

GABRIEL BOGALHO NOGUEIRA

**EFEITO DO MELOXICAN E LASER DE BAIXA INTENSIDADE NA
TERAPÊUTICA DE LESÕES MUSCULARES INDUZIDAS EM
RATOS**

CAMPO GRANDE
2012

GABRIEL BOGALHO NOGUEIRA

**EFEITO DO MELOXICAN E LASER DE BAIXA INTENSIDADE NA
TERAPÊUTICA DE LESÕES MUSCULARES INDUZIDAS EM
RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. João Ricardo Filgueiras
Tognini

CAMPO GRANDE - MS

FOLHA DE APROVAÇÃO

GABRIEL BOGALHO NOGUEIRA

**EFEITO DO MELOXICAN E LASER DE BAIXA INTENSIDADE NA
TERAPÊUTICA DE LESÕES MUSCULARES INDUZIDAS EM
RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Resultado _____

Campo Grande (MS), _____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Doutor. João Ricardo Filgueiras Tognini

Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Profa. Doutora. Iandara Schettert Silva

Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Prof. Doutor. Baldomero Antônio Kato Silva

Instituição: Universidade Federal do Piauí

À Mônica Cruvinel, minha linda esposa, pelo amor, companheirismo, paciência e auxílio ao longo dos anos que estamos juntos.

Aos meus pais, Waleska e Márcio, pelo apoio, amor e terem me dado condições de realizar os meus sonhos.

Aos meus irmãos e à minha sobrinha.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. João Ricardo Filgueiras Tognini, Prof. Titular da FAMED/UFMS por ter me dado à honra de ser meu orientador, aos quais ficarão para sempre os seus ensinamentos técnicos mais principalmente o seu exemplo de humildade e confiança nas pessoas.

Ao Prof. Dr. Baldomero Antônio Kato da Silva, Prof. Dr. Do curso de Fisioterapia da Universidade Federal do Piauí, pela amizade e companheirismo durante a minha trajetória acadêmica

À Profa. Dra. Iandara Schettert Silva, docente do programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento da Região Centro-Oeste, pelos ensinamentos durante a realização do projeto.

À Profa. Dorothy Dourado, docente da Universidade Anhanguera/UNIDERP por toda a solicitude em auxiliar durante a elaboração do projeto.

À técnica de laboratório Maria Helena Fermiano da Anhanguera/UNIDERP por ter auxiliado na elaboração das lâminas histológicas.

As Biólogas do Biotério, Thelma Bazano e Ingrid Restell, que abriram as portas de seu local de trabalho e auxiliaram no manejo dos animais.

Ao Fisioterapeuta Renan Werny Garcia do Hospital Regional de Mato Grosso do Sul, por ter sido braço direito na execução do projeto.

A equipe de Fisioterapia Físio&Sport/CEFE, Filipe Abdalla, Mychael Cordeiro, Fabrizia Conceição, Wallace Prado e Lucas Vendas, grande amigos, me deram suporte durante minha ausência para a execução do projeto.

À Universidade Federal de Mato Grosso do Sul e ao Programa em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, pelo brilhante trabalho que vem sendo feito, permitindo que profissionais de nosso estado se capacitem sem a necessidade de ficarmos longe de nossos familiares e amigos.

**“Cada um de nós compõe a sua história
Cada ser em si
Carrega o dom de ser capaz
E ser feliz”**

(Almir Sater).

