

# Laser de baixa intensidade favorece a regeneração muscular em modelo experimental desnutrido e recuperado

*Low-intensity laser favors muscle regeneration in a malnourished and recovered experimental model*

*Láser de baja intensidad favorece la regeneración muscular en modelo experimental desnutrido y recuperado*

Maisa Cardoso da Silva<sup>1</sup>, Rafael Schimith da Silveira<sup>1</sup>, Cintia Yuri Matsumura<sup>2</sup>, Adriana Pertille<sup>3</sup>

**RESUMO** | A terapia por laser de baixa intensidade (*Low-Level Laser Therapy* - LLLT) é utilizada com frequência nas lesões musculares, mas precisa ser investigada em modelo de desnutrição. O objetivo desse estudo foi analisar os efeitos da LLLT na regeneração muscular de ratos submetidos à desnutrição e recuperação proteica. Foram utilizados 40 ratos *Wistar*, recém-desmamados, divididos em grupo controle (C), que consumiu ração normoproteica (14% caseína), e grupo desnutrido (D), que consumiu ração hipoproteica (6% caseína) por 45 dias e ração normoproteica até o final do experimento. Posteriormente, o músculo tibial anterior direito foi criolesado e tratado com LLLT (AsGaAl 830nm, 30mW, 20J/cm<sup>2</sup>), três vezes por semana, por 7 e 21 dias. Houve redução da área de inflamação/regeneração no grupo C21 comparado ao D21 ( $p<0,05$ ), sendo mais evidente com a LLLT (C21L e D21L). O conteúdo de TNF- $\alpha$  foi reduzido após 21 dias da lesão. A área de densidade de tecido conjuntivo (ADTC) foi menor nos grupos C21 e C21L comparados aos respectivos grupos desnutridos ( $p<0,05$ ). A LLLT reduziu a ADTC no grupo D21L quando comparado do D21 ( $p<0,05$ ), porém o conteúdo de TGF- $\beta$ 1 não foi influenciado. A área de secção transversa (AST) da fibra muscular aumentou nos grupos 21 dias. A m-TOR apresentou maior conteúdo no grupo C21L quando comparado ao D21L ( $p<0,05$ ). Concluiu-se que a LLLT favoreceu a regeneração muscular

na fase tardia no modelo experimental de desnutrição pós-natal e posterior recuperação proteica.

**Descritores** | Desnutrição; Músculos/Lesões; Terapia por Luz de Baixa Intensidade.

**ABSTRACT** | Low-Level Laser Therapy - LLLT is used frequently on muscle lesions, but needs to be investigated in a malnutrition model. The aim of this study was to analyze the effects of LLLT on muscle regeneration of rats subjected to malnutrition and protein recovery. Forty recently weaned *Wistar* rats were used, divided into control group (C), subjected to a normal-protein diet (14% casein), and the malnourished group (D), subjected to a low-protein diet (6% casein) for 45 days and to a normal-protein diet until the end of the experiment. Subsequently, the right tibialis anterior muscle was subjected to cryogenic cooling and treated with LLLT (830 nm AsGaAl, 30 mW, 20 J/cm<sup>2</sup>), three times a week, for 7 and 21 days. There was a reduction of the inflammation/regeneration area in the C21 group compared to D21 ( $p<0.05$ ), which became more evident with the LLLT (C21L and D21L). The TNF- $\alpha$  contents were reduced after 21 days of the injury. The connective tissue density area (CTDA) was lower in the C21 and C21L groups compared to the respective malnourished groups ( $p<0.05$ ). LLLT reduced the CTDA in group D21L in comparison to D21 ( $p<0.05$ ),

<sup>1</sup>Discente do Programa de Mestrado em Ciências do Movimento Humano da Universidade Metodista de Piracicaba (Unimep) - Piracicaba (SP), Brasil.

<sup>2</sup>Professora doutora assistente do Departamento de Anatomia do Instituto de Biotecnologia da Universidade Júlio de Mesquita Filho (Unesp) - Botucatu (SP), Brasil.

<sup>3</sup>Professora doutora do Programa de Pós-Graduação em Ciências do Movimento Humano da Universidade Metodista de Piracicaba (Unimep) - Piracicaba (SP), Brasil.

but the TGF- $\beta$ 1 contents were not influenced. The cross-sectional area (CSA) of the muscle fiber increased in the 21-day groups. Higher levels of m-TOR were found in the C21L group when compared to D21L ( $p < 0.05$ ). It was concluded that LLLT favored muscle regeneration in the late stage of the experimental model of postnatal malnutrition and subsequent protein recovery.

