



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

JÉSSICA SILVA FERREIRA

“EFEITO DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE SOBRE A
AUTOFAGIA EM FIBRAS MUSCULARES ATRÓFICAS”

CAMPINAS

2017

JÉSSICA SILVA FERREIRA

**“EFEITO DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE SOBRE A
AUTOFAGIA EM FIBRAS MUSCULARES ATRÓFICAS”**

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas como parte dos requisitos exigidos
para a obtenção do Título de Mestra em
Biologia Celular e Estrutural, na área de
Anatomia.*

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA
PELA ALUNA JÉSSICA SILVA FERREIRA E
ORIENTADA PELO PROF. DR. HUMBERTO
SANTO NETO

Orientador: PROF. DR. HUMBERTO SANTO NETO

CAMPINAS

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

F413e Ferreira, Jéssica Silva, 1992-
Efeito do laser de baixa intensidade sobre a autofagia em fibras musculares
atróficas / Jéssica Silva Ferreira. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Humberto Santo Neto.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de
Biologia.

1. Terapia a laser de baixa intensidade. 2. Atrofia muscular. 3. Autofagia. I.
Santo Neto, Humberto, 1953-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto
de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Effect of low-level laser therapy on autophagy in muscle fiber
atrophy

Palavras-chave em inglês:

Laser therapy, low-level

Muscle atrophy

Autophagy

Área de concentração: Anatomia

Titulação: Mestra em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

Humberto Santo Neto [Orientador]

Bruno Rodrigues

Cristina Aparecida Veloso Guedes

Data de defesa: 26-01-2017

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural

Campinas, 26 de Janeiro de 2017

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Humberto Santo Neto(Orientador)

Prof. Dr. Bruno Rodrigues

Profa. Dra. Cristina Aparecida Veloso Guedes

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

*Este trabalho é dedicado aos **meus pais**, Carmo e Luiza, por acreditarem em mim e me apoiarem incondicionalmente.*

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho só foi possível, pois tenho ao meu lado pessoas dedicadas que me apoiaram das mais diversas formas, seja através de palavras, conhecimentos, experiências, habilidades ou materiais.

"Quem caminha sozinho pode até chegar mais rápido, mas aquele que vai acompanhado, com certeza vai mais longe."

(Clarice Lispector)

Portanto, muito tenho a agradecer...

*A **Deus**, em primeiro lugar, por seu amor infinito, por me permitir viver meus sonhos, por me dar sabedoria para compreender que reserva sempre o melhor para mim mesmo quando seus planos divergem dos meus. E por colocar em minha vida todas essas pessoas que abaixo agradeço.*

"Mas buscai primeiro o Reino de Deus, e a sua Justiça, e as demais coisas vos serão acrescentadas."

(Mateus 6:33)

*Aos meus pais, **Carmo Natal Ferreira e Luiza Aparecida da Silva Ferreira**, por seu amor, apoio e por seus ensinamentos. São minha motivação, minha inspiração, meus heróis... Amo-os eternamente!*

*À minha irmã, **Jaqueline Silva Ferreira**, a qual tenho como uma filha, que sempre cuidei e sempre cuidarei. Agradeço por me ouvir, por compartilhar das alegrias e tristezas. Amor incondicional!*

"Tu te tornas eternamente responsável por aquilo que cativas."

(Antoine de Saint-Exupéry)

*Ao **Renato Luís Bertin**, meu companheiro e amigo, pelo amor, carinho, suporte, atenção, motivação, paciência inesgotável, aconselhamento e pela presença nos momentos bons e ruins. Te amo!*

"Para conquistarmos algo na vida não basta ter talento, não basta ter força, é preciso também viver um grande amor."

(Wolfgang Amadeus Mozart)

*Ao Prof. Dr. **Humberto Santo Neto**, pela orientação, sem a qual não seria possível a realização deste trabalho, pela dedicação incansável, pelo exemplo de docente e pessoa, pela paciência, confiança, envolvimento, inspiração e motivação.*

“Diga-me e eu esquecerei, ensina-me e eu poderei lembrar, envolva-me e eu aprenderei.”

(Benjamin Franklin)

*À **Profa. Dra. Maria Julia Marques** por todo conhecimento compartilhado, sugestões dadas durante a realização deste trabalho, e principalmente pelos questionamentos que me fizeram crescer a cada dia.*

“Não é a resposta que ilumina, mas a pergunta.”

(Decouvertes)

*Aos Amigos e colegas de laboratório, **Marcos Maciel Júnior, Camila Saqueli e Catharina Nucci Martins**, pelo carinho, companheirismo, confiança, pelos diálogos e por tornarem meus dias mais leves e alegres, por me suportarem e compartilharem comigo seu conhecimento, lutas e vitórias. Amigos que levo daqui para a vida!*

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

(Charles Chaplin)

*À **Aline Barbosa Macêdo** pela amizade, orientação, paciência, gentileza e ajuda na execução deste trabalho. Agradeço por poder compartilhar contigo esta conquista.*

*À **Giselli Morelli Quitério Lima e Donizeti Florêncio de Lima**, proprietários da Clínica MedCenter, pelo apoio, confiança e empréstimo do aparelho usado neste trabalho.*

*Aos colegas de laboratório, **Renato Rissi, Juliano Alves Pereira, Adriana Fogagnolo Mauricio, Samara Camaçari de Carvalho e Paula A. Saenz**, pela contribuição na minha formação e execução deste trabalho.*

*Aos **amigos** que fiz durante a participação das disciplinas cursadas no mestrado, por compartilharem seus conhecimentos, experiências e dúvidas, tornando nossas aulas mais interessantes e completas.*

*Ao **Giuliano Gonçalves**, primeira pessoa na pós graduação que acreditou em mim, me apoiou e me abriu as portas para conhecer o “Departamento de Anatomia” da UNICAMP. Obrigada por tudo!*

*À **Renata Moreira Acunha**, amiga e colega de profissão, pela ajuda, dedicação, competência e comprometimento com o nosso trabalho. É com muito orgulho que compartilho essa conquista!*

*À **Caroline Torricelli**, minha amiga e professora de inglês, por acreditar em mim quando eu não acreditava, pela dedicação, competência e paciência. Thankyou!*

*A todos os **docentes do “Departamento de Anatomia” da UNICAMP**, pela contribuição na minha formação através dos ensinamentos e experiências acadêmicas compartilhados nas disciplinas cursadas durante o mestrado.*

*A todos os **alunos e professores dos demais laboratórios do “Departamento de Anatomia” da UNICAMP**, Laboratório de Plasticidade e Regeneração Óssea; Laboratório de Regeneração Nervosa; Laboratório de Plasticidade Muscular; Laboratório de Eletromiografia, Controle Motor e Eletrotermoterapia Experimental; Laboratório de Biologia da Reprodução e Laboratório de Carcinogenese Urogenital e Imunoterapia, por compartilharem comigo seus conhecimentos e experiências.*

*À banca examinadora, **Prof. Dr. Bruno Rodrigues e Profa. Dra. Cristina Aparecida Veloso Guedes**, por aceitarem o convite e colaborar com esta pesquisa.*

*Aos funcionários do Departamento de Anatomia, **Marco Aurélio Ribeiro de Paula, Norivaldo Celestino, Paulo Afonso Bernardes e Walter Ferreira** pelo apoio, colaboração e excelência nos procedimentos experimentais realizados neste trabalho.*

*À empresa **IBRAMED** pela parceria neste trabalho.*

*À Sra. **Líliam Alves Senne Panagio** pela atenção, dedicação e auxílio durante o mestrado.*

*Ao **Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural** pelo comprometimento e excelência na formação de seus alunos.*

*À **CAPES** e ao **CNPq** pelo apoio financeiro que tornou possível a execução deste trabalho.*

*"A mente que se abre a uma nova ideia jamais
voltará ao seu tamanho original."*

(Albert Einstein)

RESUMO

A laserterapia de baixa intensidade (LTBI) ou fotobiomodulação tem sido aplicada em diversas condições em tecidos humanos. Em particular, no músculo esquelético essa terapia melhora condições musculares como inflamação, fadiga e regeneração. Também tem-se revelado benéfica na atenuação da atrofia muscular quando o músculo é submetido à imobilização e microgravidade. A atrofia muscular é uma condição caracterizada pela diminuição do volume da fibra muscular e perda da força de contração da mesma. A atrofia se instala quando o processo de degradação prevalece sobre o de síntese proteica resultando em perda de organelas e de proteínas. Diversos mecanismos celulares e moleculares estão envolvidos na atrofia muscular dependendo da causa desta última. Um dos mecanismos envolvidos é a autofagia, processo fisiológico cuja função precípua é degradar e reciclar componentes do citosol, eliminando as organelas defeituosas e os agregados de proteínas celulares. Observou-se recentemente que a LTBI interferiu também nos processos autofágicos, em modelo experimental de mucosite. O presente estudo investigou os efeitos da LTBI: i) na atrofia muscular provocada por desnervação e ii) se esse efeito estaria relacionado a autofagia. Para isto, camundongos da linhagem C57BL/10 foram anestesiados e tiveram o nervo isquiático direito totalmente seccionado. Os animais foram divididos em 3 grupos, sendo o Grupo Lesão (LE) de animais submetidos a secção total de nervo isquiático; Grupo Laser (LA), animais nos quais o nervo isquiático foi totalmente seccionado e o músculo tibial anterior direito recebeu aplicação de laser (comprimento de onda de 830 nm, densidade de energia de 4 J/cm²); Grupo Controle (CT), sem tratamento alguma aplicação do laser teve início 6 horas após a secção total do nervo, sendo aplicada diariamente sobre o músculo tibial anterior por 5 ou 14 dias consecutivos. Após 5 ou 14 dias de tratamento, parâmetros histomorfométricos, bioquímicos e ultraestruturais foram avaliados no músculo tibial anterior direito. Neste estudo, a LTBI atenuou a atrofia induzida por desnervação no músculo tibial anterior de camundongos, mas sem intervir no processo autofágico. Sugere-se estudos futuros sobre a LTBI como método adjuntivo à eletroestimulação no tratamento da atrofia por desnervação.

Palavras chaves: Laserterapia, atrofia muscular, desnervação muscular, sistema autofagia-lisossomo.

ABSTRACT

Low-level laser therapy (LLLT) or photobiomodulation has been applied under various conditions in human tissues. Particularly, in the skeletal muscle this therapy improves muscle conditions, such as inflammation, fatigue and regeneration. It has also been shown to be beneficial in attenuating muscle atrophy when muscle undergoes immobilization and microgravity. Muscle atrophy is a condition characterized by a decrease of muscle fiber volume and loss of contraction force. Muscle atrophy occurs when protein degradation exceeds its synthesis leading to loss of organelles and proteins. Several cellular and molecular mechanisms are involved in muscle atrophy depending on its cause. One of these mechanisms is autophagy, a physiological process whose main function is to degrade and recycle cytosol components, eliminating damaged organelles and cellular protein aggregates. It has recently been observed that LLLT also interferes with autophagy processes in an experimental model of mucositis. The present study investigated the effects of LLLT: i) on denervation-induced muscle atrophy and ii) whether this effect would be related to autophagy. C57BL/10 mice were anesthetized and had their sciatic nerve totally sectioned. The animals were divided into 3 groups: Lesion Group (LE), with animals subjected to total section their sciatic nerve; Laser Group (LA), animals in which sciatic nerve was completely sectioned and the right anterior tibialis muscle irradiated with Laser (wavelength of 830 nm, energy density of 4 J/cm²); Control Group (CT), without any surgery nor treatment. Laser application started 6 hours after total section of the nerve, being applied daily on the right anterior tibialis muscle for 5 or 14 consecutive days. After 5 or 14 days of treatment, histomorphometric, biochemical and ultrastructural parameters were evaluated in right anterior tibialis muscle. In the present study, LLLT significantly attenuated denervation-induced muscle atrophy in mice anterior tibialis muscle, but without affecting the autophagic process. It is suggested future studies about LLLT as an adjunct method of electrical stimulation in the treatment of denervation-induced muscle atrophy.