RESUMO

NOGUEIRA GB, Efeito do meloxicam e laser de baixa intensidade na terapêutica de lesões musculares induzidas em ratos. Campo Grande; 2012. [Dissertação-Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

Objetivo: Avaliar o efeito do laser, meloxicam e de ambos associados na colagenogênese dos tipos I e III na lesão muscular induzida por impacto em ratos em 3, 7 e 15 dias de avaliação. **Método:** utilizou-se no estudo 60 animais (*Rattus Norvegicus*), distribuídos em quatro grupos: Grupo lesão, grupo laser, grupo laser associado com meloxicam e grupo meloxicam. Os animais sofreram lesão muscular induzida por impacto, foram feitas análises aos 3, 7 e 15 dias pós-tratamento. Após estes períodos foi realizada eutanásia para posterior análise dos resultados. A análise histológica feita por meio de lâminas coradas com *Picrosirius Red* e o colágeno foi quantificado com o *software* CFC_image V.1.0. **Resultados:** A análise intra-grupos mostrou-se estatisticamente significativa apenas nos grupos lesão e grupo laser para o colágeno tipo I e tipo III. A análise inter-grupos mostrou-se estatisticamente significativa para o colágeno tipo I e tipo III apenas entre o grupo laser e meloxicam associado com laser aos 3 dias de análise. **Conclusão:** O colágeno tipo I e tipo III no grupo laser demonstrou comportamento diferente ao comparar com os outros grupos de tratamento. Para o colágeno tipo I ocorreu um aumento gradativo da proliferação ao longo dos dias. Para o colágeno tipo III ocorreu diminuição gradativa ao longo dos dias. A associação de laser e meloxicam e a aplicação de meloxicam apresentaram padrões semelhantes ao do grupo lesão. No que tange a proliferação de colágeno o grupo Laser demonstrou-se mais equilibrado, fato, este que pode diminuir o processo de formação de fibrose.

Descritores: Lesão muscular, Laser, ciclooxigenase 2, modalidades de Fisioterapia.

ABSTRACT

NOGUEIRA GB, The effect of meloxicam and low intensity laser in the therapy of muscle injury induced in mice. Campo Grande; 2012. [Essay – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

Objective: To assess the effect of laser, meloxicam and laser associated to meloxicam in the collagen genesis type I and III in muscle injury induced by impact on mice on 3rd, 7th and 15th days of evaluation. **Method:** 60 animals (*rattus Norvegicus*) were used in this study, divided in four groups: injury group, laser group, meloxicam group, and laser associated to meloxicam group. The animals had muscle injury induced by impact and evaluations were made on 3rd, 7th and 15th days post-treatment. After this period, the mice were euthanized for further analysis of the results. The histological analysis was carried out through slides stained with *Picrosirius Red* and the collagen was quantified with CFC_image V.1.0. software. **Results:** The intra-group analysis was statistically significant only in the injury group and laser group for collagen type I and type III. The inter-group analysis was statistically significant for collagen type I and type III only in the laser group and laser associated to meloxicam group on the 3rd day of assessment. **Conclusion:** Collagen type I and type III in the laser group presented different behavior when compared to other treatment groups. For collagen type I, there was a gradual increase in the proliferation through the days. For collagen type III, there was a gradual decrease through the days. The association of laser and meloxicam and the use of meloxicam presented similar patterns to the injury group. In relation to the proliferation of collagen, the laser group proved to be more balanced, and this may reduce the formation process of fibrosis.

Key words: muscle injury, laser, cyclooxygenases 2, physiotherapy modalities

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Seqüência temporal dos eventos durante a regeneração da fibra muscular após uma lesão..... 23

Tabela 2- média \pm desvio padrão da quantificação de colágeno nos grupos analisados. Campo Grande, MS, 2012. (n = 60)..... 41