**Keywords** | Malnutrition; Muscles/Injuries; Low-Level Laser Therapy.

**RESUMEN** | La terapia por láser de baja intensidad (*Low-Level Laser Therapy* - LLLT) es utilizada con frecuencia en las lesiones musculares, sin embargo, precisa ser investigada en modelo de desnutrición. El objetivo de ese estudio fue analizar los efectos de la LLLT en la regeneración muscular de ratones sometidos a la desnutrición y a la recuperación proteica. Fueron utilizados 40 ratones *Wistar*, recién-destetados, divididos en grupo control (C), que consumió ración normoproteica (el 14% caseína), y grupo desnutrido (D), que consumió ración hipoproteica (el 6% caseína) por 45 días y ración normoproteica hasta el final del

experimento. Posteriormente, el músculo tibial anterior derecho que tuvo criolesión y fue tratado con LLLT (AsGaAl 830nm, 30mW, 20J/cm<sup>2</sup>), tres veces a la semana, por 7 y 21 días. Hubo reducción del área de inflamación/regeneración en el grupo C21 comparado al D21 ( $p < 0,05$ ), siendo más evidente con la LLLT (C21L y D21L). El contenido de TNF- $\alpha$  fue reducido después de 21 días de la lesión. El área de densidad de tejido conjuntivo (ADTC) fue más pequeña en los grupos C21 y C21L comparados a los respectivos grupos desnutridos ( $p < 0,05$ ). La LLLT redujo la ADTC en el grupo D21L cuando comparado del D21 ( $p < 0,05$ ), sin embargo, el contenido de TGF- $\beta$ 1 no fue influenciado. El área de sección transversa (AST) de la fibra muscular incrementó en los grupos 21 días. La m-TOR presentó contenido más grande en el grupo C21L cuando comparado al D21L ( $p < 0,05$ ). Se concluyó que la LLLT favoreció la regeneración muscular en la etapa tardía en el modelo experimental de desnutrición posnatal y posterior recuperación proteica.

**Palabras clave** | Desnutrición; Músculos/Lesiones; Terapia por Luz de Baja Intensidad.

## INTRODUÇÃO

Lesões musculares são comuns e a incapacidade gerada por elas está diretamente relacionada às propriedades intrínsecas de recuperação do músculo<sup>1</sup>. Essas envolvem a presença de células satélites com capacidade de proliferação e diferenciação de novas fibras e a formação da cicatriz<sup>2</sup>, composta principalmente por colágeno, devido ao acúmulo de matriz extracelular<sup>3</sup>.

Como opção de tratamento para a recuperação de lesões musculares, a terapia por *laser* de baixa intensidade (*Low-Level Laser Therapy* - LLLT) é utilizada, pois modifica o metabolismo celular<sup>4</sup> e apresenta uma série de vantagens quando comparada aos tratamentos convencionais, tais como: diminuir o tempo de cicatrização e garantir melhor reparo da lesão em pacientes que, por conta de alguma condição sistêmica, como a desnutrição, o diabetes e o hipotireoidismo, têm esse processo prejudicado<sup>5</sup>.

A desnutrição é uma condição decorrente do aporte insuficiente de nutrientes e energia ou do inadequado aproveitamento biológico dos alimentos ingeridos, não se relacionando, necessariamente, à condição de fome do indivíduo<sup>6</sup>. Na desnutrição, o processo de reparação tecidual é prejudicado, pois há

alterações no processo de síntese proteica e quebra de colágeno<sup>7</sup>.

Efeitos positivos da LLLT no reparo de feridas cutâneas de animais desnutridos foram observados, com diferentes comprimentos de onda e densidades de energia<sup>8,9</sup>, entretanto a ação da LLLT na regeneração muscular de animais desnutridos é pouco explorada.

O objetivo deste estudo foi analisar os efeitos da LLLT (830nm) na regeneração muscular de ratos submetidos à desnutrição e recuperação proteica.

## METODOLOGIA

Foram utilizados 40 ratos jovens da linhagem *Wistar* mantidos no Biotério da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Metodista de Piracicaba (Unimep), sob temperatura ambiente de 23°C±2°C, ciclo claro/escuro de 12 horas e água e ração *ad libitum*. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Unimep), sob o protocolo nº 03/2016.

As dietas normoproteica (AIN 93M - 14%) e hipoproteica (AIN - 6%), comercializadas por Prag Soluções Serviços e Comércio Ltda. foram utilizadas, como descrito na Tabela 1.

Tabela 1. Composição das dietas normoproteica (14%) e hipoproteica (6%) utilizadas pelos grupos

Ingredientes	Dieta AIN 93 - 14% proteína (p/kg)	Dieta AIN - 6% proteína (p/kg)
Amido de milho	465,7	508,0
<b>Caseína</b>	<b>140,0</b>	<b>66,0</b>
Amido dextrinizado	155,0	166,5
Sacarose	100,0	121,0
Óleo de soja	40,0	40,0
Fibra	50,0	50,0
L-cistina	1,8	1,0
Cloreto colina	2,5	2,5
Mix mineral G	35,0	35,0
Mix vitamínico	10,0	10,0
Total	1000,0	1000,0

Fonte: Reeves, Nielsen e Fahey Jr<sup>10</sup>

Inicialmente, os animais com 21 dias de vida foram divididos aleatoriamente em dois grupos – Controle (C, n=20): recebeu a dieta normoproteica; e Desnutrido/Recuperado (D, n=20): recebeu dieta hipoproteica por 45 dias e, posteriormente, foram recuperados com dieta normoproteica até o final do experimento. Ao completar 90 dias de dieta (111 dias de vida), todos os animais sofreram criolesão e foram subdivididos em 8 grupos (n=5): Lesão 7 dias (C7/D7); Lesão+LLLT 7 dias (C7L/D7L); Lesão 21 dias (C21/D21); Lesão+LLLT 21 dias (C21L/D21L), sendo eutanasiados ao final do tratamento.