Key words: Laser therapy, muscle atrophy, muscle denervation, autophagy-lysosome system.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Atg - proteína relacionada à autofagia

ATG- gene relacionado à autofagia

ATP – Trifosfato de adenosina

CT- Grupo Controle

GaAIs - Arseneto de Gálio e Alumínio

GAPDH - Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

IL-1 β - Interleucina-1 Beta

IL-6 - Interleucina-6

LA- Grupo Laser

Laser - *Light Amplification by the Stimulated Emission of Radiation*

LE- Grupo Lesão

LC3- Proteína-1 de cadeia leve-3 associada ao microtúbulo

LTBI -Laserterapia de Baixa Intensidade

MMP-2- Metaloproteinase 2

MuRF1- *Muscle RING-finger 1*

MyoD - Fator de diferenciação Miogênica

TGF- β - Fator de Crescimento transformador Beta

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral Alfa

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	14
1.1. Aspectos Físicos e Fundamentos Biológicos da Laserterapia de Baixa Intensidade	15
1.2. Laserterapia de Baixa Intensidade em Músculo Esquelético: observações experimentais e clínicas	16
1.3. Atrofia Muscular: Aspectos Clínicos e Biológicos	18
1.4. Laserterapia de Baixa Intensidade em Atrofia Muscular e Autofagia	20
2.OBJETIVO	22
3.MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1. Animais e Grupos Experimentais	25
3.2. Procedimento Cirúrgico para Indução da Atrofia	25
3.3. Aplicação do laser	26
3.4. Eutanásia dos Animais e Obtenção do Músculo Tibial Anterior	27
3.5. Avaliação da Atrofia Muscular	28
3.6. Avaliação da autofagia	28
3.6.1. Immunoblotting	28
3.6.2. Imunofluorescência	30
3.6.3. Microscopia Eletrônica	30
3.7. Análise Estatística	31
4.RESULTADOS	32
4.1. Sobre a Atrofia Muscular	33
4.2. Sobre a Autofagia	35
4.2.1. Quantificação de LC3 por Immunoblotting	35
4.2.2. Quantificação de Pontos Positivos à Imunomarcagem de LC3	37
4.2.3. Ultraestrutura da Fibra Muscular	39
5.DISSCUSSÃO	42
5.1. Sobre o Protocolo	43
5.2. Sobre os Resultados Propriamente Ditos	43
6.CONCLUSÃO	47
REFERÊNCIAS	49
ANEXOS	56
ANEXO A	57
ANEXO B	58

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos Físicos e Fundamentos Biológicos da Laserterapia de Baixa Intensidade

O termo LASER é um acrônimo para Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation (amplificação da luz através da emissão estimulada de radiação).

Em 1917, Albert Einstein formulou a Teoria da Emissão Estimulada de Radiação, dando origem aos princípios básicos da geração desse tipo de luz (KLEPPNER, 2004). Em 1960 Theodore Maiman, um engenheiro e físico americano produziu o primeiro aparelho emissor de luz laser de rubi. Desde então, inúmeras variações do protótipo original de Maiman tem encontrado diferentes aplicações.

A primeira sugestão da aplicação do laser como ferramenta terapêutica foi proposta no final dos anos de 1960 por Endre Mester, um médico húngaro, e seus colaboradores após terem observados que a irradiação laser de baixa intensidade atuava de forma positiva na regeneração dos tecidos. Desde então, e cada vez mais, profissionais como fisioterapeutas, dentistas, e médicos utilizam a laserterapia de baixa intensidade (LTBI) também conhecida por fotobiomodulação para cicatrização de feridas, tratamento de distúrbios musculoesqueléticos e dor, entre outras situações (KITCHEN, 2003; BÉLANGER, 2012).

A interação do laser de baixa intensidade com o tecido biológico se faz basicamente por dois mecanismos. Primeiro, o feixe luz incidido sofre dispersão à medida que penetra nos tecidos, e segundo sofre absorção por algum cromóforo. Este último é representado por alguma biomolécula que é capaz de, através de sua configuração eletrônica ou atômica, ser excitada pelo(s) fóton(s) incidente(s). A dispersão e absorção da luz no tecido dependem do comprimento de onda, sendo que o intervalo entre 600 a 1100 nm é capaz de gerar efeitos fotobioestimulantes (KITCHEN, 2003; HAMBLIN; DEMIDOVA, 2006; HUANG et al., 2011).

Na célula, o principal cromóforo capaz de absorver a luz emitida pelo laser é o citocromo c oxidase presente na cadeia respiratória da mitocôndria (KARU, 1989). O citocromo c oxidase absorve luz e excita seus elétrons e desencadeia uma cascata de reações bioquímicas que uma vez estimulada permanece em atividade por um período de tempo, sem a necessidade de um estímulo contínuo da luz (KARU, 1999). Tais reações levam ao aumento da produção de trifosfato de adenosina (ATP), síntese de DNA e RNA, redução do estresse oxidativo e restaura a função mitocondrial, iniciando uma cascata de efeitos que promovem a reparação dos tecidos e a redução de inflamação (CHUNG et al., 2012).

Pesquisas a respeito da resposta biológica do laser são numerosas. No sistema nervoso a LTBI acelera a regeneração nervosa após esmagamento de nervos espinais

(MARCOLINO et al., 2013) e produz analgesia devido a um bloqueio da condução de fibras nervosas centrais e periféricas e à liberação de endorfinas (DE FREITAS; HAMBLIN, 2016). A LTBI, em condições experimentais é capaz de acelerar a reparação óssea através da estimulação de osteoblastos (HOU et al., 2008), diminuir a inflamação através da inibição de citocinas pró-inflamatórias tais como, interleucina-1 beta (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (DE ALMEIDA et al., 2013) bem como acelerar o processo cicatricial em lesões cutâneas (CURY et al., 2013).

1.2. Laserterapia de Baixa Intensidade em Músculo Esquelético: observações experimentais e clínicas

O primeiro estudo da LTBI em músculo esquelético é de autoria de Mester e colaboradores (1975) no qual demonstrou melhoria na regeneração das fibras musculares. Desde então, da análise da literatura observa-se a existência de mais de quatro centenas de estudos de caráter experimental a respeito da LTBI englobando diversos aspectos da estrutura, biologia e fisiologia da fibra muscular. Observa-se também que o aspecto mais examinado é o potencial anti-inflamatório da LTBI.

O efeito anti-inflamatório da LTBI tem sido examinado tanto em seu aspecto preventivo quanto curativo. Há evidências de que a LTBI aumentou a atividade da metaloproteinase 2 (MMP-2), uma enzima responsável pela degradação dos componentes da matriz extracelular e das membranas basais. Neste caso a lesão muscular foi induzida por trauma pós impacto. O efeito positivo da LTBI foi também observado sobre o tecido conjuntivo anexo a musculatura esquelética conforme demonstrado por análise quantitativa e qualitativa da distribuição do colágeno (ALVES et al., 2014; RIBEIRO et al., 2015).

Silveira e colaboradores (2016) observaram que a LTBI induziu processos bioestimulatórios que aceleraram ou resolveram a resposta inflamatória aguda, bem como, o estado oxidante provocado pelo trauma. Outro fato de interesse é que em algumas situações experimentais o efeito anti-inflamatório da laserterapia com comprimento de onda de 904 nm e 810 nm foi superior aquele observado com terapêutica farmacológica por diclofenaco. A avaliação da inflamação nestes casos foi efetuada por métodos bioquímicos e técnicas de genética molecular (DE ALMEIDA et al., 2013; DE ALMEIDA et al., 2014).

Efeito benéfico da LTBI foi também observado na regeneração muscular. O emprego de laser com 808 nm promoveu a redução da fibrose caracterizada pela diminuição do colágeno tipo I e do fator de crescimento transformador beta (TGF-beta), uma citocina que estimula a síntese de proliferação de colágeno e de fibronectina (ASSIS et al., 2013).

Referente a regeneração muscular outro fato interessante é que o efeito positivo da LTBI foi detectado no processo de regeneração muscular tanto em sua fase aguda quanto crônica. Observou-se também o efeito bioestimulatório do laser na angiogênese, na redução da mionecrose, e na estimulação da síntese de colágeno do tipo I e III, quando se emprega criolesão (DE SOUZA et al., 2011).

O efeito positivo sobre a regeneração muscular foi observado mesmo em animais idosos inclusive com estimulação da proliferação de células satélites, que são responsáveis pela formação de novas fibras musculares (VATANSEVER et al., 2012). Além do estímulo à regeneração propriamente dita há evidências de que a LTBI atuou como agente mioprotetor à medida em que diminuiu a área de lesão quando foi aplicada simultaneamente a indução da mesma (BRUNELLI et al., 2014).

Os efeitos da LTBI foram observados não somente em situações de lesão e inflamação, mas também em condições fisiológicas. Fadiga e lesão em músculo tibial anterior de ratos resultantes de contrações tetânicas foram evitadas por aplicação de laser com diferentes comprimentos de onda (SANTOS et al., 2014).

A LTBI, para uso em humanos foi inicialmente empregada no tratamento de diversos tipos de úlceras crônicas no final da década de 1960 e início de 1970 (MESTER; MESTER; MESTER, 1985).

Atualmente a LTBI é empregada em situações de fadiga muscular (DE BRITO VIEIRA et al., 2014; MIRANDA et al., 2014; BUBLITZ et al., 2016), dor miofascial (KHALIGHI et al., 2016), melhoria da performance muscular (TOMA et al., 2016) assim como para atenuar a espasticidade da musculatura mastigatória em casos de paralisia cerebral (SANTOS et al., 2016) e na prevenção de danos musculares (FERRARESI et al., 2015).

Portanto o tecido muscular esquelético responde à LTBI em diversas situações biológicas.

1.3. Atrofia Muscular: Aspectos Clínicos e Biológicos

O músculo estriado esquelético é o tecido presente em maior extensão no corpo humano representando, em indivíduos sadios adultos cerca de 40% da massa corporal total. Trata-se de um tecido maleável, com grande capacidade de adaptação e de responder rapidamente a estímulos tanto positivos quanto negativos. O tecido muscular esquelético também se amolda a estímulos produzidos por condições de prolongada inatividade e envelhecimento, assim como em doenças crônicas, como câncer e diabetes (ASSIS et al., 2013; BONALDO; SANDRI, 2013; SCHIAFFINO et al., 2013; FRONTERA; OCHALA, 2015).

Um dos mecanismos de adaptação de maior importância na biologia bem como nos aspectos clínicos do tecido muscular envolve os processos de síntese e de degradação das proteínas sarcoplasmáticas. Apesar de produzirem resultados opostos, os processos de síntese e de degradação são regulados pelos mesmos mecanismos genéticos e moleculares. Aceita-se que a ativação de um deles implica na supressão do outro e vice versa. Desta forma, o equilíbrio entre eles é fundamental para a homeostasia celular. A ruptura desse equilíbrio como, por exemplo, a prevalência do processo de degradação sobre o de síntese proteica resulta em perda de organelas e de proteínas. Como resultado haverá diminuição do volume da fibra muscular e perda da força de contração da mesma, uma condição conhecida por atrofia muscular (BONALDO; SANDRI, 2013).

A atrofia muscular resultante de lesões de nervos espinais configura-se num aspecto relevante no cenário de reabilitação física em todo o mundo. Embora, nesses casos, a reparação da lesão nervosa represente o procedimento de maior importância a prevenção da atrofia muscular é um fator significativo para o sucesso da recuperação funcional do músculo. É bem sabido que a manutenção das condições da biologia da fibra muscular, facilita o processo de recuperação da junção neuromuscular promovido pela reparação cirúrgica (ROCHKIND, 2009; WANG et al., 2014).

No Brasil, a axonotmese representa a lesão do nervo mais comum (45%), seguido por neurotmese (41%) e neuropraxia (14%) (KOUYOUMDJIAN, 2006). A consequência secundária de lesões nervosas periféricas mais evidente é a atrofia muscular, causando incapacidade funcional (WANG et al., 2014). Portanto, atrofia muscular por desnervação representa um assunto de importância para a clínica médica e reabilitadora.

Atualmente a eletroestimulação é o método mais utilizado na prevenção da atrofia muscular. Apesar de bons resultados há algumas desvantagens que podem interferir na qualidade do resultado, por exemplo, o posicionamento e o tamanho da superfície dos eletrodos.

Além de contraindicações para o seu uso como no caso de paciente com dispositivo eletrônico implantado, como por exemplo, marca-passo cardíaco e aplicação sobre lesões cutâneas abertas. Há também pessoas que não toleram a sensação do estímulo, portanto a eletroestimulação depende da tolerância de dor do paciente (KITCHEN, 2003; ALON, 2013).

Diversos mecanismos celulares e moleculares estão envolvidos na atrofia muscular sendo que os principais são: o sistema ubiquitina-proteassomo e a via autofagia-lisossomo (BONALDO; SANDRI, 2013; SCHIAFFINO et al., 2013).

O primeiro é assim denominado por envolver proteínas chamadas de ubiquitinas distribuídas no citoplasma e núcleo que com auxílio das enzimas ativadora de ubiquitina (E1), conjugadora (E2) e Ligase (E3), se associam a um complexo proteico denominado de proteassoma26S. Cabe ao complexo ubiquitina-proteassoma efetuar a proteólise de proteínas desnoveladas reduzindo-as em oligopeptídeos. Após ativação da ubiquitina pela E1, a ubiquitina é transferida de E1 para E2, então E3 acopla-se ao substrato proteico a ser degradado induzindo o movimento da ubiquitina de E2 ao substrato proteico que resulta no acoplamento deste último ao proteassoma 26S (BONALDO; SANDRI, 2013). No músculo esquelético o sistema ubiquitina-proteassoma promove a remoção de proteínas sarcoméricas quando ocorrem alterações na atividade muscular.