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- Estrutura química Meloxicam.....	32
FIGURA 2- Disposição dos grupos quanto ao número de animais e tempo para eutanásia.....	35
FIGURA 3- Aplicação de carga para indução da lesão muscular.....	36
FIGURA 4- Equipamento Laser utilizado para irradiação.....	37
FIGURA 5- Aplicação de meloxicam.....	38
FIGURA 6- Imagem programaCFC_Image V.1.0. Pontos verdes colágeno tipo III. Pontos vermelhos colágeno tipo I.....	39
FIGURA 7- Comparação da quantificação de colágeno tipo I no grupo Lesão entre os vários momentos avaliados (Kruskal-Wallis; $p = 0,009$).....	41
FIGURA 8- Comparação da quantificação de colágeno tipo I no grupo Meloxicam entre os vários momentos avaliados (Kruskal-Wallis; $p = 0,7239$).....	42
FIGURA 9- Comparação da quantificação de colágeno tipo I no grupo Laser entre os vários momentos avaliados (ANOVA; $p = 0,0002$).....	43
FIGURA 10- Comparação da quantificação de colágeno tipo I no grupo Meloxicam + Laser entre os vários momentos avaliados (Kruskal-Wallis; $p = 0,3068$).....	43.
FIGURA 11- Comparação da quantificação de colágeno tipo III no grupo Lesão entre os vários momentos avaliados (Kruskal-Wallis; $p = 0,0091$).....	43
FIGURA 12- Figura 13: Comparação da quantificação de colágeno tipo III no grupo Meloxicam entre os vários momentos avaliados (Kruskal-Wallis; $p = 0,7239$).....	44
FIGURA 13- Comparação da quantificação de colágeno tipo III no grupo Laser entre os vários momentos avaliados (ANOVA; $p = 0,0001$).....	44
FIGURA 14- Comparação da quantificação de colágeno tipo III no grupo Meloxicam + Laser entre os vários momentos avaliados (Kruskal-Wallis; $p = 0,3693$).....	45
FIGURA 15- Comparação da quantificação de colágeno tipo I aos 3 dias de experimento entre os vários grupos avaliados (Kruskal-Wallis; $p = 0,0267$)..	45

FIGURA 16- Comparação da quantificação de colágeno tipo I aos 7 dias de experimento entre os vários grupos avaliados (Kruskal-Wallis; $p = 0,1312$)...	46
FIGURA 17- Comparação da quantificação de colágeno tipo I aos 15 dias de experimento entre os vários grupos avaliados (ANOVA; $p = 0,0445$).....	46
FIGURA 18- Variação do Colágeno Tipo I pelo tempo de avaliação de acordo com o grupo estudado.....	47
FIGURA 19- Comparação da quantificação de colágeno tipo III aos 3 dias de experimento entre os vários grupos avaliados (Kruskal-Wallis; $p = 0,0266$)..	47
FIGURA 20- Comparação da quantificação de colágeno tipo III aos 7 dias de experimento entre os vários grupos avaliados (Kruskal-Wallis; $p = 0,1309$)..	48
FIGURA 21- Comparação da quantificação de colágeno tipo III aos 15 dias de experimento entre os vários grupos avaliados (ANOVA; $p = 0,0459$).....	48
FIGURA 22- Variação do Colágeno Tipo III pelo tempo de avaliação de acordo com o grupo estudado.....	49
FIGURA 23- Imagens do grupo Lesão coradas com <i>Picrosirius Red</i> . Lente objetiva 40x com aumento de 400x.....	52
FIGURA 24- Imagens do grupo Laser coradas com <i>Picrosirius Red</i>	53
FIGURA 25- Imagens do grupo meloxicam coradas com <i>Picrosirius Red</i>	53
FIGURA 26- Imagens do grupo laser associado ao meloxicam coradas com <i>Picrosirius Red</i>	53
QUADRO 1 - Seqüência temporal dos eventos durante a regeneração da fibra muscular após uma lesão.....	24

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
LBI	Laser de Baixa Intensidade
LBP	Laser de Baixa Potência
MAPK	Proteína Quinase Ativada por Mitógenos
EPK	Sinal Regulador da Proteína Quinase
RNA _m	Ácido Ribonucléico Mensageiro
AINH	Antiinflamatório não Hormonal
AINE	Antiinflamatório não esteroide
TNF α	Fator de Necrose Tumoral alfa
FGF	Fator de Crescimento de Fibroblasto
FGF β	Fator de Crescimento de Transformação
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina seis
IGF 1	Fator de Crescimento 1
IGF2	Fator de Crescimento 2
MEC	Matriz extracelular
Kg	Kilogramas
Nm	Nanômetros
cm	centímetros
HeNe	Hélio Neônio
GaAs	Arsenieto de Gálio
GaAlAs	Arsenieto de Gálio e Alumínio
ATP	Adenosina Tri-Fosfato
NADPH	nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato-oxidase
ATPase	Catalisação da Adenosina Tri-Fosfato
J	Joules
J/cm ²	Joules por centímetro quadrado
CGPP	Gene Calcitonina
mW	miliwatt
COX	Ciclooxigenase
Mg	Miligramas

