



19 Congresso de Iniciação Científica

AVALIAÇÃO DA REGENERAÇÃO MUSCULAR EM ANIMAIS IDOSOS, APÓS TRATAMENTO COM LASER DE BAIXA INTENSIDADE

Autor(es)

CÁSSIO PEDRO VIANA DE OLIVEIRA

Orientador(es)

ADRIANA PERTILLE

Apoio Financeiro

FAPIC/UNIMEP

1. Introdução

A musculatura esquelética de mamíferos adultos possui grande capacidade de adaptação a demandas fisiológicas, como no crescimento, no treinamento e no trauma. Sendo as fibras musculares esqueléticas adultas caracteristicamente bem diferenciadas, esse elevado potencial adaptativo é atribuído a uma população de células residentes no músculo esquelético adulto, denominadas células satélites (FOSCHINI; RAMALHO; BICAS, 2004).

As células satélites são ativadas em situações onde há a necessidade de novos mioblastos para crescimento ou regeneração muscular (LIEBER, 2002). A eficiência das células satélites em proliferar e se diferenciar depende da idade. Quanto maior a idade, menor é essa eficiência (CHARGE; BRACK; HUGUES, 2002). As alterações morfofisiológicas que ocorrem nos tecidos com o envelhecimento, contribuem para o declínio da habilidade das células satélites no reparo do tecido lesado (YOUNG et al., 2004).

O sucesso da regeneração depende do indivíduo, da extensão e da natureza da lesão, porém em todas as situações o processo envolve: revascularização, infiltração de células inflamatórias, remoção dos componentes celulares lesionados através da fagocitose, proliferação e, sem seguida, fusão das células satélites para a formação de novos miotúbulos e, finalmente, a reinervação e a recuperação da função muscular (FERRARI et al., 2005).

Alguns estudos sugerem que em células irradiadas por *laser* de baixa intensidade, os primeiros eventos fotoquímicos e fotofísicos acontecem nas mitocôndrias, cujas alterações respiratórias são explicadas como resultado tanto de mudanças estruturais (BAKEEVA et al., 1993; MANTEIFEL; BAKEEVA; KARU, 1997) quanto de alterações químicas (metabólicas) nessa organela citoplasmática, podendo ocorrer no potencial de membrana (PASSARELLA et al., 1988) e/ou em atividades enzimáticas (WILDEN; KARTHEIN, 1998), todas contribuindo para a maior disponibilidade de energia, via metabolismo aeróbio, para ser utilizada na realização das atividades celulares.

Costardi et al. (2008) estudaram a ação do *laser* de baixa intensidade de 670nm no processo de reparação tecidual muscular em ratos após contusão muscular do músculo gastrocnêmio. O tecido muscular irradiado apresentou melhor organização estrutural, com maior quantidade de células musculares íntegras, vasos sanguíneos íntegros e sinais de edema intercelular menos evidentes em relação aos músculos não irradiados, concluindo-se que ocorreu uma melhora qualitativa dos músculos irradiados. Outro estudo desenvolvido por Nogueira (2006) observou as alterações causadas pela irradiação do *laser* diodo arsenieto de gálio (660nm), no músculo gastrocnêmio de ratos Wistar adultos, após lesão cirúrgica. Na análise histopatológica observou-se a presença de infiltrado inflamatório, não apresentando diferença significativa entre o grupo controle (não tratado) e laserterapia durante o período observado. No exame imunohistoquímico foi constatado diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), entre controle e laserterapia na ativação

de células satélites utilizando marcador MyoD1. Este estudo sugere que a terapia com *laser*, proporciona a aceleração do reparo muscular em ratos submetidos à cirurgia experimental, pelo aumento da ativação de células satélites na fase inicial do processo de regeneração.

Grande parte dos estudos da aplicação de recursos terapêuticos em lesão muscular é realizada em jovens ou adultos, principalmente os que utilizam animais. O prejuízo da função muscular do idoso devido à sarcopenia afeta sensivelmente sua qualidade de vida, tornando mais difícil ou impossibilitando a execução de atividades de vida diária.

2. Objetivos

Analisar a eficiência do tratamento com *laser* de baixa intensidade (infravermelho) no músculo tibial anterior de animais idosos submetidos à lesão muscular através de contusão.

3. Desenvolvimento

Este trabalho é parte de um projeto desenvolvido no Laboratório de Plasticidade Neuromuscular da FACIS, estando aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, através do protocolo nº 012/2010.

Foram utilizados 25 ratos Wistar com 18 meses de idade divididos em 5 grupos (n=5): (1) Controle (CT) - Sem lesão e sem tratamento; (2) Contusão 7 dias (C7); (3) Contusão 21 dias (C21) - Contusão, sem tratamento; (4) Contusão + Tratamento 7 dias (CL7) e (5) Contusão + Tratamento 21 dias (CL21).