O evento conhecido como autofagia-lisossomo, que será daqui em diante referido apenas como autofagia, representa o processo fisiológico, em células eucarióticas pós mitóticas cuja função precípua é degradar e reciclar componentes do citosol, eliminando as organelas defeituosas e os agregados de proteínas celular. Trata-se, portanto, de um processo crucial para a reciclagem dos componentes celulares e para a manutenção da homeostasia celular nos tecidos orgânicos (KLIONSKY, 2007).

A autofagia resulta, inicialmente, na formação de autofagossomo, uma vesícula formada por dupla membrana, que engloba as organelas a serem degradadas (Figura 1). Ao autofagossomo funde-se o lisossomo, originando o autolisossomo, que contém enzimas hidrolíticas em especial a fosfatase ácida que em última análise se responsabiliza pela degradação enzimática do conteúdo vesicular (MIZUSHIMA et al., 2004).

O processo autofágico envolve a atividade de proteínas relacionadas à autofagia (Atg), as quais são codificadas pelos genes denominados ATG. Dentre estas proteínas, encontra-se o complexo multiproteico formado por Atg12-Atg5 e Atg16L1, presente na etapa inicial da formação da membrana de isolamento (MIZUSHIMA; YOSHIMORI; LEVINE, 2010). Nesta etapa também, a LC3-I (forma citosólica da proteína-1 de cadeia leve-3 associada

ao microtúbulo) é clivada e conjugada com fosfatidiletanolamina para gerar a forma mais rápida de migração, a LC3-II a qual se liga à membrana do autofagossomo (ZHAO et al., 2007).

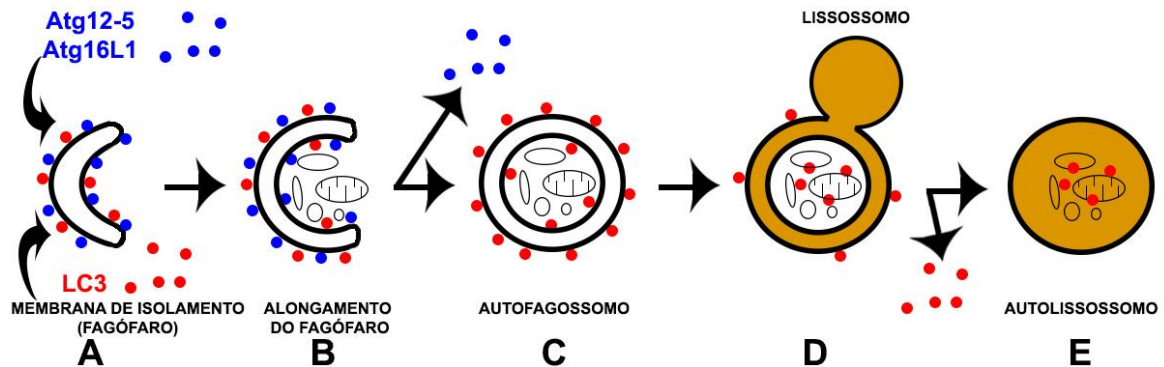


FIGURA 1. Processo autofágico em células de mamíferos.(A) Membrana de isolamento, ou fagóforo, ao qual se une o complexo multiproteico Atg12-5 e Atg16L1 e proteína LC3 (B) Alongamento do fagóforo e captura de componentes citoplasmáticos; (C) Fechamento da dupla membrana, formando o autofagossomo; do qual se dissocia o complexo Atg12-5 e Atg16L1; (D) Fusão da membrana do lisossomo com a membrana externa do autofagossomo, da qual a LC3 se dissocia; (E) Fusão do lisossomo com o autofagossomo, formando o autolisossomo, cuja membrana interna do autofagossomo e os componentes capturados, juntamente com LC3-II são degradados pelas hidrolases lisossomais. Adaptado de Xie e Klionsky (2007).

Portanto, a atrofia muscular é um assunto clinicamente relevante e a sua instalação depende de alterações dos níveis fisiológicos basais da autofagia.

1.4. Laserterapia de Baixa Intensidade em Atrofia Muscular e Autofagia

Salvo engano a literatura especializada revela a existência de apenas três estudos experimentais cujos objetivos foram os de examinar o possível efeito antiatrófico da LTBI. Com protocolos de tratamento semelhantes aquele aqui utilizado, observou-se significativa diminuição da atrofia quando estas foram resultantes de imobilização, isquemia seguida de reperusão e após animal ter sido submetido a microgravidade (NAKANO et al., 2009; LAKYOVA et al., 2010; MONICI et al., 2013).

Contudo, os efeitos benéficos observados naqueles estudos não podem ser extrapolados para os casos de atrofia provocada por desnervação muscular. Este raciocínio se

baseia no fato de que, inobstante a existência de um programa genético comum (SACHECK et al., 2007; CISTERNA; CARDOZO; SAEZ, 2014) há evidências de que a expressão de alguns genes são mais afetadas que outros dependendo do tipo de estímulo que produz a atrofia. Assim, por exemplo, na atrofia induzida por desnervação há aumento na expressão do mRNA relacionado a síntese de receptores de acetilcolina o que parece não ocorrer quando a atrofia é induzida por outros meios (JOASSARD et al., 2015). Além disto, a expressão de alguns genes diferem na fase aguda e na fase crônica da desnervação. Por exemplo, o gene P53, relacionado a detecção de estresse celular é expresso durante a atrofia por desnervação, mas não naquelas produzidas por envelhecimento, imobilização e privação alimentar (CALURA et al., 2008).

Outro fato relevante diz respeito possibilidade de duplo efeito da autofagia sobre a homeostasia da fibra muscular. Há indícios de que a ausência de autofagia, provoca uma perda crônica de massa muscular devido ao acúmulo de componentes celulares danificados ou envelhecidos. Por outro lado, o excesso de autofagia causa uma rápida perda de massa muscular devido à depuração contínua dos componentes celulares necessários (NEEL; LIN; PESSIN, 2013). Portanto a presença do processo autofágico em um determinado nível é essencial para a manutenção da massa e da função muscular (RABEN et al., 2008; MASIERO et al., 2009).

Um fato de relevância para este estudo advém de uma investigação recente em um modelo experimental de mucosite, uma condição caracterizada pela inflamação da mucosa oral incluindo lábios, língua, palato e gengivas causada pelo tratamento de radioterapia e quimioterapia em portadores de câncer. A autofagia é um processo envolvido no desenvolvimento da mucosite após esses tratamentos (PAGLIN et al., 2001; PAGLIN; YAHALOM, 2006). Observou-se recentemente que a LTBI interferiu nos processos autofágicos através da modulação da expressão de genes autofágicos principalmente o ATG5 que é importante na fase inicial da formação da membrana de isolamento (BOSTANCIKLIOGLU et al., 2015).

Considerando-se que a: i) *prevenção de atrofia muscular por desnervação é de interesse clínico, e que ii) em outras situações como imobilização e microgravidade, a atrofia é minimizada pela LTBI,*

Este estudo tem como objetivo *principal* examinar em condições experimentais, os efeitos da LTBI na atrofia muscular induzida por desnervação.

Considerando-se ainda que: i) *a autofagia tem um papel significativo na atrofia muscular e ii) que a LTBI pode modular a autofagia, conforme visto nos casos de mucosite,*

Outro objetivo deste estudo é examinar, se o eventual efeito antiatrófico da LTBI pode estar relacionado a alterações da autofagia.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais e Grupos Experimentais

Foram utilizados camundongos com 4 e 5 meses de vida, fêmeas e machos, da linhagem C57BL/10, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) – UNICAMP. Durante o período experimental, os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Biologia Celular e Estrutural do Instituto de Biologia, UNICAMP, e acomodados em caixas plásticas padronizadas sob condições ambientais controladas (12 horas de ciclo claro/escuro) com ração e água *ad libitum*. Todos os experimentos foram realizados em acordo com as diretrizes para experimentação animal de nossa Instituição, sob o protocolo nº 3805-1 da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-IB-UNICAMP).

No total foram empregados 48 animais, assim distribuídos: Grupo Lesão (LE); animais submetidos a secção total de nervo isquiático (n=16), Grupo Laser (LA); animais nos quais o nervo isquiático foi totalmente seccionado e o músculo tibial anterior direito recebeu aplicação de laser (n=16), Grupo Controle (CT); sem tratamento algum (n=16).

3.2. Procedimento Cirúrgico para Indução da Atrofia

Os animais foram anestesiados, com solução de cloridrato de cetamina 2% (Francotar®) e Cloridrato de Xilazina 2% (Virbaxyl®), na proporção de (1:1) diluídos em água bidestilada na proporção de (1:3) e injetado 0,015 ml/g por via intraperitoneal.

Após nos certificarmos de que os animais estavam profundamente anestesiados, foi realizada tricotomia na face posterior do membro pélvico direito e através de incisão entre as fibras do músculo glúteo máximo o nervo isquiático direito foi exposto, junto ao tendão do músculo obturador. O nervo foi seccionado com tesoura microcirúrgica sob microscópio cirúrgico (DF Vasconcellos #11991). Após a secção total do nervo, o coto proximal e distal foram afastados com a pinça. A seguir, a ferida cirúrgica foi fechada e para isto, utilizamos fio de sutura (Mononylon 5-0 ETHICON).

Depois de cessado o efeito do anestésico (após 2-3 horas) os camundongos foram levados ao biotério onde permaneceram em gaiolas de polietileno, com ração e água *ad libitum* e, sob condições ambientais controladas (12 horas de ciclo claro/escuro) com temperatura $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

3.3. Aplicação do laser

Os animais do Grupo Laser receberam tratamento de laser de baixa intensidade com os parâmetros descritos abaixo:

Aparelho *laserpulse* IBRAMED®, classe 3B, diodo de arseneto de gálio-alumínio (GaAlAs)

Comprimento de onda	830 nm
Densidade de energia	4.0 J/cm ²
Energia Total	480 J
Potência	30 mW
Densidade de potência	300 mW/cm ²
Área irradiada	0.1 cm ²
Modo de aplicação	Pontual
Tempo de aplicação	16 s

Antes do início da aplicação, o equipamento emissor foi calibrado pelo próprio fabricante, IBRAMED, através de Multímetro digital MD-1700. O tratamento teve início 6 horas após a secção total do nervo. O Grupo Laser (n=16) foi dividido em dois subgrupos com oito animais, sendo que em um grupo, os animais receberam tratamento com laser durante 5 dias consecutivos e em outro durante 14 dias consecutivos.

A aplicação do laser foi efetuada em único ponto na face antero lateral da perna direita na área correspondente à projeção do músculo tibial anterior. A aplicação teve duração de 16 segundos. A caneta emissora de laser foi posicionada perpendicularmente ao ponto de aplicação o qual foi previamente tricotomizado conforme pode ser visto na Figura 2. Durante a irradiação os animais não foram anestesiados, apenas imobilizados de forma que não produziu sofrimento ou dor.



FIGURA 2. Posicionamento do animal e aplicação do laser.

3.4. Eutanásia dos Animais e Obtenção do Músculo Tibial Anterior

Após anestesia, a pele foi aberta e o nervo isquiático foi exposto conforme anteriormente descrito. Procedeu-se, então com a avaliação das condições de inervação da fibra muscular. Para isto, o nervo isquiático foi levemente estimulado, num ponto proximal ao local em que este foi seccionado, o que foi executado por compressão, com uma pinça. Com isto, realizou-se a observação da presença ou ausência de resposta reflexa muscular.

Após examinados, os animais foram sacrificados com superdosagem de anestesia por via intraperitoneal, de uma mistura de cloridrato de cetamina (130mg/kg Francotar, Virbac, São Paulo, Brasil) e cloridrato de xilazina (6,8mg/kg, 2%, Virbaxyl, Virbac).

Os músculos tibiais anterior direito e esquerdo foram isolados e seccionados transversalmente na metade do terço médio do ventre muscular. Uma das metades do músculo serviu para análise histomorfométrica. Para isto, o músculo foi fixado em suporte de madeira com Tragacanth® imerso em isopentano à -80°C por 40 segundos e imediatamente colocado em nitrogênio líquido à -159°C. Os músculos foram retirados do nitrogênio e armazenados à -80°C em Biofreezer (BioFreezerJouan, VX380). Esta metade foi utilizada para obtenção de cortes histológicos que serviram para avaliação da atrofia muscular e da autofagia. A outra metade foi estocada em tubos criogênicos no Biofreezer e posteriormente empregada para o Immunoblotting.

Para o Grupo Controle adotou-se o mesmo procedimentos.

3.5. Avaliação da Atrofia Muscular

Para obtenção dos cortes histológicos os músculos foram inicialmente descongelados por aproximadamente 30 minutos até atingirem a temperatura de -26°C. A seguir utilizando-se de um criostato (Microm®-HS505E) foram obtidos cortes semiseriados transversais com espessura de 8 µm. As lâminas foram lavadas em água corrente por dez minutos e os cortes corados com hematoxilina de Harris, e lavadas em água corrente por dez minutos. Em seguida, as lâminas foram imersas em solução de eosina por 3 minutos e posteriormente o excesso de eosina foi removido em água destilada. Depois disto, os cortes foram desidratados em séries de etanol, diafanizados em xilol e as lâminas montadas em meio de montagem (Entellan ®) para posterior observação em microscopia de luz.