g	Gramas
InGaALP	Índio-Gálio-Alumínio e Fósforo
W/cm ²	Watt por centímetro quadrado
PVC	Policloreto de Polivinila
µm	Micrômetros

LISTA DE SÍMBOLOS

CO_2	Dióxido de Carbono
Ca^{2+}	Íons de Cálcio
O_2	Oxigênio
H_2O_2	Peróxido de Hidrogênio
NO	Oxido Nítrio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 Músculo Esquelético: Morfologia Normal	21
2.2 Lesão Muscular	22
2.3 Patobiologia da Lesão Muscular	23
2.4 Colágeno	25
2.5 Laser de Baixa Potência: Aspectos Físicos e interações com tecido biológico	26
2.6 Medicamentos Anti-inflamatórios	30
<u>2.6.1 Meloxicam</u>	31
<u>2.6.2 Estrutura Química</u>	32
<u>2.6.3 Mecanismo de Ação</u>	32
<u>2.6.4 Propriedades Farmacológicas</u>	33
3 OBJETIVO	34
4 MATERIAL E MÉTODO	35
4.1 Local e Período do Estudo	35
4.2 Seleção, Armazenagem e Pesagem dos Animais	35
4.3 Grupos Experimentais	35
4.4 Protocolo para produção da lesão experimental	36
4.4.1 Procedimento para produção da lesão experimental	37
4.5 Aplicação do Laser de Baixa Intensidade	38
4.5.1 Protocolo de estimulação por irradiação laser	38
4.6 Terapia com AINH	39
4.7 Eutanásia	39
4.8 Análise Histológica	40
4.9 Análise Estatística	41
5 RESULTADOS	42
6 DISCUSSÃO	54
7 CONCLUSÃO	60
8 REFERÊNCIAS	61

1 INTRODUÇÃO

O músculo esquelético é a maior estrutura que compõe o sistema orgânico do ser humano, sendo um importante tecido na homeostasia bioenergética, tanto em repouso como em exercício. Essa adaptabilidade é resultante da capacidade de funcionar com eficiência sobre ampla gama de condições, sendo de grande importância na sobrevivência das espécies (SENE, 2005).

Esta combinação de estruturas que consistem em células musculares, rede de nervos bem organizada, vasos sanguíneos e o tecido conectivo em sua matriz extracelular tornam-se necessária para a locomoção e estabilização articular (GARRET, 1994; HUARD, 2002).

O tecido conjuntivo presente no músculo cria um suporte mecânico que recebe a força contrátil de cada célula e promove a rigidez estrutural necessária à transmissão de tensão resultando em movimento articular e locomoção eficiente. Para tanto o colágeno presente no músculo interage estreitamente entre as células musculares realizando a organização muscular e provendo força de tensão. (PIEADADE, 2010).

Segundo Kettunen *et al.*(2001), o aumento da demanda de exercícios modernos e competitivos provocou o crescimento do risco de lesões, o que gera preocupações tanto para os praticantes de atividades físicas, quanto para treinadores e atletas de todas as esferas de rendimento, pois interrompem o processo evolutivo de adaptações sistemáticas impostas pelo treinamento.

As ocorrências das lesões desportivas, possivelmente, são resultado de exercícios realizados de maneira extenuante e, ainda, inadvertida ou inapropriada, sendo subestimadas a prevalência e incidência destes episódios devido à ausência de notificação em todo o universo esportivo, seja na iniciação das modalidades ou em altos níveis de performance (KETTUNEN *et al.* 2001; BENNELL *et al.* 1996).