Para a criolesão os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal (cloridrato de cetamina 1,16g/10mL e cloridrato de xilazina 2g/100mL, dose de 0,09 e 0,06mL/100g de massa corporal, respectivamente). O músculo tibial anterior (TA) direito foi exposto e pressionado com uma barra metálica de 1cm×0,5cm resfriada em nitrogênio líquido por 10 segundos. O procedimento foi realizado duas vezes, segundo o protocolo de Miyabara et al.<sup>11</sup>.

Para o tratamento utilizou-se o *laser* de baixa intensidade de diodo AsGaAl 830nm, potência de 30mW e densidade de energia de 20J/cm<sup>2</sup>, por meio da técnica pontual (único ponto) acima da área lesada, sendo os animais contidos manualmente por um pesquisador

enquanto outro aplicava o *laser*. O tratamento iniciou-se 24 horas após a lesão, três vezes na semana, em dias intercalados<sup>12</sup>. Os animais dos grupos C7L e D7L receberam três sessões e os animais dos grupos C21L e D21L receberam nove sessões de tratamento.

Após o período experimental, os animais foram anestesiados como descrito anteriormente e eutanasiados. O músculo TA foi retirado, pesado e dividido transversalmente em duas partes iguais para microscopia de luz e para *immunoblotting*.

Os músculos congelados foram seccionados transversalmente (10µm) utilizando um criostato (HYRAX C 25 – Zeiss), os cortes foram corados com hematoxilina e eosina. Utilizaram-se as lâminas para mensuração da área de secção transversa (AST), da área de inflamação/regeneração (%Infl/Reg) e da área de densidade de tecido conjuntivo (ADTC), utilizando microscópio óptico com câmera acoplada, com objetiva de 20× e conectado a um computador com *software Image-Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics)*.

Para AST da fibra muscular foram analisadas, por animal, 200 fibras em regeneração, caracterizadas pelo núcleo centralizado. Para a mensuração da ADTC avaliaram-se 15 imagens por animal, e sobre as imagens foi sobreposta uma grade contendo 88 intersecções, na qual contabilizou-se quais estavam sobre o tecido conjuntivo e, posteriormente, o resultado foi transformado em porcentagem.

Caracterizou-se a área de inflamação e regeneração por apresentar intenso infiltrado inflamatório e fibras em estágio inicial de regeneração. Essas fibras possuem pequeno diâmetro, citoplasma escasso fortemente basófilo e núcleo central<sup>13</sup>. Para essa análise utilizou-se o microscópio óptico com câmera acoplada, com objetiva de 4× para realização das fotos do corte transversal. Posteriormente as imagens foram montadas analisadas no programa Image J, calculando a área total do músculo e a área com infiltrado inflamatório e com fibras em processo inicial de regeneração.

Para o *immunoblotting* outra parte dos músculos foi cortada em pequenos pedaços e homogeneizada em tampão específico, a 4°C, usando homogeneizador tipo *Polytron PTA 20S (Brinkmann Instruments, Westbury, NY, EUA)* operado em velocidade máxima por 30 segundos. Os extratos foram centrifugados a 11.000rpm a 4°C por 20 minutos e o sobrenadante utilizado para quantificação da proteína total. As amostras foram tratadas com tampão Laemmli e aquecidas em banho seco por 5 minutos. Em seguida, aplicaram-se

50mg de proteína em gel SDS-poliacrilamida a 12% em aparelho para eletroforese da Bio-Rad (*mini-Protean, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, EUA*). Realizou-se a eletrotransferência do gel para a membrana de nitrocelulose em 90 minutos a 120V. As membranas foram lavadas com solução basal e incubadas com 10mg de anticorpo primário (TGF- $\beta$ 1 (*transforming growth factor beta*), *mouse* monoclonal, *Sigma-Aldrich, T7039*; TNF- $\alpha$  (*tumor necrosis factor alfa*), *mouse* monoclonal, *Sigma, T0157*; m-TOR (*mammalian target of rapamycin*), *rabbit* policlonal, *Sigma, T2949*; GAPDH (Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase), *mouse* monoclonal, Santa Cruz, SC-59540) diluído em 10mL de solução basal contendo 1% de leite desnatado a 4°C durante a noite. No dia seguinte, as membranas foram lavadas com solução basal e incubadas em 10mL de solução basal contendo 1% de leite desnatado e 2,5mg de anticorpo secundário (*Goat Anti-Rabbit IgG-HRP, Santa Cruz: sc-2004; Goat Anti-Mouse IgG-HRP, Santa Cruz: sc-2005*) por 2 horas em temperatura ambiente. Posteriormente, as membranas foram novamente lavadas com solução basal e expostas à solução de quimioluminescência (*Pierce*) por 5 minutos e, em seguida, o sinal fluorescente foi captado no equipamento *G-Box (GeneSys)*.