Procedeu-se, então, a captação de imagens. Para isto, foi utilizado fotomicroscópio (Nikon Eclipse E-400) com objetiva de 10X acoplado a um computador e vídeo-câmera (Nikon Express Series, Shinagawa, Tokyo, Japão). A área de secção transversal das fibras musculares foi avaliada com software Image-Pro Plus® Versão 6.0.0.260. O software Pxper® Versão 0.9.1.0 foi usado para exibir uma grade com medidas fixas sobre a imagem capturada do corte do músculo, onde o critério para seleção da fibra que foi avaliada era estar sob uma intersecção da grade. Para cada músculo foram examinados 3 cortes sendo que em cada um deles foram avaliadas 100 fibras musculares.

3.6. Avaliação da Autofagia

3.6.1. Immunoblotting

Os músculos foram retirados do biofreezer e homogeneizados em tampão (Triton X-100 1%, tris-HCl 100 mM [pH 7,4], pirofosfato de sódio 100mM, fluoreto de sódio 100mM, ETDA 10mM, ortovanadato de sódio 10 mM, PMSF 2 mM) com inibidores de proteases em homogeneizador SonicadorSonics vibra-cell™ modelo CV18, operado em Amp1 60% por 30 segundos. Os extratos foram centrifugados a 11000 rpm à 4°C por 20 minutos e o sobrenadante utilizado para análise por extrato proteico total. A determinação da proteína total foi realizada pelo método de Bradford (1976).

As amostras de extrato proteico foram tratadas com tampão Laemmli (Tris 10mM, β-MercaptoEthanol, glicerol 10%, SDS 2% e azul de bromfenol 0,1%) e aquecidas em banho

seco por 5 minutos a 95-100 °C. Em seguida, 30 mg de proteína foi pipetado em gel de 15% SDS-poliacrilamida em aparelho para eletroforese da Bio-Rad (mini-Protean, Bio-RadLaboratories). A eletrotransferência do gel para a membrana de nitrocelulose (Hybond, AmershamBiosciences) foi realizada em 90 minutos a 120 V em aparelho de transferência (mini-Protean, Bio-RadLaboratories, Richmond, CA, EUA). As membranas foram incubadas com anticorpo primário (anti LC3; NovusBiologicals, 1:250) diluído em 10ml de solução basal (Tris 10mM, NaCl 150mM e Tween-20 0,02%) contendo 1% de leite desnatado à 4°C, durante 12 horas em agitador mecânico (Rocker II, BoekelScientific). As membranas foram lavadas com solução basal 3 vezes, 10 minutos cada lavagem e incubadas com anticorpo secundário (antiRabbit, 1:2.500) por 90 minutos, em temperatura ambiente. Finalmente as membranas foram lavadas com solução basal 3 vezes, 10 minutos cada lavagem e para detectar as bandas imunorreativas, as membranas foram expostas à solução de quimioluminescência (SuperSignal West Pico Chemiluminescent, Pierce Biotechnology, Rockford, Illinois, USA) por 5 minutos, seguida de exposição no G-BOX. A detecção das bandas imunofluorescentes e a quantificação foram feitas no aparelho G-Box Chemi através do software de aquisição de imagem GeneSnap (Syngene, Maryland-EUA). As densidades das bandas foram quantificadas pelo software de análise GeneTools (Syngene, Maryland-EUA), em seguida os dados foram transferidos para o programa Excel.

Para a normalização dos dados obtidos utilizou-se o controle interno através da incubação das amostras com o anticorpo Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). O protocolo consiste na reutilização das membranas utilizadas para marcação descrita anteriormente. As referidas membranas foram lavadas com solução basal (3 vezes de 10 minutos) e incubadas com 10mL de Stripping Buffer (10mM Tris-HCl pH 7.5; β -Mercaptoethanol 0.1M; Uréia 8M) durante 1 hora, à 60°C. Em seguida, foi realizada uma incubação em Tris-HCl 1M pH 7.5 por 30 minutos em temperatura ambiente para neutralizar o Stripping. A incubação com os anticorpos primário (anti GAPDH) e secundário (antiRabbit) bem como a lavagem e detecção das bandas imunorreativas adotou-se o mesmo procedimento acima descrito relacionado ao anticorpo primário anti LC3.

As membranas foram coradas em Ponceau para certificação de que a quantidade de proteína foi a mesma em todas as amostras.

3.6.2. Imunofluorescência

Para a obtenção dos cortes transversais de músculos procedeu-se da mesma forma como descrita anteriormente.

Os cortes foram hidratados com TBS (0.05M) por 30 minutos e imersos em Triton X-100 (0.3% - Sigma) por 10 minutos. Após lavagem durante 30 minutos com TBS, os cortes foram imersos por 3 horas em solução para bloquear marcação inespecífica (TBS 0.05M em 3% de albumina bovina - TBS/ BSA 3%) e incubados por 12 horas com anticorpo primário (anti LC3; NovusBiologicals, 1:250) à 4°C, em câmara úmida. Os cortes foram lavados e incubados com anticorpo secundário anti-Rabbit IgG-FITC (Sigma) diluído em TBS/BSA 1%, durante 1 hora, à temperatura de 20°C. Finalmente, os cortes foram montados em meio de montagem DABCO (Sigma) e recobertos por lamínulas.

As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência (Nikon). Os pontos positivos ao anti-LC3 no sarcoplasma de cada fibra muscular foram diretamente contados com objetivas de aumento 20X sendo que para cada músculo foram examinadas 400 fibras. Os resultados foram expressos como a média de pontos positivos ao anti LC3 por fibra muscular.

3.6.3. Microscopia Eletrônica

Os animais foram anestesiados conforme descrito no início deste capítulo e posicionados em decúbito dorsal. Uma toracotomia mediana foi executada com posterior afastamento do esterno e do coração. O átrio direito foi aberto com auxílio de uma tesoura de irectomia e com uma agulha de 0.70X25mm acoplada a uma seringa de plástico de 20 ml o ventrículo esquerdo foi perfundido com uma solução de Karnovsky (1965) com volume suficiente para promover a palidez dos tecidos.

A pele correspondente aos locais anatômicos do ponto de secção total do nervo isquiático e do músculo tibial foi aberta para gotejamento da solução de Karnowsky e em seguida a retirada dos mesmos. Estes (nervo isquiático e músculo tibial anterior) foram imersos em solução de Karnovsky por 24 horas, em seguida foram fragmentados em blocos de aproximadamente 2 mm de comprimento e pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato 0.1M por duas horas. Posteriormente foram imersos em uranila a 5% durante toda a noite, desidratados em solução crescente de acetona (30% e 100%) e incluídos em resina Araldite. Cortes finos de orientação transversal e longitudinal em relação ao maior eixo do

ventre muscular foram obtidos através de ultramicrotomo e foram corados com azul de toluidina 1%. Da mesma forma foram obtidos cortes ultrafinos (4 secções em cada grade; 6-12 fibras musculares por secção) que foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo; e examinados em microscópio eletrônico de transmissão Tecnai G2 SpiritBioTWIN no Centro de Microscopia Eletrônica do IB/Unicamp.

3.7. Análise Estatística

Para verificação da normalidade dos dados foi utilizado o teste Kormogorov-Smirnov. Todos os resultados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Todos os grupos experimentais foram comparados usando a análise de variância ANOVA de uma via (seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls). Em todas as análises, os valores de P foram considerados estatisticamente significantes, apenas quando inferiores a 0,05 ($P < 0,05$). Para todos os cálculos estatísticos foi utilizado o software GraphPadPrism® versão 6.01 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

4. RESULTADOS

4.1. Sobre a Atrofia Muscular

Após 5 dias de desnervação, no Grupo Lesão ocorreu redução de 36% da área de secção transversal das fibras musculares quando comparado com o Grupo Controle ($1094,88 \pm 40,44 \mu\text{m}^2$ vs $1699,66 \pm 89,00 \mu\text{m}^2$, $P < 0.001$). No Grupo Lesão a área de secção transversal mostrou-se 34% menor que aquela do Grupo Laser ($1094,88 \pm 40,44 \mu\text{m}^2$ vs $1661,66 \pm 139,66 \mu\text{m}^2$, $P < 0.001$).

Não houve diferença entre as áreas de secção transversal dos músculos dos animais do Grupo Laser e Grupo Controle (Figura 3).

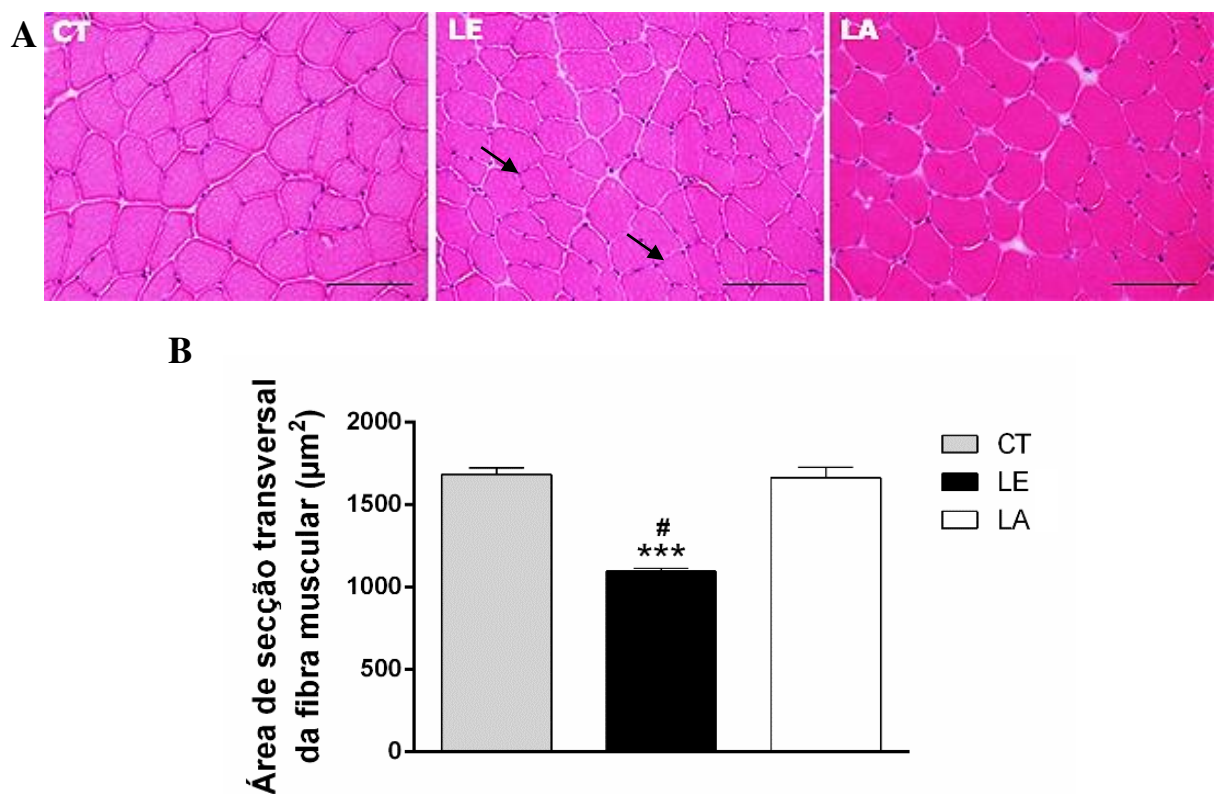


FIGURA 3. Área de secção transversal das fibras musculares após 5 dias de desnervação. (A) Cortes histológicos transversais de fibras musculares corados com hematoxilina-eosina. Notar a ocorrência de fibras atróficas (*setas*). Grupos: Controle (CT), Lesão (LE) e Laser (LA). Barra: 100 μm . **(B)** Área de secção transversal do músculo tibial anterior direito. Média $\pm$ desvio padrão. *** $P < 0.001$ quando comparado LE com CT e # $P < 0.001$ quando comparado LE com LA. A significância estatística foi determinada com ANOVA de uma via seguido pelo teste de Student-Newman Keuls.

Após 14 dias de desnervação, no Grupo Lesão ocorreu redução de 47% da área de secção transversal das fibras musculares quando comparado com o Grupo Controle ($827,21 \pm 63,57 \mu\text{m}^2$ vs $1559,26 \pm 72,31 \mu\text{m}^2$, $P < 0.001$). No Grupo Lesão a área de secção transversal mostrou-se 23% menor que aquela do Grupo Laser ($827,21 \pm 63,57 \mu\text{m}^2$ vs $1067,14 \pm 46,85 \mu\text{m}^2$, $P < 0.001$). No Grupo Laser houve redução de 32% da área de secção transversal quando comparado com o Grupo Controle ($1067,14 \pm 46,85 \mu\text{m}^2$ vs $1559,26 \pm 72,31 \mu\text{m}^2$, $P < 0.001$) (Figura 4).