A lesão muscular é um dos traumas mais comuns ocorridos na prática esportiva, com taxa de incidência entre 10 a 55% de todas as lesões ocorridas (JARVINEN *et al.* 2005). Grote *et al.* (2008), concluem que 42 % de sua

amostra de atletas nadadores de peito ficaram períodos no último ano sem treinar ou competir devido à lesões musculares.

Lesão nos músculos isquiotibiais tem sido relatada na literatura com uma incidência de 12% em jogadores de futebol (HAWKINS *et al.* 2001; ROLLS *et al.* 2004). Já Pastre *et al.* (2005), informaram que a incidência de lesões musculares é de 50,9% em atletas velocistas. Rizzi *et al.* (2006), relataram que 30% das lesões relacionadas ao esporte diagnosticadas pelos médicos possuem relações com o sistema muscular.

As lesões musculares podem ser causadas por dois mecanismos, os traumas diretos como contusões, lacerações e aqueles por traumas indiretos como isquemia, denervação e estiramentos. (JARVINEN *et al.* 2005, HUARD, 2002, RIZZI *et al.* 2006), Clebis e Natali (2001) definiram lesão muscular como qualquer alteração que promova uma disfunção do aparelho locomotor decorrente da prática esportiva.

O crescente aumento da inserção de indivíduos em diversas modalidades de atividade física, tanto em nível preventivo, curativo ou esportivo, gera o aparecimento das lesões esportivas musculoesqueléticas (HOOTMAN, 2002). Desta forma as lesões musculares tornaram-se objetos de estudos com a finalidade de buscar recuperação rápida, de qualidade e eficácia. (SENE, 2005).

Entretanto, ainda permanecem alguns questionamentos, especialmente em relação aos efeitos de vários tratamentos comumente utilizados para estimular o processo de reparo do músculo (AMARAL *et al.* 2001).

Segundo Sene (2005) o tratamento com laser de baixa intensidade (LBI) tem sido utilizado nos processos de regeneração dos tecidos tais como pele (MESTER *et al.* 1971, MESTER *et al.* 1985), tecido ósseo (YAAKOBI *et al.* 1996 e LUGER *et al.* 1998), sistema nervoso central e periférico (ROCHKIND e QUAKNINE, 1992 e VAN BREUGEL e BAR, 1993) e no sistema muscular (WEISS e ORON, 1992).

Lasers podem agir através da inibição ou estimulação das atividades bioquímicas, fisiológicas e proliferativas das células e tecidos. Seus efeitos nos tecidos biológicos dependem do tempo, da dosagem, da frequência e do comprimento de onda da irradiação utilizada e da frequência do tratamento.

Durante o atraso na diferenciação das células satélites causado pelo LBI, grande número dessas células satélites ativadas acumula-se na zona regenerativa e eventualmente fundem-se estimulando as fibras ou desenvolvendo mais precocemente fibras musculares neoformadas. O mecanismo pelo qual o LBI direciona este fenômeno é via ativação específica do mitogene ativado da proteína quinase (MAPK) e do sinal regulador da proteína quinase (EPK) (SHEFER *et al.* 2001).

Shefer *et al.* (2003) demonstraram que o LBI induz a síntese protéica por meio da modulação da atividade de enzimas-chave que regulam a translação de RNAm e a indução da fosforilação do receptor de tirosina quinase causada pela irradiação do laser, promovendo a proliferação celular.

Tendo em vista que a lesão muscular causa processo inflamatório, são utilizados amplamente na prática clínica os medicamentos antiinflamatórios não hormonais (AINH). Estima-se que um em cada sete americanos faz uso de um antiinflamatório. Devido ao amplo mecanismo de ação, os AINH são utilizados em diversas situações onde se busca controle da dor, febre e do processo inflamatório (TOGNINI,1999).

Essa classe de drogas tem sido tradicionalmente utilizada no tratamento da dor de origem ortopédica, inibindo a formação de prostaglandinas. O acesso do ácido araquidônico ao local lesado, onde se liga com a enzima ciclooxigenase, origina o desencadeamento de todos os processos dolorosos e inflamatórios. (ENGELHARDT,1996).