Após obtenção de bandas, as membranas foram lavadas com solução basal e incubadas com 10mL de *Stripping Buffer* (10mM Tris-HCl pH 7,5;  $\beta$ -*Mercaptoethanol* 0,1M; Ureia 8M) durante 1 hora, a 60°C e incubadas em Tris-HCl 1M pH7,5 por 30 minutos, lavadas com solução basal e processadas conforme descrito previamente para marcação da proteína GAPDH, uma proteína de controle interno, cuja quantidade não se altera em diferentes condições fisiológicas. As bandas foram digitalizadas e quantificadas por densitometria óptica usando o programa *Image J (The National Institute of Health, EUA)*.

Analisaram-se os dados pelo *software Bioestat* versão 5.0, e a normalidade pelo teste de *Shapiro-Wilk*. Para análise de variância foi utilizado o teste ANOVA *One Way*, com pós-teste de *Tukey*. Foi considerado significativo um valor de  $p \leq 0,05$ .

## RESULTADOS

Após o desmame todos os animais apresentavam a mesma massa corporal (40,2 $\pm$ 2,7g). Ao final dos

primeiros 45 dias do protocolo, o grupo D apresentou redução estatisticamente significativa na massa corporal quando comparado ao C (53 $\pm$ 7,2 *versus* 293,5 $\pm$ 18,6g,  $p < 0,05$ ). Após a fase de recuperação nutricional (90 dias), o grupo D aumentou a massa corporal, entretanto, não atingiu os valores do C (305 $\pm$ 20,4 *versus* 389,7 $\pm$ 33g,  $p < 0,05$ ).

Nos cortes histológicos observa-se nos grupos 7 dias grande infiltrado inflamatório e tecido conjuntivo, principalmente no grupo D7L, com a presença de pequenas fibras musculares no estágio inicial da regeneração. No grupo C7L observa-se a redução do infiltrado inflamatório e tecido conjuntivo. Nos grupos 21 dias observa-se o aumento da AST das fibras regeneradas (com núcleo centralizado) em todos os grupos, principalmente no grupo C21L (Figura 1).

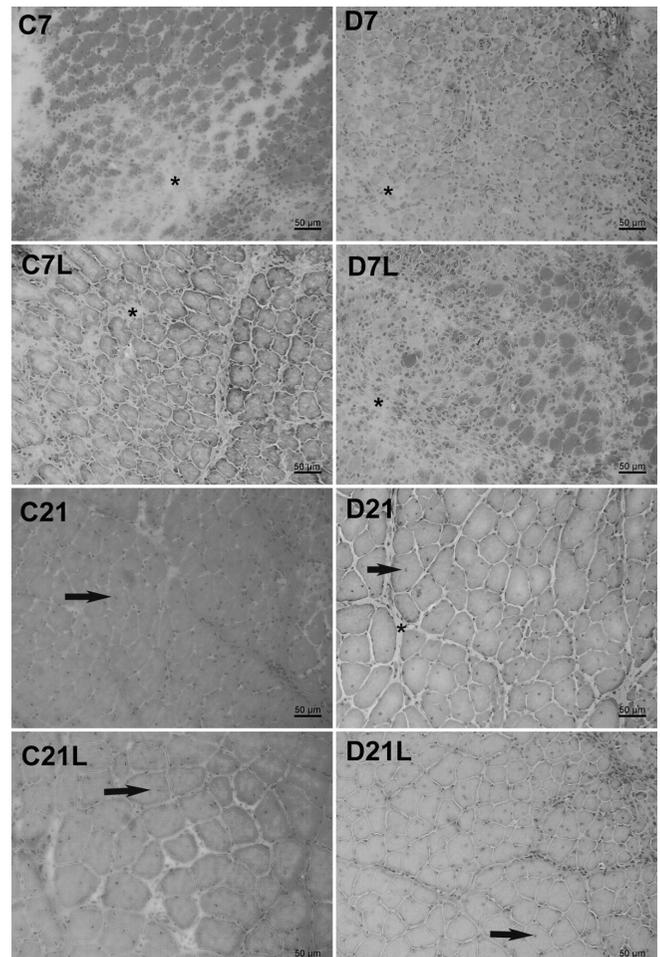


Figura 1. Cortes transversais histológicos corados com HE do músculo tibial anterior lesado dos grupos avaliados. Notar o infiltrado inflamatório e aumento do tecido conjuntivo nos grupos 7 dias. Aumento da AST nas fibras com núcleo centralizado nos grupos 21 dias

