



10º Congresso de Pós-Graduação

AValiação DA REGENERAÇÃO MUSCULAR EM RATOS EXPOSTOS A NICOTINA TRATADOS COM LASER.

Autor(es)

THIAGO SANTOS COHEN

Co-Autor(es)

ALINE BARBOSA MACEDO
CÁSSIO PEDRO VIANA DE OLIVEIRA
CARLOS ALBERTO DA SILVA

Orientador(es)

ADRIANA PERTILLE

1. Introdução

A dependência química provocada pela nicotina leva o fumante a ajustar o seu comportamento de fumo, com o objetivo de regular a concentração plasmática de nicotina, de acordo com suas necessidades (BENOWITZ, 1991).

Segundo Oshida et al. (1989) o hábito de fumar está associado com a resistência insulínica, fato comprovado onde os tabagistas apresentam maior intolerância a glicose. Tal intolerância promove a síntese de glicogênio deficiente (ROTHMAN et al., 1992) e prejudicam o metabolismo muscular, pois diminuem a captação de glicose após o exercício físico (PRICE et al., 2003).

O uso da nicotina promove uma diminuição na produção de óxido nítrico e aumento na síntese de colágeno. Segundo Ichinose et al. (2010) tal fato induz um aumento no módulo de elasticidade no tendão supraespinhal de ratos, ocasionando uma predisposição do tendão à ruptura.

A grande ocorrência de lesões musculares, além de influenciar estudos relacionados ao processo de regeneração muscular, se faz também um fator preponderante no estímulo de estudos relacionados aos tratamentos das diversas lesões que acometem o sistema musculoesquelético (FERRARI et al. 2005).

Um recurso muito utilizado por fisioterapeutas no tratamento de lesões musculares é o laser de baixa intensidade (Low-Level Laser Therapy – LLLT), sendo este um recurso que possui propriedades especiais capaz de produzir efeitos bioquímicos e fisiológicos nos tecidos (ORTIZ et al., 2001).

É atribuído ao laser de baixa intensidade o aumento do ATP mitocondrial e o incremento da síntese protéica, promovendo assim um aumento no número de fibroblastos e da síntese de colágeno, na regeneração dos vasos sanguíneos, na velocidade de crescimento de nervos periféricos e da divisão celular (CRUÑANES 1984; BALBONI 1986; ASECIO 1988; PORTER 1992).

Entretanto, contrapondo o efeito dos recursos fisioterapêuticos, acredita-se que a exposição à nicotina traga influências negativas na regeneração muscular.

Estudos de Martinez et al. (2002) mostram que o uso nicotina promove alteração na produção fibronectina e colágeno, o que pode influenciar negativamente a regeneração muscular.

Portanto, a proposta deste projeto é trazer novas descobertas sobre a utilização do laser de baixa intensidade em modelos experimentais com uso de nicotina, visando a melhor compreensão da relação entre regeneração muscular e exposição à nicotina.

2. Objetivos

Analisar a regeneração muscular em ratos submetidos à ingestão de nicotina, nos períodos de 3 e 7 dias após criolesão no músculo tibial anterior. Avaliar a eficácia do laser de baixa intensidade com comprimento de onda de 830nm, aplicado a cada 48 horas.

3. Desenvolvimento

Foram utilizados 25 ratos Wistar machos, com idade de 24 semanas, oriundos do Biotério Central da UNIMEP e mantidos no Biotério da Faculdade de Ciências da Saúde (FACIS-UNIMEP), sob os devidos cuidados. Em média foram alocados 4 animais em gaiolas de polietileno de tamanho grande. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética sobre o Uso de Animais da UNIMEP protocolo de pesquisa nº 02/12.

Administração da nicotina

A nicotina foi administrada por via oral segundo o método proposto por Larsson et al. (1988), gerando um padrão de nicotina no plasma do animal semelhante ao encontrado em humanos que fumam 20 cigarros/dia.

Os animais iniciaram a exposição à nicotina com 5 semanas de idade, através da ingestão de água potável tratada com adição de nicotina BGP® numa proporção de 50 mg/L durante 18 semanas. Para evitar a rejeição foi adicionado à mistura 1g de sacarose a cada 2 L de água.

Grupos Experimentais

Após a exposição à nicotina, os animais foram divididos em 5 grupos, com 5 animais cada:

Grupo controle (C), os animais foram submetidos somente a ingestão de nicotina;

Grupo lesão 3 e 7 dias (LE3) e (LE7), os animais foram submetidos a ingestão de nicotina, e lesão muscular com nitrogênio líquido;

Grupo laser 3 e 7 dias (L3) e (L7), os animais foram submetidos a ingestão de nicotina, lesão muscular com nitrogênio líquido, e foram tratados com laser de diodo GaAIs a cada 48 horas.

