stem cell renewal. [livro na internet]. Cambridge: Harvard Stem Cell Institute; 2008[acesso 2010 Jun 14]. Disponível em: <http://www.stembook.org>.
- Carosio S, Berardinelli MG, Aucello M, Musarò A. Impact of ageing on muscle cell regeneration. *Ageing Res Rev*. 2011;10(1):35-42.
- Degens H. The role of systemic inflammation in age-related muscle weakness and wasting. *Scand J Med Sci Sports*. 2010;20(1):28-38.
- Reddy GK. Photobiological basis and clinical role of low-intensity lasers in biology and medicine. *J Clin Laser Med Surg*. 2004;22(2):141-50.
- Shefer G, Partridge TA, Heslop L, Gross JG, Oron U, Halevy O. Low-energy laser irradiation promotes the survival and cell cycle entry of skeletal muscle satellite cells. *J Cell Sci*. 2002;115(Pt 7):1461-9.
- Ortiz MCS, Carrinho PM, Santos AAS, Gonçalves RC, Parizotto NA. Laser de baixa intensidade: princípios e generalidades – Parte 1. *Fisioter Bras*. 2001;2:221-40.
- Barbosa AM, Villaverde AB, Guimarães-Souza L, Ribeiro W, Cogo JC, Zamuner SR. Effect of low-level laser therapy in the inflammatory response induced by Bothrops jararacussu snake venom. *Toxicon*. 2008;51(7):1236-44.
- Lacourt MX, Marini LL. Decréscimo da função muscular decorrente do envelhecimento e a influência na qualidade de vida do idoso: uma revisão de literatura. *Revista Brasileira de Ciência do Envelhecimento Humano*. 2006;3(1):114-21.
- Oliveira P, Sperandio E, Fernandes KR, Pastor FAC, Nonaka KO, Renno ACM. Comparison of the effects of low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasound on the process of bone repair in the rat tibia. *Rev Bras Fisioter*. 2011;15(3):200-5.
- Arruda ERB, Rodrigues NC, Taciro C, Parizotto NA. Influences of different low level laser therapy wavelengths in rat tendon regeneration after tenotomy. *Rev Bras Fisioter*. 2007;11(4):283-8.
- Silveira PCL, Silva LA, Tuon T, Freitas TP, Streck EL, Pinho RA. Effects of low-level laser therapy on epidermal oxidative response induced by wound healing. *Rev Bras Fisioter*. 2009;13(4):281-7.
- Facio FA, Minamoto VB. Análise morfológica a curto e longo prazo do músculo tibial anterior após contusão. *Fisioter Mov*. 2006;19(1):73-80.
- Guirro RRJ, Guirro ECO, Martins CC, Nunes FR. Analysis of low-level laser radiation transmission in occlusive dressings. *Photomed Laser Surg*. 2010;28(4):459-63.
- Grounds MD, Torrisi J. Anti-TNFalpha (Remicade) therapy protects dystrophic skeletal muscle from necrosis. *FASEB J*. 2004;18(6):676-82.
- Grounds MD, Davies M, Torrisi J, Shavlakadze T, White J, Hodgetts S. Silencing TNF $\alpha$  activity by using Remicade or Enbrel blocks inflammation in whole muscle grafts: an in vivo bioassay to assess the efficacy of anti-cytokine drugs in mice. *Cell Tissue Res*. 2005;320(3):509-15.
- Marques MJ, Machado RV, Minatel E, Santo Neto H. Disodium cromoglycate protects dystrophin-deficient muscle fibers from leakiness. *Muscle Nerve*. 2008;37(1):61-7.
- Järvinen TAH, Järvinen TLN, Kääriäinen M, Kalimo H, Järvinen M. Muscle injuries: biology and treatment. *Am J Sports Med*. 2005;33(5):745-64.
- Vignaud A, Noirez P, Besse S, Rieu M, Barritault D, Ferry A. Recovery of slow skeletal muscle after injury in the senescent rat. *Exp Gerontol*. 2003;38(5):529-37.
- Brack AS, Rando TA. Intrinsic changes and extrinsic influences of myogenic stem cell function during aging. *Stem Cell Rev*. 2007;3(3):226-37.
- Beccafico S, Puglielli C, Pietrangelo T, Bellomo R, Fanò G, Fulle S. Age-dependent effects on functional aspects in human satellite cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2007;1100:345-52.
- van der Poel C, Gosselin LE, Schertzer JD, Ryall JG, Swiderski K, Wondemaghen M, et al. Ageing prolongs inflammatory marker expression in regenerating rat skeletal muscles after injury. *J Inflamm (Lond)*. 2011;8(1):41.
- Winkler T, von Roth P, Matziolis G, Schumann MR, Hahn S, Strube P, et al. Time course of skeletal muscle regeneration after severe trauma. *Acta Orthop*. 2011;82(1):102-11.
- Srikuea R, Pholpramool C, Kitiyanant Y, Yimlamai T. Satellite cell activity in muscle regeneration after contusion in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2010;37(11):1078-86.
- Corbu A, Scaramozza A, Badiali-DeGiorgi L, Tarantino L, Papa V, Rinaldi R, et al. Satellite cell characterization from aging human muscle. *Neuro Res*. 2010;32(1):63-72.
- Rathbone CR, Yamanouchi K, Chen XK, Nevoret-Bell CJ, Rhoads RP, Allen RE. Effects of transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ 1) on satellite cell activation and survival during oxidative stress. *J Muscle Res Cell Motil*. 2011;32(2):99-109.
- Vladimirov YA, Osipov AN, Klebanov GI. Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation. *Biochemistry (Mosc)*. 2004;69(1):81-90.
- Iyomasa DM, Garavelo I, Iyomasa MM, Watanabe L, Issa JPM. Ultrastructural analysis of the low level laser therapy effects on the lesioned anterior tibial muscle in the Gerbil. *Micron*. 2009;40(4):413-8.
- Rennó ACM, Toma RL, Feitosa SM, Fernandes K, Bossini PS, Oliveira P, et al. Comparative effects of low-intensity pulsed ultrasound and low-level laser therapy on injured skeletal muscle. *Photomed Laser Surg*. 2011;29(1):5-10.