\* infiltrado inflamatório e tecido conjuntivo; fibra muscular regenerada com núcleo centralizado. Barra 50 $\mu$ m

Na fase aguda do processo de regeneração muscular observou-se que os grupos C7 e D7 apresentaram o mesmo comportamento em relação ao processo inflamatório. Entretanto, na fase crônica, há maior área de inflamação no grupo D21 comparado ao C21 ( $p < 0,01$ , Figura 2 A e C). A LLLT favoreceu a redução da área de inflamação/regeneração no grupo C7L comparado ao C7 ( $p < 0,01$ ), sem alterar o conteúdo muscular da citocina TNF- $\alpha$ . No grupo D7L houve aumento da área de inflamação/regeneração e diminuição do conteúdo de TNF- $\alpha$  comparado ao D7 ( $p < 0,05$ ; Figura 2A e C). Na fase crônica, a LLLT favoreceu a redução da área de inflamação, entretanto não ficou evidenciada a interferência do tipo de dieta nesse contexto.

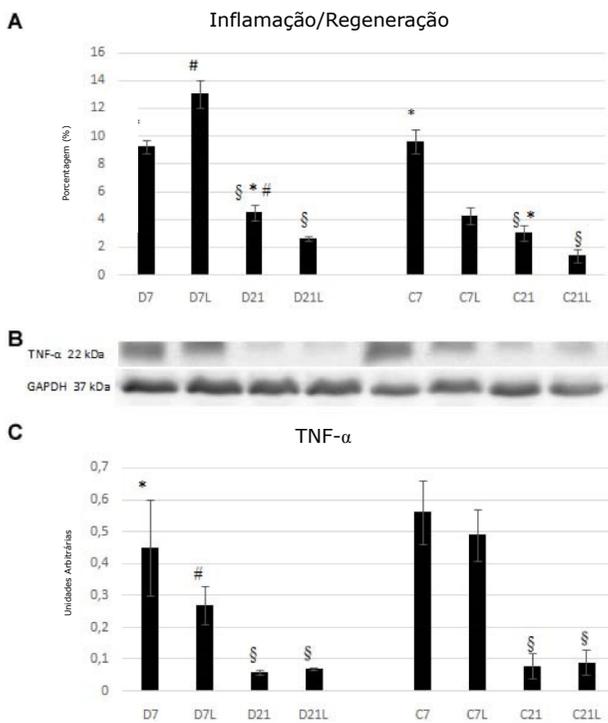


Figura 2. Análise da inflamação nos grupos avaliados  
Em A: média e desvio padrão da porcentagem de área de inflamação e regeneração; Em B: bandas TNF- $\alpha$ ; Em C: Média e desvio padrão do conteúdo de TNF- $\alpha$  em unidades arbitrárias. C: controle; D: desnutrido / recuperado; L: grupo tratado com LLLT. § difere do respectivo grupo 7 dias; \*difere do respectivo grupo L; # difere do respectivo grupo C;  $p < 0,01$

Em relação à quantificação do tecido conjuntivo, na fase inicial da regeneração, a LLLT favoreceu a redução da ADTC apenas no grupo C7L quando comparado ao C7 ( $p < 0,01$ ; Figura 3A). O conteúdo da citocina TGF- $\beta 1$  foi similar entre todos os grupos 7 dias (Figura 3C). Com o transcorrer do processo

de regeneração houve redução da ADTC nos grupos controles (C21 e C21L) e no grupo D21L quando comparado aos respectivos grupos 7 dias ( $p < 0,01$ ). O efeito positivo da LLLT ficou evidente no grupo D21L, com a redução da ADCT quando comparado ao D21 ( $p < 0,01$ ; Figura 3A). Entretanto, o conteúdo da citocina TGF- $\beta 1$  apresentou redução apenas no grupo C21 quando comparado ao C7 ( $p < 0,01$ ; Figura 3C.)