O equipamento utilizado para produção da condução não-invasiva foi desenvolvido por Minamoto (1997). Os animais foram anestesiados via intramuscular com uma mistura de Ketalar® (50 mg/mL) e Rompun® (2 g/100mL) na proporção de 1:1. Após apresentarem sinais de anestesia, os animais foram tricotomizados na região ântero-lateral da pata direita, na região referente ao músculo tibial anterior (TA) direito. Os animais foram imobilizados manualmente em decúbito lateral, com a pata a ser contundida voltada para cima e em flexão plantar máxima de tornozelo e submetidos a uma carga de 284 g liberada de uma altura de 35 cm. Três impactos semelhantes e consecutivos foram realizados, com distribuição na região proximal-média e medial do músculo TA (adaptado de PICCHI, 2004).

A aplicação do *laser* teve início 24 horas após a lesão muscular. As aplicações ocorreram 5 vezes por semana (segunda a sexta-feira) com intervalo de 24 horas entre cada aplicação, totalizando 7 e 21 sessões. Os parâmetros utilizados foram: comprimento de onda 830 nm, potência 30 mW, dose 4 J/cm²; por meio da técnica pontual distribuídos em 2 pontos de aplicação com 1 cm de distância entre eles, durante 16 segundos cada.

Os sacrifícios ocorreram 24 horas após a última intervenção terapêutica. Os animais foram anestesiados como descrito anteriormente. Após sinais de anestesia geral, os músculos TA direito de cada animal foram retirados, pesados e fixados em suportes de madeira com tragacanth gum, imersos em isopentano por 40 segundos e imediatamente colocados em nitrogênio líquido, e posteriormente mantidos no Biofreezer. Para obtenção dos cortes, os músculos foram seccionados transversalmente utilizando criostato (Microm-HS505E) e corados com HE.

Dois cortes aleatórios de cada lâmina foram analisados a fim de se obter o diâmetro das fibras musculares e o número de fibras com núcleo central, a área total do músculo e a porcentagem da área em processo inicial de regeneração, associado ao infiltrado inflamatório.

As áreas de inflamação/regeneração (Infl/Reg) foram caracterizadas por apresentar intenso infiltrado inflamatório e fibras em estágio inicial de regeneração. As lâminas foram observadas ao microscópio óptico com câmera acoplada, com objetivas de 4 e 20X, e conectado a um computador com software Image Pro-Plus® 6.2 (Media Cybernetics).

Para a análise estatística os dados são apresentados em mediana, primeiro quartil e terceiro quartil. Utilizou-se o teste Shapiro-Wilk para verificar a normalidade da amostra. Mediante a distribuição não normal dos dados, foi utilizado o teste Kruskal-Wallis seguido do teste Student-Newman-Keuls para as devidas comparações entre os grupos. As análises foram processadas por meio do software BioEstat, versão 5.0, considerando-se uma significância de 5%.

4. Resultado e Discussão

Em média o peso corporal dos animais foi 589,96±51,22 gramas e o peso do músculo TA apresentou-se similar entre os grupos, sendo em média de 0,813±0,045 gramas, com área de secção transversa total entre 10 a 12 mm², estando abaixo do encontrado por Rodrigues (2009), que em animais de 10 meses obteve valores variando entre 16 a 18mm². Sugerindo que o modelo experimental utilizado neste estudo representava um bom modelo de sarcopenia.

A área do processo de Infl/Reg muscular apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos C7 e C21, CL7 e

CL21, o que mostra que os grupos 21 dias/sessões estão em fase adiantada de regeneração quando comparados aos grupos 7 dias/sessões, com redução do processo inflamatório. Entretanto, quando os grupos contusão e tratados são comparados, não observou-se diferença estatística (Tabela 1).

A área de Infl/Reg muscular caracterizou-se pela presença de intenso infiltrado inflamatório e fibras em estágio inicial de regeneração. Essas fibras possuem pequeno diâmetro, citoplasma escasso fortemente basófilo e núcleo central. Além disso, observou-se grande quantidade de tecido conjuntivo nesta área, bem caracterizado nos grupos 7 dias/sessões (Figura 1).

Rodrigues (2009) utilizando o seguinte protocolo: *laser* 830nm, energia 0,87J durante 5 dias consecutivos, não observou diferenças morfológicas entre os grupos. Porém, estudos moleculares indicaram que o tratamento laser favoreceu a maturação das células satélites em mioblastos e miotubos, melhorando o processo regenerativo em animais idosos.