Procedimento da lesão muscular

Os animais foram anestesiados via intraperitoneal com uma mistura de Ketalar® (50 mg/mL) e Rompun® (2 g/100mL), na proporção 1:1, na dose de 0,2 mL/100 g de massa corporal. Em seguida foram tricotomizados na região do músculo tibial anterior direito, que foi exposto e lesionado com uma barra de metálica de 1 cm/0,5 cm resfriada em nitrogênio líquido por 30 segundos. A haste metálica foi pressionada sobre o ventre muscular por 10 segundos, em seguida imersa novamente em nitrogênio líquido por 30 segundos, e pressionada no mesmo lugar do músculo por 10 segundos, segundo protocolo de Rodrigues (2009).

4.4 Tratamento com laser

Para o tratamento fisioterapêutico foi utilizado o laser de baixa intensidade de diodo GaAIs com comprimento de onda 830 nm, potência 30 mW, dose 20J/cm², a aplicação foi feita através da técnica pontual, realizado em um ponto, acima da área lesada. O tratamento iniciou 24 horas após a lesão, em dias intercalados com intervalo de 48 horas. Dessa forma, os animais foram eutanasiados 3 e 7 dias após a lesão, recebendo 1 ou 3 aplicações respectivamente.

Eutanásia dos animais

Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de uma mistura de Ketalar® (50 mg/mL) e Rompun® (2 g/100mL), na proporção 1:1, na dose de 0,3 mL/100 g de massa corporal. Após sinais de anestesia geral, os animais serão perfundidos com PBS (perfusão cardíaca) e o músculo tibial anterior direito foi retirado e pesado.

Análise Histológica:

O músculo tibial anterior direito de cada animal foi fixado em suporte de madeira com tragacanth gum, em seguida foi congelado por imersão em isopentano e em seguida em nitrogênio líquido.

Cortes transversais seriados com espessura variando entre 8 e 12 µm foram feitos em um criostato, e corados com hematoxilina e eosina, em seguida foram montadas as lâminas para análise.

Análise dos resultados

Para as lâminas coradas com HE, dois cortes aleatórios de cada lâmina foram escolhidos para que ao final se obtenha a área de secção transversa (AST) das fibras musculares normais e em processo de regeneração.

A mensuração da AST de fibras musculares em regeneração, apresentando núcleo centralizado, foi comparada com a de fibras musculares normais do grupo C, com o intuito de verificar a maturação das fibras durante a regeneração. Para esta análise foram quantificadas, em cada corte, 200 fibras em regeneração nos grupos experimentais. Posteriormente foi realizada a média dos valores obtidos. As lâminas foram observadas ao microscópio óptico com câmera acoplada, utilizando objetiva de 20X. As análises foram feitas por meio do software Image Pro-Plus 6.2 (Media Cybernetics) em computador conectado ao microscópio.

Análise Estatística

A avaliação dos dados foi realizada através do programa SPSS, considerando média e desvio padrão. Para análise de variância foi

aplicado o ANOVA, seguido do teste de Tukey-HSD para comparações múltiplas. Adotando um valor de $p < 0,05$ para significância estatística.

4. Resultado e Discussão

Os presentes dados não demonstram diferença estatística entre os grupos lesão e laser 3 dias, e lesão e laser 7 dias, indicando que nos parâmetros utilizados o laser não favoreceu a regeneração muscular em animais expostos a nicotina. (Tabela 1).

Estudos em animais não expostos à nicotina, revelam a efetividade do laser no processo de regeneração muscular. Rennó et al. (2011) compararam os efeitos da aplicação do ultrassom de 1.5 MHz pulsado a 20% (intensidade média 30 W/cm² durante 20 min.) e do laser de baixa intensidade de 830 nm (potência 30 mW e densidade de energia 50 J/cm²) na regeneração muscular após criolesão. Ao término das seis sessões de aplicação das terapias, a análise histológica demonstrou que o grupo tratado com laser apresentou uma redução da resposta inflamatória mais significativa do que o grupo tratado com ultrassom.

Rodrigues (2009) também analisou o padrão regenerativo do músculo após aplicação do laser de 830 nm e potência de 30 mW em animais jovens e idosos, entretanto, utilizou densidade de energia de 30 J/cm², em um único ponto, diariamente durante 5 sessões de tratamento. A morfometria revelou que a área da lesão foi significativamente reduzida nos animais jovens em todos os parâmetros estudados. Esses achados demonstram que utilizando alta densidade energia (30 J/cm²) é possível visualizar os efeitos do laser.

Estudos mostram que a nicotina pode alterar, *in vitro*, a viabilidade e a morfologia de fibroblastos de forma proporcional à dose e ao tempo de exposição, promovendo assim perda de função celular, podendo prejudicar a regeneração muscular (MARTINEZ et al. 2002).