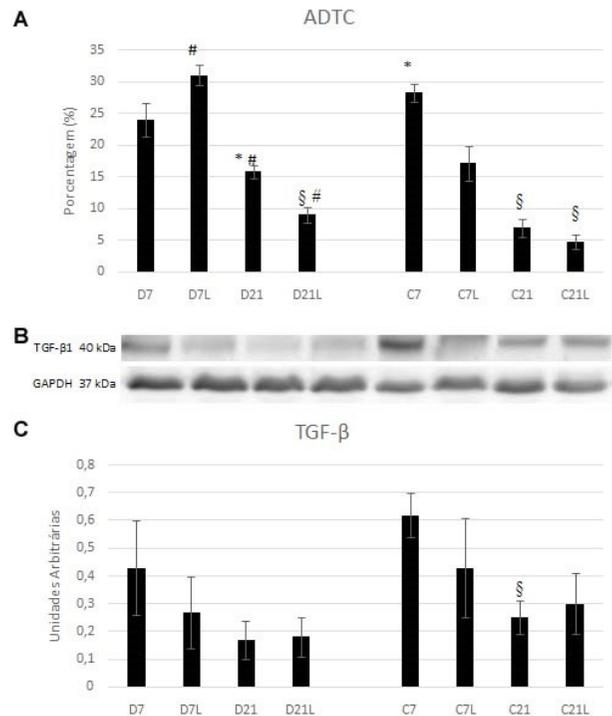


Figura 3. Quantificação do tecido conjuntivo nos grupos avaliados  
Em A: média e desvio padrão da porcentagem de área de densidade de tecido conjuntivo. Em B: bandas TGF- $\beta 1$ . Em C: média e desvio-padrão do conteúdo de TGF- $\beta 1$  em unidades arbitrárias. C: controle; D: desnutrido / recuperado; L: grupo tratado com LLLT. § difere do respectivo grupo 7 dias; \* difere do respectivo grupo L; # difere do respectivo grupo C;  $p < 0,01$

A AST e o conteúdo da proteína m-TOR foram similares entre todos os grupos 7 dias (Figura 4A e C), entretanto, após 21 dias da lesão, apenas o grupo C21 apresentou maior AST e aumento no conteúdo da m-TOR quando comparado ao C7 ( $p < 0,01$ ; Figura 4A e C). A LLLT favoreceu o aumento da AST da fibra muscular e conteúdo de m-TOR no grupo C21L quando comparado aos grupos C21 e D21L ( $p < 0,01$ ; Figura 4A e C). Nos animais desnutridos, o conteúdo da proteína m-TOR foi similar entre os grupos.

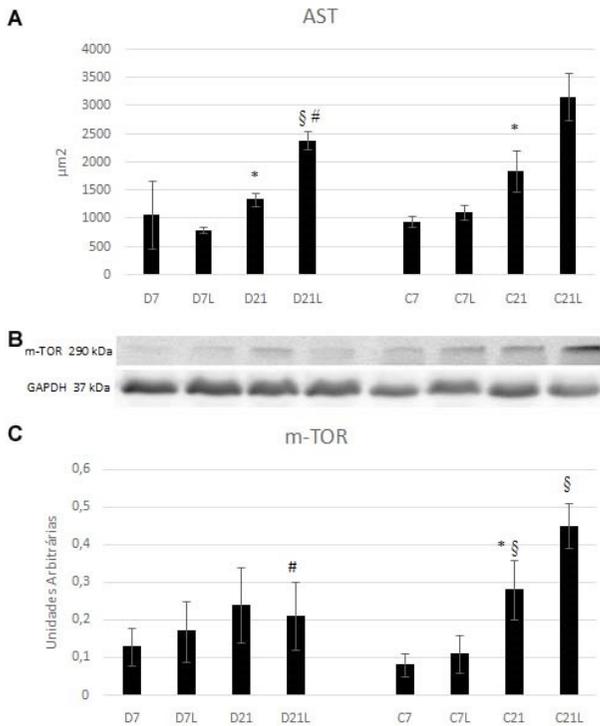


Figura 4. Análise da fibra muscular nos grupos avaliados

Em A: média e desvio padrão da área de secção transversa (AST) das fibras musculares. Em B: bandas m-TOR. Em C: média e desvio-padrão do conteúdo de m-TOR em unidades arbitrárias. C: controle; D: desnutrido/recuperado; L: grupo tratado com LLLT. \$ difere do respectivo grupo 7 dias; \*difere do respectivo grupo L; # difere do respectivo grupo C; p<0,01

## DISCUSSÃO

Neste estudo observou-se nos animais controle a resposta gradativa do processo de regeneração, com redução da inflamação, diminuição do TNF- $\alpha$  muscular e do TGF- $\beta$ 1 e aumento da proteína m-TOR e da AST da fibra muscular, sendo o processo favorecido pela irradiação da LLLT. Os resultados dos grupos desnutridos sugerem que o processo de regeneração acontece de forma mais lenta, com acúmulo de tecido conjuntivo e déficit na recuperação da AST das fibras musculares regeneradas, que também são minimizados pela irradiação da LLLT.

O protocolo de desnutrição pós-desmame utilizado neste estudo foi eficaz, comprometendo o desenvolvimento do animal, evidenciado pela redução da massa corporal do grupo desnutrido. Esses resultados corroboram com Escriba et al.<sup>14</sup>, que afirmam que a redução da massa corporal de ratos jovens por dieta hipoproteica é consequência de alterações funcionais da insulina nos tecidos. Ihemelandu<sup>15</sup> afirma que a

desnutrição afeta o crescimento e a diferenciação das células, e que danos ao sistema muscular com redução de proteínas são fundamentais para diminuição do peso corporal na fase adulta.