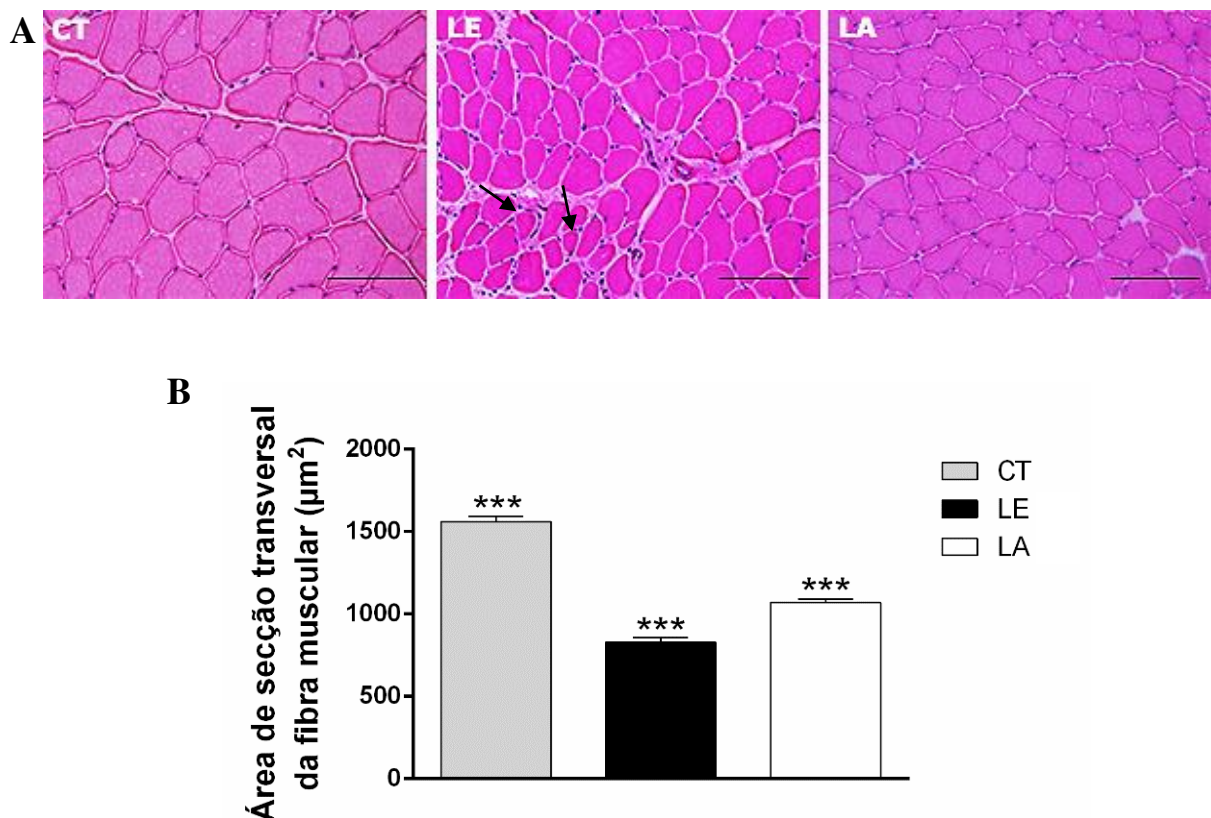


FIGURA 4. Área de secção transversal das fibras musculares após 14 dias de desnervação. (A) Cortes histológicos transversais de fibras musculares corados com hematoxilina-eosina. Notar a ocorrência de fibras atroficas (*setas*). Grupos: Controle (CT), Lesão (LE) e Laser (LA). Barra: 100 μm . **(B)** Área de secção transversal do músculo tibial anterior direito. Média $\pm$ desvio padrão. *** $P < 0.001$ quando comparado CT com LE, CT comparado com LA e LE comparado com LA. A significância estatística foi determinada com ANOVA de uma via seguido pelo teste de Student-Newman Keuls.

4.2. Sobre a Autofagia

4.2.1. Quantificação de LC3 por Immunoblotting

A análise dos resultados referente aos 5 dias mostraram que não houve diferença ($P < 0.05$) na razão LC3II/LC3I/GAPDH entre os grupos Controle, Lesão e Laser (Figura 5).

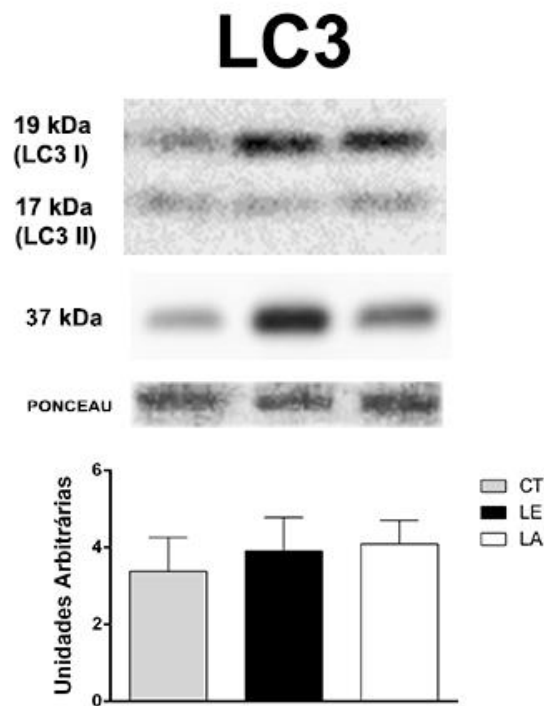


FIGURA 5. Razão LC3II/LC3I/GAPDH após 5 dias de desnervação. Os números indicados à esquerda representam os pesos moleculares (kDa) das correspondentes proteínas. Bandas da proteína LC3 (linha superior): Isoforma LC3 II representa forma ativa da autofagia, GAPDH (37kDa) (linha intermédia) e Ponceau (linha inferior). Grupos: Controle (CT), Lesão (LE) e Laser (LA). Não houve diferença ($P < 0.05$) entre os grupos. A significância estatística foi determinada com ANOVA de uma via seguido pelo teste de Student-Newman Keuls.

Após 14 dias, a razão LC3II/LC3I/GAPDH foi 5,74 vezes maior ($P<0.05$) no Grupo Lesão quando comparado ao Grupo Controle. No Grupo Laser a razão diminuiu 27% em relação ao Grupo Lesão embora sem diferença significativa (Figura 6). Comparada ao Grupo Controle a razão foi 4.18 vezes maior no Grupo Laser($P<0.05$).

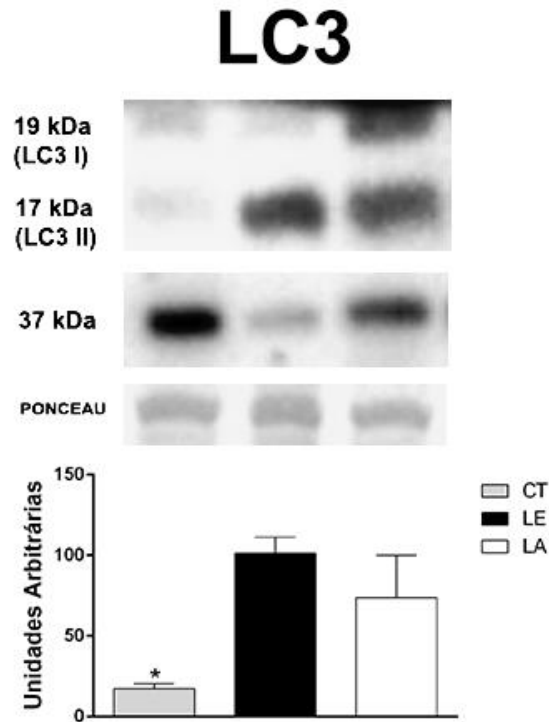


FIGURA 6. Razão LC3II/LC3I/GAPDH após 14 dias de desnervação. Os números indicados à esquerda representam os pesos moleculares (kDa) das correspondentes proteínas. Bandas da proteína LC3 (linha superior): Isoforma LC3 II representa forma ativa da autofagia, GAPDH (37kDa) (linha intermédia) e Ponceau (linha inferior). Grupos: Controle (CT), Lesão (LE) e Laser (LA). * $P<0.05$ quando comparado CT com LE e com LA. A significância estatística foi determinada com ANOVA de uma via seguido pelo teste de Student-Newman Keuls.

4.2.2. Quantificação de Pontos Positivos à Imunomarcagem de LC3

Os resultados obtidos para os grupos de 5 e 14 dias foram compatíveis com aqueles obtidos pela técnica de immunoblotting. Aos 5 dias não houve diferença ($P < 0.05$) na média de pontos positivos entre os grupos Controle, Lesão e Laser (Figura 7).

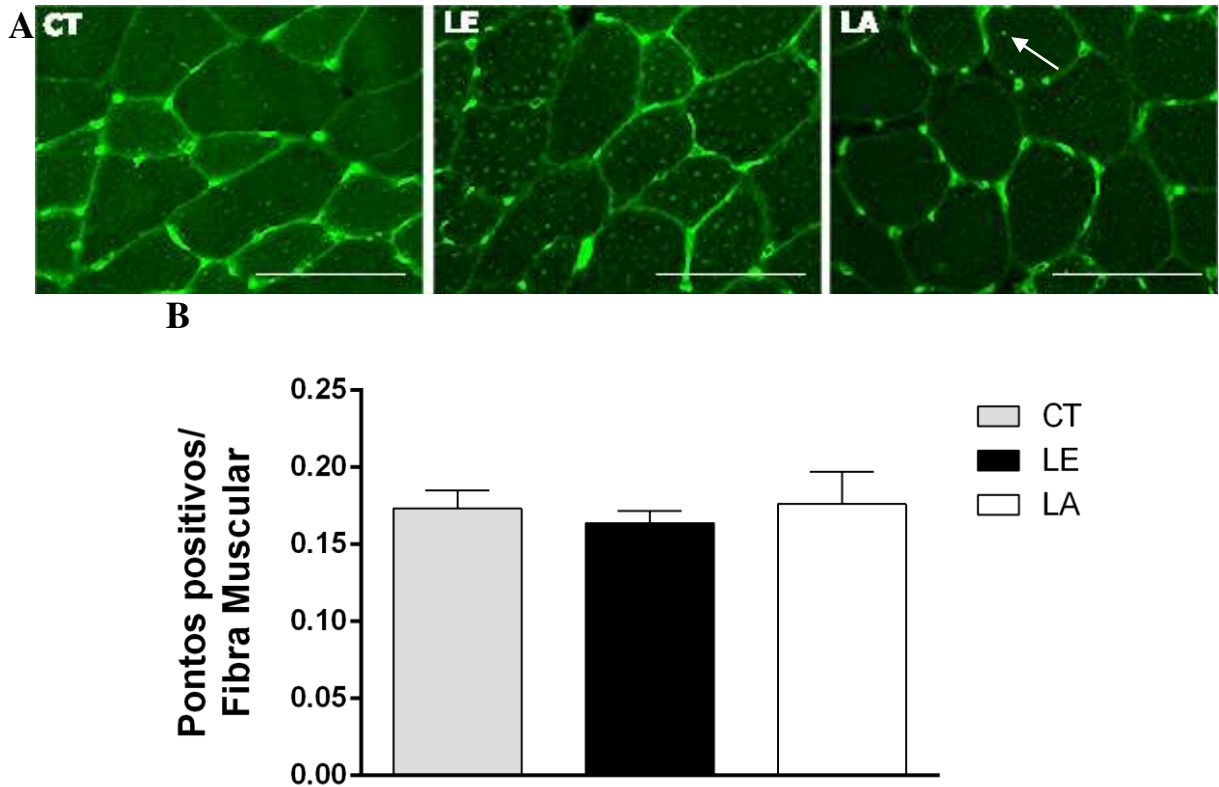


FIGURA 7. Número de pontos positivos marcados por anti LC3 após 5 dias de desnervação. (A) Secções transversais de fibras musculares. Notar a ocorrência de pontos positivos marcados por anti LC3 (seta). Grupos: Controle (CT), Lesão (LE) e Laser (LA). Barra: 100 μ m. (B) Média de pontos positivos por fibra muscular. Média $\pm$ desvio padrão. Não houve diferença ($P < 0.05$) entre os grupos. A significância estatística foi determinada com ANOVA de uma via seguido pelo teste de Student-Newman Keuls.

Após 14 dias, a média dos pontos positivos ao anti-LC3 foi 1,72 vezes maior ($P<0.05$) no Grupo Lesão quando comparado ao Grupo Controle. No Grupo Laser a média dos pontos positivos diminuiu 16% em relação ao Grupo Lesão embora não diferente. No Grupo Laser a média de pontos positivos foi 1,42 vezes maior que no Grupo Controle ($P<0.05$). (Figura 8).