Além disso, a nicotina provoca vasoconstrição periférica com redução da temperatura cutânea e aumento da resistência periférica podendo prorrogar o período inflamatório e prejudicar a regeneração (FRANKEN et al., 1996).

5. Considerações Finais

Os resultados obtidos sugerem que a aplicação do laser de baixa intensidade com comprimento de onda de 830nm, potência 30 mW, dose 20 J/cm², através da técnica pontual a cada 48 horas, não foi eficaz na regeneração regeneração muscular em ratos submetidos à ingestão de nicotina, nos períodos de 3 e 7 dias após criolesão no músculo tibial anterior.

Referências Bibliográficas

- ASENCIO, A.F.; MARTINEZ, S.F. Stimulation of healing of Experimental Colon Anastomose by low power lasers. *British Journal Surgery*, v.75, p.125-7,1988.
- BALBONI, G.C. Effects of He-Ne/IR laser irradiation on two lines in normal human fibroblast *in vitro*. *Archives Italiennes Embriology*, v.91, p.17-88, 1986.
- BENOWITZ, N.L. Pharmacodynamics of nicotine, implication for rational treatment of nicotine addiction. *Br J Addict*,v.86, p.495-9, 1991.
- CRUÃNES, J.C. La Terapia Laser, hoy. Barcelona, Centro Documentation laser the Meditec, p.164, 1984.
- FERRARI, R.J.; PICCHI, L.D.; BOTELHO, A.P.; MINAMOTO, V. Processo de regeneração na lesão muscular: uma revisão. *Fisioterapia em Movimento*. v.18, n.2, p.63-71, 2005.
- FRANKEN, R.A.; NITRINI, G.; FRANKEN, M.; FONSECA, A.J.; LEITE, J.C.T. Nicotina: Ações e Interações. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v.66, n.6, p.261-7, 1996.
- ICHINOSE, R.; SANO, H.; KISHIMOTO, K.N.; SAKAMOTO, N.; SATO, M.; ITOI, E. Alteration of the material properties of the normal supraspinatus tendon by nicotine treatment in a rat model. *Acta Orthop*, v.81, p.634-8, 2010.
- LARSSON, L.; ORLANDER, J.; ANSVED T.; EDSTROM, L. Effects of chronic nicotine exposure on contractile enzyme-histochemical and biochemical properties of fast- and slow-twitch skeletal muscles in the rat. *Acta Physiol Scand*, v.134, p.51-527, 1988.
- MARTINEZ, A.E.T.; SILVÉRIO, K.G.; ROSSA JÚNIOR, C. Efeito da nicotina na viabilidade e morfologia de fibroblastos – estudo *in vitro*. *Pesq Odontol Bras.*,p.16, n3, p.234-8, 2002.
- ORTIZ, M.C.S.; CARRINHO, P.M.; SANTOS, A.A.S.; GONÇALVES, R.C.; PARIZOTTO, N.A. Laser de baixa intensidade: princípios e generalidades – Parte 1. *Fisioterapia Brasil*. v.2, p.221-40, 2001.
- OSHIDA, Y.; YAMANOUCI, I K.; HAYAMIZU, S.; SATO Y. Longterm mild jogging increases insulin action despite no influence on body mass index or VO₂ max. *J Appl Physiol*, v.66, p. 2206-2210, 1989.

PORTER, M. Therapeutic lasers. *Equine Veterinary Science*, v.12, p.49-56, 1992.

PRICE, T.B.; KRISHNAN-SARIN, S.; ROTHMAN, D.L. Smoking impairs muscle recovery from exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, v.285, p.116-122, 2003.

RENNO, A.; TOMA, R.; FEITOSA, S.; FERNANDES, K.;

BOSSINI, P.; OLIVEIRA, P.; PARIZOTTO, N.; RIBEIRO, D. Comparative Effects of Low-Intensity Pulsed Ultrasound and Low-Level Laser Therapy on Injured Skeletal Muscle, v.29, p.5-10, 2011

RODRIGUES, N.C. Ação da laserterapia de baixa intensidade (830nm) na regeneração muscular de ratos idosos. 2009. 53f. (Mestrado em Biotecnologia) Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

ROTHMAN, D.L.; SHULMAN, R.G.; SHULMAN, G.I. 31P NMR measurements of muscle glucose-6-phosphate. Evidence for reduced insulin dependent muscle glucose transport or phosphorylation activity in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest*, v.89, p.1069-1075, 1992.

Anexos

Tabela 1 - Média e desvio padrão da área de secção transversa do músculo tibial anterior nos diferentes grupos.

Grupo	Controle	Lesão 3d	Lesão 7d	Laser 3d	Laser 7d
AST (µm)	2.469 ± 173,8	108 ± 3,59 ^{a,b}	591 ± 162,6 ^a	139 ± 5,5 ^{a,b}	595 ± 164,5 ^a

^a : difere do controle; ^b : difere do respectivo grupo 7 dias