No processo de regeneração das fibras musculares de um indivíduo normalmente nutrido, após 48 horas da lesão, as partes necrosadas das fibras musculares são removidas por macrófagos, ao mesmo tempo inicia-se a formação do tecido conjuntivo por fibroblastos. No terceiro dia ocorre a ativação das células satélites e no quinto dia inicia-se a fusão de mioblastos, e o tecido conjuntivo tornou-se mais denso. No sétimo dia, as células musculares regeneradas começam a invadir a região da cicatriz e, por volta do 21º dia, as miofibrilas se fundem, com pouco tecido conjuntivo entre elas<sup>16</sup>.

A LLLT é utilizada para acelerar o processo de regeneração como observado por Renno et al.<sup>17</sup>, que avaliaram ratos submetidos à criolesão e tratados com laser AsGaAl (808nm, 50mw e densidades de energia de 10J/cm<sup>2</sup> e 50J/cm<sup>2</sup>) e encontraram redução das áreas de infiltrado celular e de lesão comparados ao grupo controle após 13 dias. Resultado semelhante foi encontrado após 21 dias de criolesão nos grupos controle e desnutrido neste trabalho.

Aimbire et al.<sup>18</sup> observaram em ratos com lesão pulmonar que a LLLT (AsGaAl, com potência de 1.0, 2.5 e 5mW e comprimento de onda de 650nm) reduziu de forma significativa os níveis séricos de TNF- $\alpha$  nos animais que receberam a irradiação quando comparados ao grupo controle, sendo o efeito dose dependente.

Neste estudo não observamos tal efeito no conteúdo muscular do TNF- $\alpha$ , provavelmente por não representar o conteúdo plasmático da citocina avaliada na maioria dos trabalhos.

O atraso na regeneração dos animais desnutridos e recuperados após 21 dias, sugerida pela maior área de inflamação no grupo D21, confirma o observado por Pertille et al.<sup>19</sup> aos 14 dias após criolesão com o mesmo protocolo de desnutrição.

Lopes et al.<sup>20</sup> realizaram análise histopatológica e morfométrica do músculo sóleo de ratos submetidos a dieta hipoproteica nos primeiros dias de vida, com posterior recuperação. No grupo normalmente nutrido, a análise do tecido conjuntivo mostrou predominância do colágeno tipo I distribuído de forma organizado. O grupo desnutrido apresentou predominância de colágeno tipo III de forma desorganizada e no grupo recuperado houve retorno do colágeno tipo I, mas parcialmente organizado. O colágeno tipo I é responsável por formar

fibras paralelas que conferem força tênsil e rigidez<sup>21</sup>, e a laserterapia acelera o processo de reparo tecidual com aumento na produção e melhora na organização de fibras colágenas<sup>22</sup>.

Neste estudo, o efeito positivo da LLLT ficou evidente no grupo D21L, com a redução da ADCT. Entretanto, o conteúdo da citocina TGF- $\beta$ 1 apresentou redução apenas no grupo controle 21 dias. Essa citocina é importante na síntese e remodelação da matriz extracelular, sendo assim, comumente utilizada para investigar a formação de fibrose<sup>23</sup>.

Além disso, a LLLT favoreceu o aumento da AST dos grupos 21 dias, principalmente do grupo C21L, no qual houve aumento da proteína m-TOR, uma proteína quinase encontrada em dois complexos multiproteicos, sendo um deles o mTORC1<sup>24</sup>, regulador central do crescimento celular, por controlar a tradução de RNAm e, conseqüentemente, a síntese de proteínas<sup>25</sup>.

O aumento da AST nas fibras com LLLT confirma o observado em trabalhos anteriores no músculo TA, mas com diferentes parâmetros da LLLT<sup>26,27</sup>.

Outros estudos deverão ser realizados para avaliar o tipo de colágeno encontrado na área na lesão, como também a avaliação de marcadores de inflamação sistêmico.

## CONCLUSÃO

A terapia com laser de baixa intensidade 830nm nos parâmetros utilizados favoreceu a regeneração muscular na fase tardia (21 dias) no modelo experimental de desnutrição proteica pós-natal e posterior recuperação nutricional.