As áreas de secção transversa das células analisadas no grupo CT apresentavam fibras com núcleo periférico, já nos grupos contusão e tratado foram analisadas as fibras com núcleo centralizado. Na análise estatística observou-se diferença significativa entre os grupos CT e C7, assim como entre CT e CL7, entretanto, não se observou diferença entre os grupos C7 e CL7, o que sugere que o número de sessões não foi suficiente para acelerar o processo de regeneração. Não existe diferença significativa entre os grupos CT, C21 e CL21, o que indica que após o processo de regeneração, as fibras musculares atingiram um grau de maturação próximo ao normal, sugerindo que análises moleculares desses animais podem indicar benefícios do tratamento *laser* na proliferação e maturação das células satélites (Tabela 2).

As alterações morfofisiológicas que ocorrem nos tecidos com o envelhecimento, contribuem para o declínio da habilidade das células satélites no reparo do tecido lesado (YOUNG et al., 2004). Pesquisas relatam sobre a diminuição na quantidade de células satélites em decorrência do envelhecimento (GIBSON, SHULTZ, 1983; SHEFER et al., 2006), entretanto, o número de células satélites remanescentes no tecido muscular envelhecido é suficiente para a ativação e sustentação de um mecanismo regenerativo adequado, se não há a associação de um ambiente desfavorável (CAROSIO et al., 2009).

Os resultados encontrados neste estudo sugerem que o tratamento proposto não foi suficiente para a aceleração do processo de regeneração muscular nos animais idosos, ressaltando que os estudos experimentais devem envolver diferentes tipos de análises (histológicas e moleculares) na tentativa de esclarecer os mecanismos envolvidos no processo de regeneração. Além disso, aplicando os resultados para a prática clínica, ressalta-se que é de fundamental importância que o fisioterapeuta considere as alterações decorrentes do envelhecimento, pois o músculo de um indivíduo jovem responde melhor ao tratamento *laser* que o músculo de um indivíduo idoso.

5. Considerações Finais

As análises morfológicas realizadas neste estudo não demonstraram diferença significativa entre os grupos contusão e tratado, sugerindo que o tratamento *laser* não foi eficaz para acelerar o processo de regeneração no modelo experimental idoso.

Na prática clínica deve-se considerar a idade do paciente para definir o tratamento com *laser* de baixa intensidade.

Referências Bibliográficas

BAKEEVA, L.E. et al. Formation of gigantic mitochondria in human blood lymphocytes under the effect of an He-Ne laser. **Mol. biol.**, v.27, n.3, p.608-17, 1993.

CAROSIO, S.; BERARDINELLI, M.G.; AUCELLO, M.; MUSARÒ, A. Impact of ageing on muscle cell regeneration. **Ageing Res Rev.** v.10, n.1, p.35-42, 2009.

CHARGE, S.B.; BRACK, A.S.; HUGHES, S.M. Aging-related satellite cell differentiation defect occurs prematurely after Ski-induced muscle hypertrophy. **Am. j. physiol. cell. physiol.**, v.283, n.4, p.C1228-41, 2002.

COSTARDI, C.H.Z. et al. Efeito do laser de baixa intensidade (670nm) após contusão muscular em ratos. **Fisioter. mov.**, v.21, n.2, p.21-30, 2008.

FERRARI, R.J. et al. Processo de regeneração na lesão muscular: uma revisão. **Fisioter. mov.**, v.18, n.2, p.63-71, 2005.

FOSCHINI, R.M.S.A.; RAMALHO, F.S.; BICAS, H.E.A. Células satélites musculares. **Arq. bras. oftalmol.**, v.67, n.4, p.681-867, 2004.

GIBSON, M.C.; SCHULTZ, E. Age-related differences in absolute numbers of skeletal muscle satellite cells. **Muscle Nerve.** v.6, n.8, p.574-80, 1983.

LIEBER, R.L. **Skeletal muscle structure, function & plasticity**: The physiological basis of rehabilitation. 2 ed. Baltimore:Williams & Wilkins, 2002.

MANTEIFEL, V.; BAKEEVA, L.; KARU, T. Ultrastructural changes in chondriome of human lymphocytes after irradiation with He-Ne laser: appearance of giant mitochondria.

J. photochem. photobiol., v.38, n.1, p.25-30, 1997.

MINAMOTO, V.B. **Um modelo de contusão no músculo soleus de rato**: lesão e regeneração após trauma único e recorrente. 1997. 74f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

NOGUEIRA, D.G.M. **Efeito do laser de baixa intensidade no processo de cicatrização muscular e células satélites**. 2006. 52f. Dissertação (Mestrado em Promoção da Saúde) – Universidade de Franca, Franca.

PASSARELLA, S. et al. Increase in the ADP/ATP exchange in rat liver mitochondria irradiated in vitro by helium-neon laser. **Biochem. biophys. res. commun.**, v.156, n.2, p.978-86, 1988.