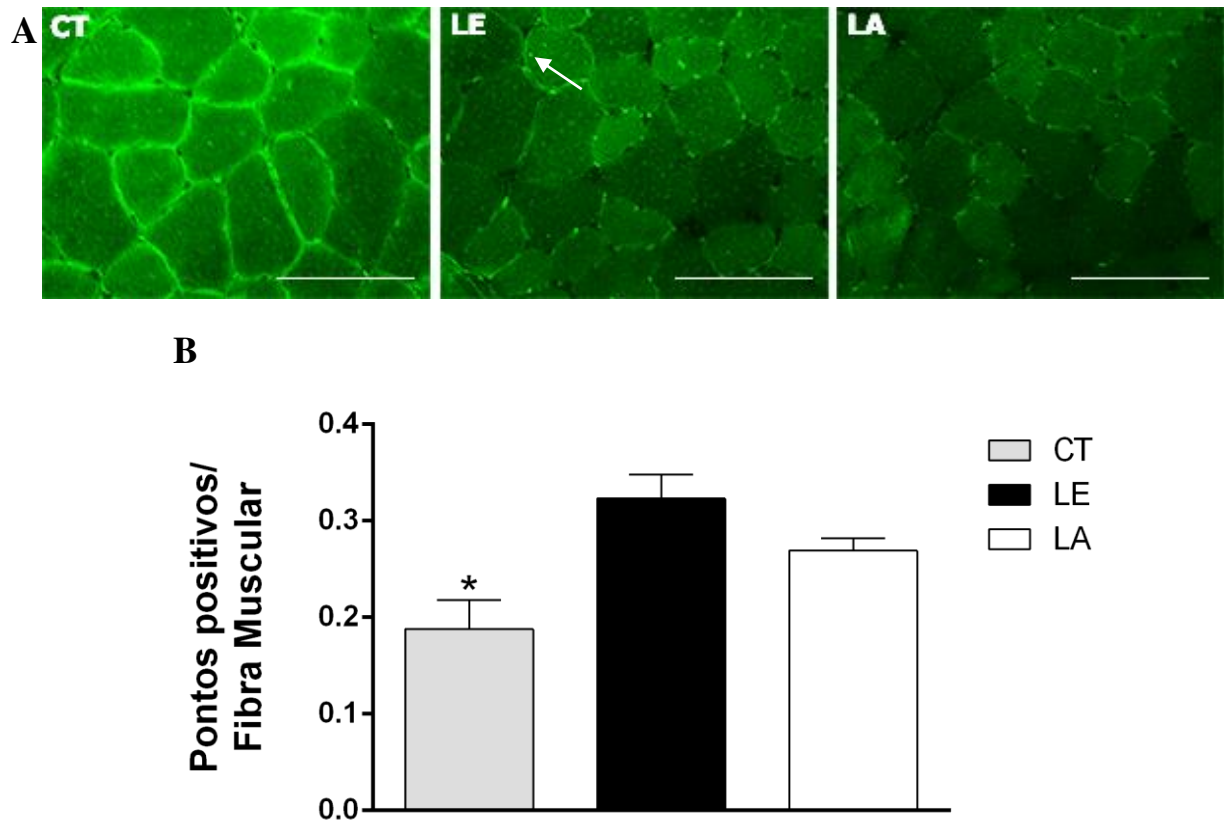


FIGURA 8. Número de pontos positivos marcados por anti LC3 após 14 dias de desnervação. (A) Secções transversais de fibras musculares. Notar a ocorrência de pontos positivos marcados por anti LC3 (*seta*). Grupos: Controle (CT), Lesão (LE) e Laser (LA). Barra: 100µm. **(B)** Média de pontos positivos por fibra muscular. Média $\pm$ desvio padrão. * $P<0.05$ quando comparado CT com LE e com LA. A significância estatística foi determinada com ANOVA de uma via seguido pelo teste de Student-Newman Keuls.

4.2.3. Ultraestrutura da Fibra Muscular

Não houve diferença nos aspectos ultraestruturais da fibra muscular entre o Grupo Lesão e Grupo Laser, exceto pelo fato de que no Grupo Lesão as mitocôndrias dispostas na região subsarcolemal encontravam-se, aparentemente em maior número. De outra forma, observou-se em ambos os grupos, mitocôndrias com estrutura compatíveis a normalidade: membrana dupla e cristas aparentes algumas vezes com pontos eletrodensos sugestivos de precipitados de cálcio (Figura 9). Elementos sugestivos de autofagia foram identificados no grupo Lesão (Figura 10).

Outros aspectos ultraestruturais como retículo sarcoplasmático, túbulos T, núcleos e nucléolos apresentaram-se compatíveis com a normalidade em ambos os grupos.

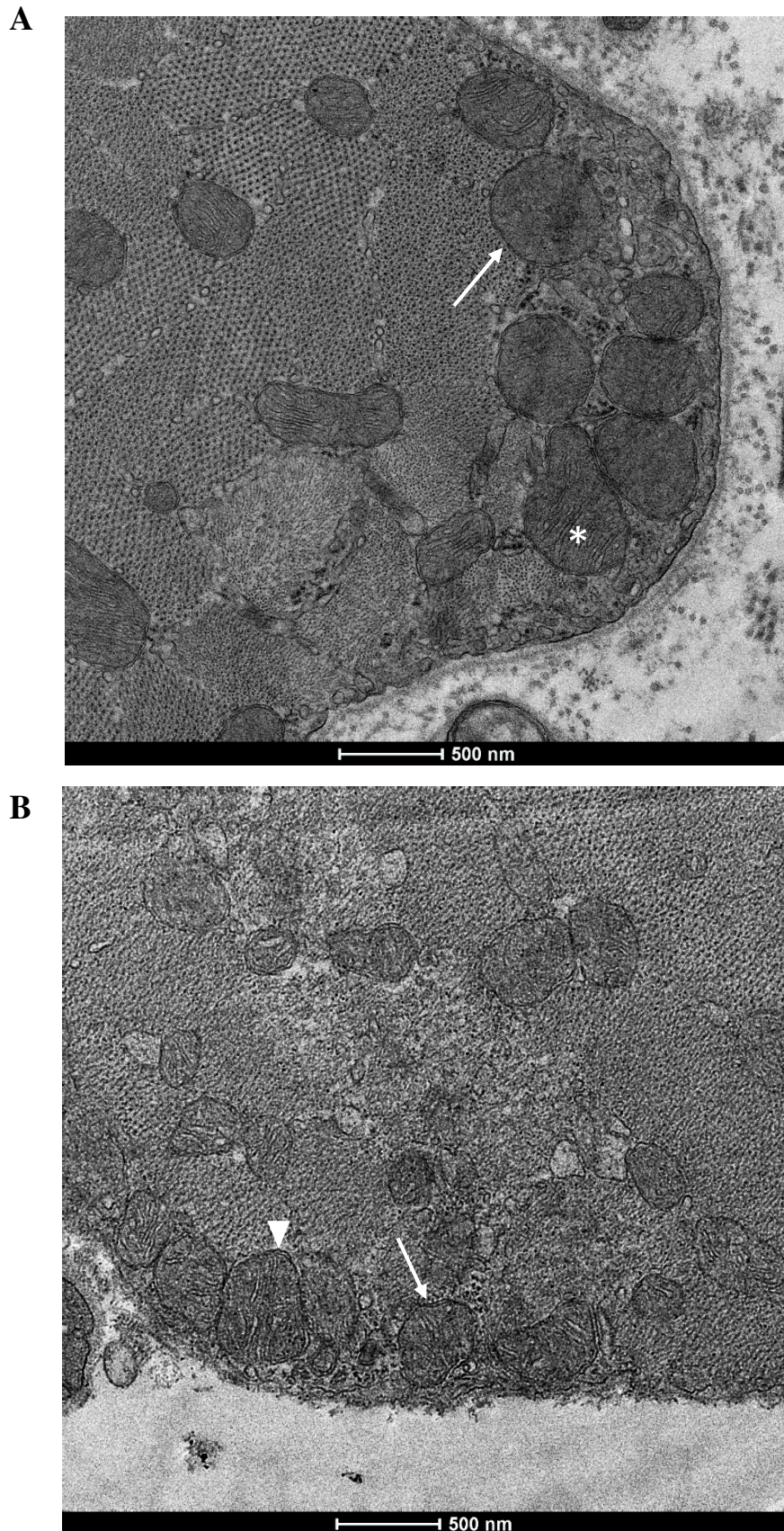


FIGURA 9. Ultraestrutura da fibra muscular desnervada. Secções transversais de fibra muscular após 14 dias de desnervação. Notar a ocorrência de mitocôndrias de aspectos normais dispostas na região subsarcolemal (*setas*). Notar dupla membrana externa (*cabeça de seta*) e cristas mitocondriais (*asterisco*). (A) Grupo Lesão e (B) Grupo Laser.

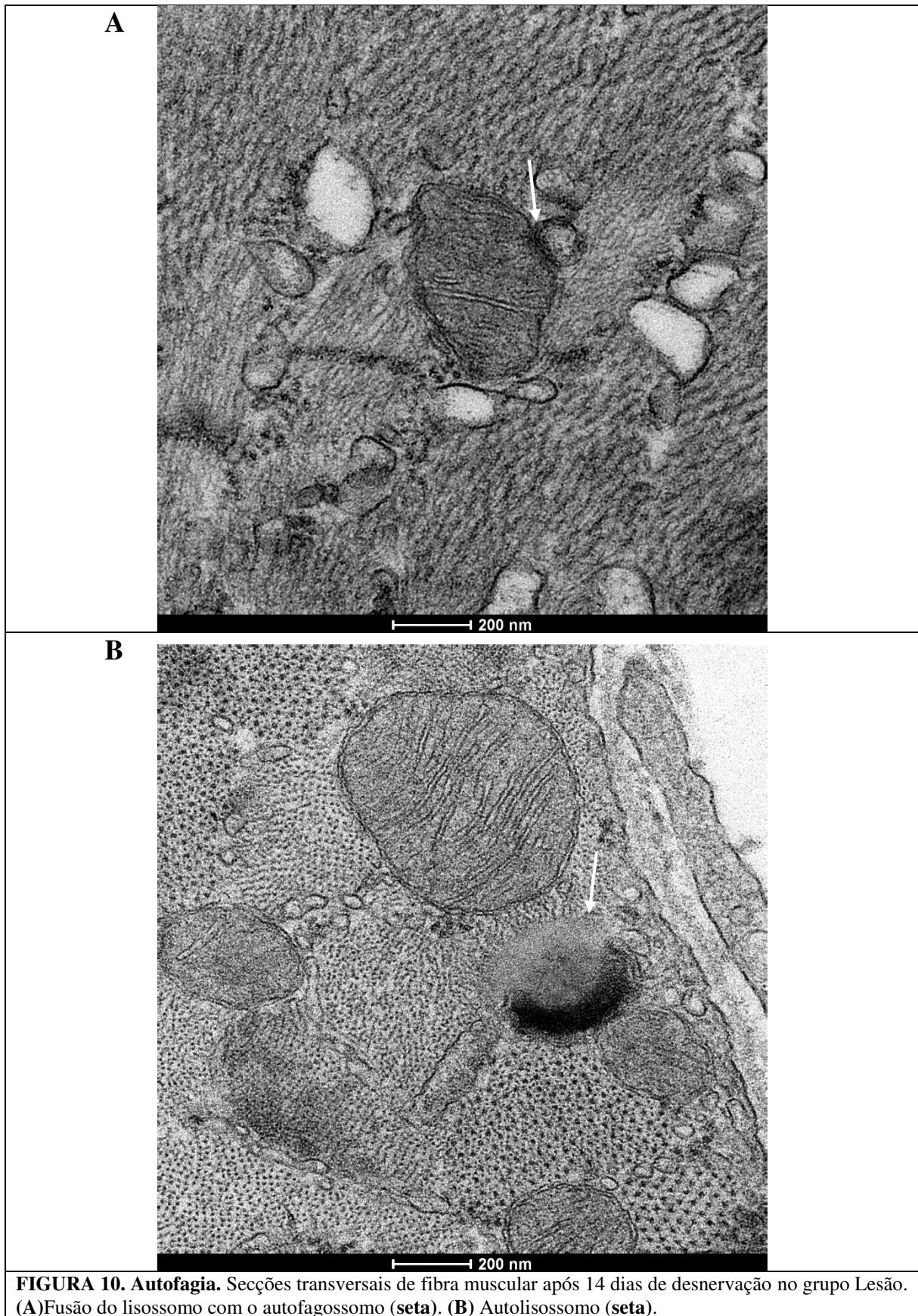


FIGURA 10. Autofagia. Secções transversais de fibra muscular após 14 dias de desnervação no grupo Lesão. (A) Fusão do lisossomo com o autofagossomo (**seta**). (B) Autolisossomo (**seta**).

5. DISCUSSÃO

5.1. Sobre o Protocolo

Em estudos relacionados à aplicação de laser é comum se deparar com aspecto de limitação dos resultados. Assim sendo, a conclusão do estudo não deve ser vista incondicionalmente e algumas considerações devem ser feitas.