## REFERÊNCIAS

- Mann CJ, Perdiguero E, Kharraz Y, Aguilar S, Pessina P, Serrano AL et al. Aberrant repair and fibrosis development in skeletal muscle. *Skelet Muscle*. 2011;1(1):1-21. doi: 10.1186/2044-5040-1-21
- Tidball JG, Villalta SA. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2010;298(5):R1173-87. doi: 10.1152/ajpregu.00735.2009
- Shin EH, Caterson EJ, Jackson WM, Nesti LJ. Quality of healing: defining, quantifying, and enhancing skeletal muscle healing. *Wound Repair Regen*. 2014; 22(Supl 1):18-24. doi: 10.1111/wrr.12163
- Dortbudak O, Haas R, Mallath-Pokorny G. Biostimulation of bone marrow cells with a diode soft laser. *Clin Oral Implants Res*. 2000;11(6):540-5.
- Meireles GCS, Silva CA, Marques AMCM, Pinheiro ALB. A efetividade da fototerapia laser no reparo tecidual em portadores de desordem funcional sistêmica. *Rev Eletr Fainor*. 2014;7(2):71-84.
- Monteiro CA. A dimensão da pobreza, da desnutrição e da fome no Brasil. *Estud Av*. 2003;17(48):7-20. doi: 10.1590/S0103-40142003000200002
- Silveira IS, Raiser AG, Polydoro AS, Santos MN. Efeitos da dieta protéica na cicatrização de fraturas distais de fêmur imobilizadas com pinos intramedulares em cão. *Acta Cirurg Bras*. 1997;12(3):178-81. doi: 10.1590/S0102-86501997000300008
- Pinheiro ALB, Meireles GC, Vieira ALB, Almeida D, Carvalho CM, Santos JN. Phototherapy improves healing of cutaneous wounds in nourished and undernourished wistar rats. *Braz Dent J*. 2004;15(Special issue):S121-8.
- Pinheiro ALB, Meireles GC, Carvalho CM, Ramalho LM, Santos JN. Biomodulative effects of visible and IR laser light on the healing of cutaneous wounds of nourished and undernourished Wistar rats. *Photomed Laser Surg*. 2009;27(6):947-57. doi: 10.1089/pho.2009.2607
- Reeves PG, Nielsen FH, Fahey Jr GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr*. 1993;123(11):1939-51.
- Miyabara EH, Martin JL, Griffin TM, Moriscot AS, Mestrlil R. Overexpression of inducible 70 kDa heat shock protein in mouse attenuates skeletal muscle damage induced by cryolesioning. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006;290(4):C1128-38. doi: 10.1152/ajpcell.00399.2005
- Pertille A, Macedo AB, Oliveira CP. Evaluation of muscle regeneration in aged animals after treatment with low-level laser therapy. *Rev Bras Fisioter*. 2012;16(6):495-501.
- 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. doi: 10.1002/mus.20892
- Escriva F, Kergoat M, Bailbe D, Pascual-Leone AM, Portha B. Increased insulin action in the rat after protein malnutrition early in life. *Diabetologia*. 1991;34(8):559-64.
- Ihemelandu EC. Fibre number and sizes of mouse soleus muscle in early postnatal protein malnutrition. *Acta Anat*. 1985;121(2):89-93.
- Jarvinen TA, Jarvinen TL, Kaariainen M, Kalimo H, Jarvinen M. Muscle injuries: biology and treatment. *Am J Sports Med*. 2005;33(5):745-64. doi: 10.1177/0363546505274714
- Renno ACM, Assis L, Peres B, Rodrigues NC, Brunelli RM, Toma RL, et al. The effects of low level laser therapy on injured skeletal muscle. *Braz Arch Biol Technol*. 2014;57(1):48-54. doi: 10.1590/S1516-89132014000100008
- 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 $\alpha$  levels in acute inflammation. *Photomed Laser Surg*. 2006;24(1):33-7. doi: 10.1089/pho.2006.24.33

19. Pertille A, Moura KF, Matsumura CY, Ferretti R, Ramos DM, Petrini AC, et al. Evaluation of skeletal muscle regeneration in experimental model after malnutrition. *Braz J Biol.* 2017;77(1):83-91. doi: 10.1590/1519-6984.10415
20. Lopes TS, Quintana HT, Bortolin JA, Alves PHM, Matos RSB, Liberti EA, et al. Protein malnutrition pre- and postnatal and nutritional rehabilitation modulates the morphology of muscle fibers in wistar rats. *J Diet Suppl.* 2017;14(3):278-87. doi: 10.1080/19390211.2016.1212960
21. Lehto M, Duance VC, Restall D. Collagen and fibronectin in a healing skeletal muscle injury. An immunohistological study of the effects of physical activity on the repair of injured gastrocnemius muscle in the rat. *J Bone Joint Surg Br.* 1985;67B(5):820-8.
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. doi: 10.1089/pho.2007.2151
23. Heldin CH, Miyazono K, Dijke P. TGF- $\beta$  signaling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature.* 1997;390:465-71. doi: 10.1038/37284
24. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell.* 2012; 149:274-93. doi: 10.1016/j.cell.2012.03.017
25. Mahoney SJ, Dempsey JM, Blenis J. Cell signaling in protein synthesis ribosome biogenesis and translation initiation and elongation. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2009;90C:53-107. doi: 10.1016/S1877-1173(09)90002-3
26. Oliveira NM, Parizzotto NA, Salvini TF. GaAs (904-nm) laser radiation does not affect muscle regeneration in mouse skeletal muscle. *Lasers Surg Med.* 1999; 25(1):13-21.
27. Correa DG, Okita JT, Martins HRF, Gomes ARS. Effects of GaAS laser and stretching on muscle contusion in rats. *Fisioter Pesqui.* 2016;23(1):3-11. doi: 10.1590/1809-2950/13903823012016