PICCHI, L.D. et al. **Análise histológica dos padrões de lesão muscular de ratos, a curto e longo prazo, pós contusão muscular**. XIX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental FESBE, Águas de Lindóia, SP. 2004.

RODRIGUES, N.C. **Ação da laserterapia de baixa intensidade (830NM) na regeneração muscular de ratos idosos**. 2009. 53f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

SHEFER, G.; VAN DE MARK, D.P.; RICHARDSON, J.B.; YABLONKA-REUVENI, Z. Satellite-cell pool size does matter: defining the myogenic potency of aging skeletal muscle. **Dev Biol.** v.294, n.1, p.50-66, 2006.

STARON, R.S. et al. Fiber type composition of four hindlimb muscles of adult fisher 344 rats. **Histochem. cell. boil.**, v.111, n.2, p.117-123, 1999.

WILDEN, L.; KARTHEIN, R. Import of radiation phenomena of electrons and therapeutic low-level laser in regard to the mitochondrial energy transfer. **J. clin. laser med. surg.**, v.16, n.3, p.159-65, 1998.

YOUNG, H.E.; DUPLAA, C.; ROMERO-RAMOS, M. et al. Adult reserve stem cells and their potential for tissue engineering. **Cell. biochem. biophys.**, v.40, n.1, p.1-80, 2004.

Anexos

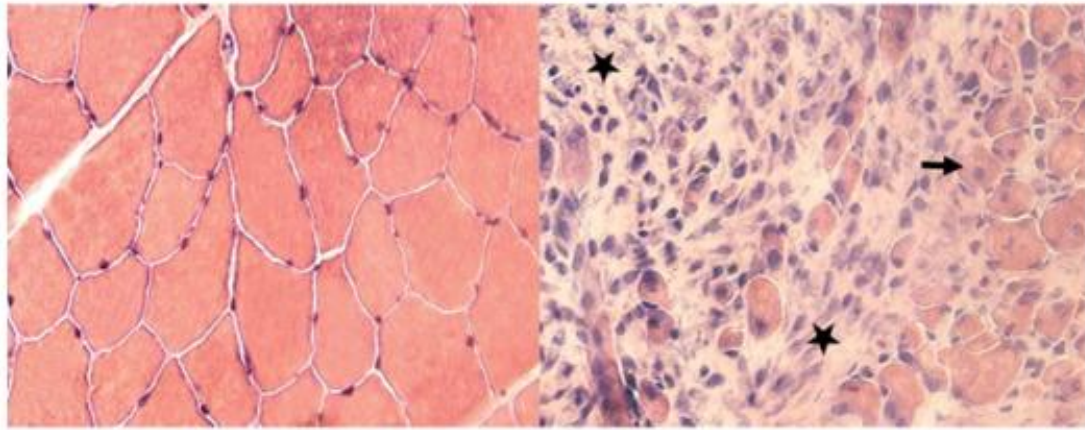


Figura 1: Cortes transversais da região média do músculo TA direito corados com HE. **Em A:** Grupo CT= fibras musculares com características normais, observar a presença do núcleo na periferia da fibra. **Em B:** Grupo CL7= observar a presença de intenso infiltrado inflamatório (★), fibras de diferentes tamanhos com núcleo centralizado (➡). Aumento 20x.

Tabela 1: Valores referentes às áreas em processo de inflamação/regeneração muscular e suas respectivas quantidades de núcleos centrais nos grupos contusão e tratados com *laser*.

Grupo	Área em processo Infl/Reg Muscular (%)		Quantidade de Núcleos centrais	
	Mediana	Q1 - Q3	Mediana	Q1 - Q3
C7	16,36*	16,36 - 21,66	705	705 – 786
C21	1,50	1,5 – 6,27	1084	1084 – 1084
CL7	12,34#	12,34 – 17,69	423	265 – 827
CL21	3,53	3,53 – 5,82	494	220 - 634

*difere do C21; # difere do CL21

Tabela 2: Valores referentes às áreas das fibras com núcleo centralizado, dos grupos C e CL, comparadas às fibras com núcleo periférico, do grupo CT.

Área das fibras com núcleo periférico (μm^2)		
Grupo	Mediana	Q1 – Q3
CT	2913,39	2462,95 – 2920,94

Área das fibras com núcleo centralizado (μm^2)		
Grupo	Mediana	Q1 – Q3
C7	836,78*	836,78 – 870,37
C21	1424,28	1424,28 – 1668,98
CL7	1066,87*#	820,79 – 1270,73
CL21	2633,21	1747,21 – 3300,47

* difere do CT; # difere do CL21