Sobretudo é necessário considerar o protocolo aplicado. Entende-se por isto variações na dosagem, tempo de aplicação, comprimento de onda, etc. Este fato é de relevância, pois é bem conhecido o fato de que repostas biológicas variam amplamente dependendo desses parâmetros. Cite-se, por exemplo, o caso da miogenina, uma molécula relacionada com a regeneração muscular, cuja expressão foi suprimida pela LTBI quando aplicada com comprimento de onda 660nm, potência de 20 mW e 50 mW; e energia total de 0.4 J e 0.2 J (RODRIGUES et al., 2013). Com respostas opostas, Assis e colaboradores (2013) notaram o aumento da expressão da miogenina quando a LTBI foi aplicada com comprimento de onda de 780nm, potência de saída de 30 mW e energia total de 1.4J.

Neste estudo, a escolha do comprimento de onda (830 nm) utilizado baseia-se no fato de que o mesmo é eficiente para alcançar grupos musculares como tibial anterior, gastrocnêmio e quadríceps em animais de laboratório conforme observado em diversos estudos anteriores (NAKANO et al., 2009; MACEDO et al., 2012; VATANSEVER et al., 2012; ASSIS et al., 2013; RODRIGUES et al., 2013; MANTINEO; PINHEIRO; MORGADO, 2014; MACEDO et al., 2015). Por sua vez o tempo (14 dias) e frequência de tratamento (aplicação diária) adotado neste estudo baseou-se no estudo de Nakano e colaboradores (2009), salienta-se que esses autores também examinaram atrofia muscular. A escolha da densidade de energia (4 J/cm²), por sua vez, baseou-se no estudo de Macedo e colaboradores (2012), no qual foi avaliado a regeneração muscular em tibial anterior de ratos idosos.

5.2. Sobre os Resultados Propriamente Ditos

A capacidade da LTBI em prevenir a atrofia muscular já foi observada em situações em que a atrofia foi induzida por microgravidade (MONICI et al., 2013), desuso (NAKANO et al., 2009) e por modelos de isquemia seguidas por reperfusão sanguínea (LAKYOVA et al., 2010). O presente estudo mostra, pela primeira vez, que a atrofia por desnervação pode ser atenuada pela LTBI.

Um fato que merece destaque diz respeito ao efeito antiatrófico da LTBI aos 5 e 14 dias pós desnervação. No primeiro deles, a área de secção transversal do grupo Lesão foi 34% menor que a do músculo em que o nervo foi seccionado e recebeu tratamento ao passo que no segundo esse percentual foi de 23%. Aos 5 dias, a recuperação da área de secção transversal das fibras musculares foi completa, pois não há diferença significativa entre o Grupo Controle e o Laser ($1699,66 \pm 89,00 \mu\text{m}^2$ vs $1661,66 \pm 139,66 \mu\text{m}^2$). Enquanto que aos 14 dias, a área de secção transversal das fibras musculares não foi completamente recuperada pela LTBI (Controle $1559,26 \pm 72,31 \mu\text{m}^2$ vs Laser $1067,14 \pm 46,85 \mu\text{m}^2$, $P < 0.001$).

Parece-nos evidente que o efeito benéfico da LTBI vai se perdendo com o decorrer do tempo e nos parece que a fase mais aguda da desnervação é mais sensível ao efeito do LTBI. Isto nos faz admitir que a possibilidade de que a manipulação dos eventos moleculares e celulares da fase aguda da desnervação são essenciais para atenuar a atrofia. Este fato é compatível com estudos anteriores mostrando que a expressão de fatores relacionados a remodelação, adaptação e homeostasia muscular foram expressos com maior intensidade no início da desnervação. Cite-se, como exemplo disto a expressão da MyoD, miogenina e MFR4 que está aumentada entre 8 horas e 3 dias pós lesão. Além disto, há entre o primeiro e o terceiro dia pós desnervação aumento de expressão dos receptores nicotínicos de acetilcolina (WU et al., 2014).

Um mecanismo provável que explica o efeito antiatrófico da LTBI estaria relacionado a sua ação sobre a síntese proteica das fibras musculares. A atrofia se instala quando a proteólise excede os processos de síntese proteica (FANZANI et al., 2012). Considerando-se que as mitocôndrias representam a principal fonte de energia para a fibra muscular é de se esperar que as mesmas estejam envolvidas no processo de atrofia muscular.

De fato, em fibras musculares atroficas a rede mitocondrial sofre acentuada modificação (MAIURI et al., 2007; FANZANI et al., 2012). Na célula, o principal cromóforo capaz de absorver a luz emitida pela LTBI é o citocromo c oxidase na cadeia respiratória da mitocôndria (KARU, 1989). Há também evidências de que a LTBI produz alterações no potencial global redox da célula, modulando a produção de espécie reativas de oxigênio, que por sua vez induz a ativação de numerosas vias de sinalização intracelular, como por exemplo, a síntese de ácidos nucleicos e proteínas (SHEFER et al., 2003; HAMBLIN; DEMIDOVA, 2006; CHUNG et al., 2012; FARIVAR; MALEKSHAHABI; SHIARI, 2014). Assim a LTBI resultaria em estimulação da síntese de proteínas sarcoméricas prevenindo a atrofia. Outro mecanismo é que LTBI diminuiria a proteólise uma vez que há evidências de que a mesma inibe a expressão de MuRF1, responsável pela degradação proteica (FERRARESI; HAMBLIN;

PARIZOTTO, 2012). Portanto não podemos descartar que o efeito antiatrófico seria decorrente desses mecanismos.

Além do acima descrito, o efeito antiatrófico da LTBI poderia ser explicado por outros mecanismos como: i) a ativação das células satélites, ii) expressão de fatores de crescimento e angiogênese (NAKANO et al., 2009), iii) redução da apoptose (LAKYOVA et al., 2010) e iv) aumento da atividade da proteína serina/treonina fosfatases (MONICI et al., 2013). Contudo, é nosso entendimento que alguns fatos poderiam limitar a aceitação desses mecanismos. Por exemplo, discute-se ainda o quanto a apoptose estaria de fato envolvida na atrofia muscular por desnervação (DUPONT-VERSTEEGDEN, 2006; FANZANI et al., 2012). Além disto, é bem sabido que a ativação de células satélites participa da formação de novas fibras sem contribuir para adição de proteínas nas fibras atroficas já existentes.

Neste estudo examinamos, pela primeira vez, se a prevenção da atrofia estaria relacionada à influência da LTBI na autofagia. Isto baseia-se no fato de que: o fluxo autofágico mais precisamente a degradação lisossomal está aumentada na atrofia contribuindo para a degradação de proteínas no músculo desnervado (SCHIAFFINO; HANZLIKOVA, 1972), e que a LTBI atenua a atrofia muscular em outros modelos experimentais (NAKANO et al., 2009; LAKYOVA et al., 2010; MONICI et al., 2013). Além disto, há um estudo mostrando que a LTBI modula a expressão de genes autofágicos em modelo experimental de mucosite (BOSTANCIKLIOGLU et al., 2015).

A autofagia foi avaliada através da quantificação da razão entre a proteína LC3-II e LC3-I. Este procedimento vem sendo empregado em estudos dessa natureza e baseia-se no fato de que durante a formação das vesículas autofágicas a proteína LC3-I é clivada e conjugada pela fosfatidiletanolamina transformando-se em LC3-II. Portanto, o aumento da razão indica aumento na formação vesicular (ZHAO et al., 2007).

Note-se que aos 5 dias após a desnervação a razão LC3-II/ LC3-I não foi diferente entre os músculos dos três grupos experimentais (Figura 5). Este fato indica que nesse período não houve alteração na formação de vesículas autofágicas. Esse resultado está em conformidade com um estudo anterior no qual a autofagia não sofreu alteração nos 0, 3 e 7 dias após a desnervação (RIZZATO, 2014). Portanto, é possível que a atenuação da atrofia pela LTBI, nesse período tenha ocorrido através de outros mecanismos que não aquele relacionado à formação de vesículas, como por exemplo, influência sobre a síntese proteica e proteólise.

Note-se também o aumento significativo (5.74 vezes) na razão LC3-II/ LC3-I entre os músculos do Grupo Controle e aqueles que mantiveram-se desnervados por 14 dias. Isto indica que nesse período houve aumento da formação de vesículas autofágicas. De outro lado,

não houve alteração significativa na razão LC3-II/ LC3-I do Grupo Laser quando comparado ao Grupo Lesão, embora observamos uma tendência de diminuição da mesma (27%). Assim, nos parece que a prevenção da atrofia, no protocolo aqui adotado, não está associada aos efeitos da LTBI sobre a autofagia.

Os resultados advindos da técnica immunoblotting a respeito da autofagia e acima discutidos foram corroborados com nossas observações pela imunofluorescência conforme nota-se nas figuras 7 e 8.

Interessante também mencionar que, embora não tenha aspecto quantitativo, a análise da ultraestrutura demonstrou que o laser não provocou lesão das fibras musculares. Além disto, o fato de aparentemente as mitocôndrias estarem dispostas na região subsarcolemal do Grupo Lesão está de acordo com a literatura, embora não se encontre explicações definitivas para esses achados (CARLSON, 2014).

O acima exposto permite-nos propor a possibilidade de que a LTBI seja empregada como um método adjuntivo à eletroestimulação, o padrão ouro no tratamento da atrofia por desnervação. Esta proposição baseia-se em dois pontos. O primeiro diz respeito a factibilidade do emprego da LTBI por parte dos pacientes. Trata-se de um procedimento indolor, fácil manuseio e, portanto possível de ser efetuado pelo próprio paciente. Caberia também em casos em que a eletroestimulação está contra indicada, como em pacientes com lesões nervosas, porém que apresentam lesões cutâneas abertas. Segundo, isto pode ser vantajoso sob o ponto de vista biológico: é possível que os mecanismos moleculares e celulares através dos quais a LTBI atua na atenuação da atrofia sejam distintos daqueles resultantes da eletroestimulação. Sugere-se que a LTBI, como método adjuntivo à eletroestimulação, poderia ser vantajosa em relação a monoterapia pela eletroestimulação, no tratamento da atrofia por desnervação.

6. CONCLUSÃO

Neste estudo a LTBI, atenuou a atrofia induzida por desnervação em músculo tibial anterior de camundongos adultos jovens, mas sem intervir no processo autofágico.

REFERÊNCIAS

ALON, G. Functional Electrical Stimulation (FES): Transforming Clinical Trials to Neuro-Rehabilitation Clinical Practice-A Forward Perspective. **Journal of Novel Physiotherapies**, v. 3, n. 5, p. 9, 2013.

ALVES, A. N. et al. Modulating effect of low level-laser therapy on fibrosis in the repair process of the tibialis anterior muscle in rats. **Lasers Med Sci**, v. 29, n. 2, p. 813-21, Mar 2014.

ASSIS, L. et al. Low-level laser therapy (808 nm) contributes to muscle regeneration and prevents fibrosis in rat tibialis anterior muscle after cryolesion. **Lasers Med Sci**, v. 28, n. 3, p. 947-55, May 2013.

BÉLANGER, A. **Recursos fisioterapêuticos: evidências que fundamentam a prática clínica**. Barueri, SP: Manole, 2^a ed., p.524, 2012.

BONALDO, P.; SANDRI, M. Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. **Dis Model Mech**, v. 6, n. 1, p. 25-39, Jan 2013.

BOSTANCIKLIOGLU, M. et al. Assessment of the effect of laser irradiations at different wavelengths (660, 810, 980, and 1064 nm) on autophagy in a rat model of mucositis. **Lasers Med Sci**, v. 30, n. 4, p. 1289-95, May 2015.

BRUNELLI, R. M. et al. The effects of 780-nm low-level laser therapy on muscle healing process after cryolesion. **Lasers Med Sci**, v. 29, n. 1, p. 91-6, Jan 2014.

BUBLITZ, C. et al. Acute effects of low-level laser therapy irradiation on blood lactate and muscle fatigue perception in hospitalized patients with heart failure-a pilot study. **Lasers Med Sci**, v. 31, n. 6, p. 1203-9, Aug 2016.

CALURA, E. et al. Meta-analysis of expression signatures of muscle atrophy: gene interaction networks in early and late stages. **BMC Genomics**, v. 9, p. 630, Dec 23 2008.

CARLSON, B. M. The Biology of Long-Term Denervated Skeletal Muscle. **Eur J Transl Myol**, v. 24, n. 1, p. 3293, Mar 31 2014.

CHUNG, H. et al. The nuts and bolts of low-level laser (light) therapy. **Ann Biomed Eng**, v. 40, n. 2, p. 516-33, Feb 2012.

CISTERNA, B. A.; CARDOZO, C.; SAEZ, J. C. Neuronal involvement in muscular atrophy. **Front Cell Neurosci**, v. 8, p. 405, 2014.

CURY, V. et al. Low level laser therapy increases angiogenesis in a model of ischemic skin flap in rats mediated by VEGF, HIF-1alpha and MMP-2. **J Photochem Photobiol B**, v. 125, p. 164-70, Aug 5 2013.

DE ALMEIDA, P. et al. Low-level laser therapy and sodium diclofenac in acute inflammatory response induced by skeletal muscle trauma: effects in muscle morphology and mRNA gene expression of inflammatory markers. **Photochem Photobiol**, v. 89, n. 2, p. 501-7, Mar-Apr 2013.

DE ALMEIDA, P. et al. What is the best treatment to decrease pro-inflammatory cytokine release in acute skeletal muscle injury induced by trauma in rats: low-level laser therapy, diclofenac, or cryotherapy? **Lasers Med Sci**, v. 29, n. 2, p. 653-8, Mar 2014.

DE BRITO VIEIRA, W. H. et al. Use of low-level laser therapy (808 nm) to muscle fatigue resistance: a randomized double-blind crossover trial. **Photomed Laser Surg**, v. 32, n. 12, p. 678-85, Dec 2014.

DE FREITAS, L. F.; HAMBLIN, M. R. Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy. **IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics**, v. 22, n. 3, p. 1-17, 2016.

DE SOUZA, T. O. et al. Phototherapy with low-level laser affects the remodeling of types I and III collagen in skeletal muscle repair. **Lasers Med Sci**, v. 26, n. 6, p. 803-14, Nov 2011.

DUPONT-VERSTEEGDEN, E. E. Apoptosis in skeletal muscle and its relevance to atrophy. **World J Gastroenterol**, v. 12, n. 46, p. 7463-6, Dec 14 2006.

FANZANI, A. et al. Molecular and cellular mechanisms of skeletal muscle atrophy: an update. **J Cachexia Sarcopenia Muscle**, v. 3, n. 3, p. 163-79, Sep 2012.

FARIVAR, S.; MALEKSHAHABI, T.; SHIARI, R. Biological effects of low level laser therapy. **J Lasers Med Sci**, v. 5, n. 2, p. 58-62, Spring 2014.

FERRARESI, C. et al. Light-emitting diode therapy (LEDT) before matches prevents increase in creatine kinase with a light dose response in volleyball players. **Lasers Med Sci**, v. 30, n. 4, p. 1281-7, May 2015.

FERRARESI, C.; HAMBLIN, M. R.; PARIZOTTO, N. A. Low-level laser (light) therapy (LLLT) on muscle tissue: performance, fatigue and repair benefited by the power of light. **Photonics Lasers Med**, v. 1, n. 4, p. 267-286, Nov 1 2012.

FRONTERA, W. R.; OCHALA, J. Skeletal muscle: a brief review of structure and function. **Calcif Tissue Int**, v. 96, n. 3, p. 183-95, Mar 2015.

HAMBLIN, M. R.; DEMIDOVA, T. N. Mechanisms of low level light therapy. *Biomedical Optics* 2006, 2006. International Society for Optics and Photonics. p.614001-614001-12.

HOU, J. F. et al. In vitro effects of low-level laser irradiation for bone marrow mesenchymal stem cells: proliferation, growth factors secretion and myogenic differentiation. **Lasers Surg Med**, v. 40, n. 10, p. 726-33, Dec 2008.

HUANG, Y. Y. et al. Biphasic dose response in low level light therapy - an update. **Dose Response**, v. 9, n. 4, p. 602-18, 2011.

JOASSARD, O. R. et al. HuR Mediates Changes in the Stability of AChR beta-Subunit mRNAs after Skeletal Muscle Denervation. **J Neurosci**, v. 35, n. 31, p. 10949-62, Aug 5 2015.

KARU, T. Photobiology of low-power laser effects. **Health Phys**, v. 56, n. 5, p. 691-704, May 1989.

KARU, T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. **J Photochem Photobiol B**, v. 49, n. 1, p. 1-17, Mar 1999.

KHALIGHI, H. R. et al. Low Level Laser Therapy Versus Pharmacotherapy in Improving Myofascial Pain Disorder Syndrome. **J Lasers Med Sci**, v. 7, n. 1, p. 45-50, Winter 2016.

KITCHEN, S. **Eletroterapia: Prática baseada em evidências**. Barueri, SP: Manole, 11ª ed., p.360, 2003.

KLEPPNER, D. **Relendo Einstein sobre radiação**. Revista Brasileira de Ensino de Física, 27:87-91, 2004.

KLIONSKY, D. J. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 8, n. 11, p. 931-7, Nov 2007.

KOUYOUMDJIAN, J. A. Peripheral nerve injuries: a retrospective survey of 456 cases. **Muscle Nerve**, v. 34, n. 6, p. 785-8, Dec 2006.

LAKYOVA, L. et al. Low-level laser therapy for protection against skeletal muscle damage after ischemia-reperfusion injury in rat hindlimbs. **Lasers Surg Med**, v. 42, n. 9, p. 665-72, Nov 2010.

MACEDO, A. B. 2012. **Avaliação da regeneração muscular em animais idosos após tratamento com ultrassom e laser de baixa intensidade**. Dissertação (Mestrado em Fisioterapia). Faculdade de ciências da saúde - Universidade metodista de Piracicaba, 2012.

MACEDO, A. B. et al. Low-Level Laser Therapy (LLLT) in Dystrophin-Deficient Muscle Cells: Effects on Regeneration Capacity, Inflammation Response and Oxidative Stress. **PLoS One**, v. 10, n. 6, p. e0128567, 2015.

MAIURI, M. C. et al. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 8, n. 9, p. 741-52, Sep 2007.

MANTINEO, M.; PINHEIRO, J. P.; MORGADO, A. M. Low-level laser therapy on skeletal muscle inflammation: evaluation of irradiation parameters. **J Biomed Opt**, v. 19, n. 9, p. 98002, Sep 2014.

MARCOLINO, A. M. et al. Assessment of functional recovery of sciatic nerve in rats submitted to low-level laser therapy with different fluences. An experimental study: laser in functional recovery in rats. **J Hand Microsurg**, v. 5, n. 2, p. 49-53, Dec 2013.

MASIERO, E. et al. Autophagy is required to maintain muscle mass. **Cell Metab**, v. 10, n. 6, p. 507-15, Dec 2009.

MESTER, E. et al. The effect of laser irradiation on the regeneration of muscle fibers (preliminary report). **Z ExpChir**, v. 8, n. 4, p. 258-62, 1975.

MESTER, E.; MESTER, A. F.; MESTER, A. The biomedical effects of laser application. **Lasers Surg Med**, v. 5, n. 1, p. 31-9, 1985.

MIRANDA, E. F. et al. Acute effects of light emitting diodes therapy (LEDT) in muscle function during isometric exercise in patients with chronic obstructive pulmonary disease: preliminary results of a randomized controlled trial. **Lasers Med Sci**, v. 29, n. 1, p. 359-65, Jan 2014.

MIZUSHIMA, N. et al. In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. **Mol Biol Cell**, v. 15, n. 3, p. 1101-11, Mar 2004.

MIZUSHIMA, N.; YOSHIMORI, T.; LEVINE, B. Methods in mammalian autophagy research. **Cell**, v. 140, n. 3, p. 313-26, Feb 5 2010.

MONICI, M. et al. Effect of IR Laser on Myoblasts: Prospects of Application for Counteracting Microgravity-Induced Muscle Atrophy. **Microgravity science and technology**, v. 25, n. 1, p. 35-42, 2013.

NAKANO, J. et al. Low-level laser irradiation promotes the recovery of atrophied gastrocnemius skeletal muscle in rats. **Exp Physiol**, v. 94, n. 9, p. 1005-15, Sep 2009.

NEEL, B. A.; LIN, Y.; PESSIN, J. E. Skeletal muscle autophagy: a new metabolic regulator. **Trends Endocrinol Metab**, v. 24, n. 12, p. 635-43, Dec 2013.

PAGLIN, S. et al. A novel response of cancer cells to radiation involves autophagy and formation of acidic vesicles. **Cancer Res**, v. 61, n. 2, p. 439-44, Jan 15 2001.

PAGLIN, S.; YAHALOM, J. Pathways that regulate autophagy and their role in mediating tumor response to treatment. **Autophagy**, v. 2, n. 4, p. 291-293, 2006.

RABEN, N. et al. Suppression of autophagy in skeletal muscle uncovers the accumulation of ubiquitinated proteins and their potential role in muscle damage in Pompe disease. **Hum Mol Genet**, v. 17, n. 24, p. 3897-908, Dec 15 2008.

RIBEIRO, B. G. et al. The effect of low-level laser therapy (LLLT) applied prior to muscle injury. **Lasers Surg Med**, Jul 6 2015.

RIZZATO, V. R. **Envolvimento da neuraminidase-1 na atrofia muscular**. 2014. Dissertação (Mestrado em Neurologia). Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo, São Paulo.

ROCHKIND, S. Phototherapy in peripheral nerve regeneration: From basic science to clinical study. **Neurosurg Focus**, v. 26, n. 2, p. E8, Feb 2009.

RODRIGUES, N. C. et al. Low-level laser therapy (LLLT) (660nm) alters gene expression during muscle healing in rats. **J Photochem Photobiol B**, v. 120, p. 29-35, Mar 5 2013.

SACHECK, J. M. et al. Rapid disuse and denervation atrophy involve transcriptional changes similar to those of muscle wasting during systemic diseases. **FASEB J**, v. 21, n. 1, p. 140-55, Jan 2007.

SANTOS, L. A. et al. Effects of pre-irradiation of low-level laser therapy with different doses and wavelengths in skeletal muscle performance, fatigue, and skeletal muscle damage induced by tetanic contractions in rats. **Lasers Med Sci**, v. 29, n. 5, p. 1617-26, Sep 2014.

SANTOS, M. T. et al. Evaluation of low-level laser therapy in the treatment of masticatory muscles spasticity in children with cerebral palsy. **J Biomed Opt**, v. 21, n. 2, p. 28001, Feb 2016.

SCHIAFFINO, S. et al. Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. **FEBS J**, v. 280, n. 17, p. 4294-314, Sep 2013.

SCHIAFFINO, S.; HANZLIKOVÁ, V. Studies on the effect of denervation in developing muscle. II. The lysosomal system. **J Ultrastruct Res**, v. 39, n. 1, p. 1-14, Apr 1972.

SHEFER, G. et al. Low-energy laser irradiation enhances de novo protein synthesis via its effects on translation-regulatory proteins in skeletal muscle myoblasts. **Biochim Biophys Acta**, v. 1593, n. 2-3, p. 131-9, Feb 17 2003.

SILVEIRA, P. C. et al. Low-level laser therapy attenuates the acute inflammatory response induced by muscle traumatic injury. **Free Radic Res**, v. 50, n. 5, p. 503-13, 2016.

TOMA, R. L. et al. Low level laser therapy associated with a strength training program on muscle performance in elderly women: a randomized double blind control study. **Lasers Med Sci**, v. 31, n. 6, p. 1219-29, Aug 2016.

VATANSEVER, F. et al. Low intensity laser therapy accelerates muscle regeneration in aged rats. **Photonics Lasers Med**, v. 1, n. 4, p. 287-297, Oct 1 2012.

WANG, C. Z. et al. Low-level laser irradiation improves functional recovery and nerve regeneration in sciatic nerve crush rat injury model. **PLoS One**, v. 9, n. 8, p. e103348, 2014.

WU, P. et al. Key changes in denervated muscles and their impact on regeneration and reinnervation. **Neural Regen Res**, v. 9, n. 20, p. 1796-809, Oct 15 2014.

XIE, Z.; KLIONSKY, D. J. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. **Nat Cell Biol**, v. 9, n. 10, p. 1102-9, Oct 2007.

ZHAO, J. et al. FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells. **Cell Metab**, v. 6, n. 6, p. 472-83, Dec 2007.

ANEXO A - Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais

CEUA/Unicamp

**Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp****CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto "**Efeito do laser de baixa intensidade sobre a autofagia em fibras musculares atroficas**" (protocolo nº **3805-1**), sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Humberto Santo Neto / Jéssica Silva Ferreira**, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA, SISBIO** ou **CIBio**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em **09 de abril de 2015**.

Campinas, 09 de abril de 2015.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Alexandre".

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira
Presidente

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Fátima Alonso".

Fátima Alonso
Secretária Executiva

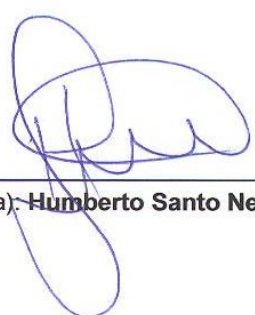
ANEXO B - Declaração de que a tese não infringe os dispositivos da lei nº 9610/98, nem o direito autoral de qualquer editora

Profa. Dra. Rachel Meneguello
Presidente
Comissão Central de Pós-Graduação
Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **"Efeito do laser de baixa intensidade sobre a autofagia em fibras musculares atróficas"**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 06 de Dezembro de 2016

Assinatura : 
Nome do(a) autor(a): **Jéssica Silva Ferreira**
RG n.º 45.907.405-2

Assinatura : 
Nome do(a) orientador(a): **Humberto Santo Neto**
RG n.º 5308995