Dentre os AINH mais utilizados encontra-se o meloxicam, este medicamento pertence à família das enolcarboxamida com estrutura molecular C₁₄H₁₃N₃O₄S₂ e sua massa molecular é 351,4. (ENGELHARDT, 1996).

Segundo Jarvinen *et al.* (2005), o uso de AINH é indicado para causar uma diminuição da reação inflamatória, porém, sem gerar reações adversas no processo de reparo muscular. Shen *et al.* (2007), relataram o uso do AINH para o tratamento dos sintomas relacionados ao processo inflamatório.

Partindo da hipótese que o LBI apresenta resultados satisfatórios no tratamento das lesões através do aumento das atividades cicatriciais e que o uso de medicamento antiinflamatório não esteroideal está ligado diretamente à conduta clínica no tratamento de lesão muscular, porém gerando dúvidas sobre

sua interferência na reorganização de fibras colágenas induzidas pelo laser justificou-se a realização desse estudo.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Músculo Esquelético: Morfologia Normal

O músculo esquelético é o órgão efetor do movimento, tendo como sua principal característica a contratilidade. A função muscular adequada depende da atividade proprioceptiva intacta, inervação motora, carga mecânica e mobilidade articular (HUIJING, 1998).

O tecido muscular representa a maior massa de tecido na estrutura corporal, constituindo 40% a 45% do peso total do corpo. É um composto estrutural que consiste em células musculares, redes organizadas de nervos e vasos sanguíneos, tecido conectivo e matriz extracelular. Esta estrutura é necessária tanto para produzir movimento articular e dar condições para que o processo de regeneração ocorra após a lesão (HUARD *et al.* 2002).

Segundo Powers e Howley (2000) os músculos esqueléticos apresentam três funções: produzir força para a locomoção e respiração, força para a sustentação da postura (tônus muscular) e produção de calor durante a exposição ao frio.

Os músculos esqueléticos são compostos por dois principais elementos: as fibras musculares (miofibras) e o tecido conectivo. As miofibras, por intermédio de sua inervação, são responsáveis pela função contrátil do músculo, enquanto o tecido conectivo proporciona a estrutura que mantém as células musculares individuais unidas durante a contração muscular, além de englobar os capilares e nervos dentro da estrutura muscular (JARVINEN *et al.* 2005).

A unidade contrátil do músculo é composta por miofibrilas as quais resguardam os sarcômeros. Esta unidade estende-se entre duas bandas Z que apresenta miofilamentos de actina e miosina. O citoplasma da fibra muscular, chamado de sarcoplasma, contém uma matriz celular e organelas, que são: complexo de golgi, retículo sarcoplasmático, mitocôndrias, gotículas lipídicas, glicogênio e a mioglobina. A miofibrila é um sincício derivado a partir da fusão de mioblastos (células miogênicas precursoras), ou seja, os mioblastos se fundem para formar miotubos multinucleados, longos, cilíndricos e núcleo central. O endomísio é a camada de tecido conectivo que circunda miofibras

individuais, enquanto o perimísio circunda fascículos ou feixes de fibras musculares. O epímísio é a camada de tecido conjuntivo externo que circunda o músculo esquelético (HUARD *et al.* 2002).

2.2 Lesão Muscular

Lesões musculares são um dos traumas mais comuns na prática esportiva, com incidência entre 10% e 55% de todas as lesões esportivas. As lesões podem ser divididas em contusão, estiramento ou laceração. Mais de 90% das lesões que ocorrem durante a prática esportiva são contusões ou estiramentos, por outro lado, as lacerações são incomuns no esporte. (JARVINEN *et al.* 2007).

A contusão muscular ocorre por mecanismos de compressão ou aplicação de força súbita. O estiramento o músculo é submetido ao mecanismo de tração excessiva levando a sobrecarga das miofibras e conseqüentemente geral roturas, normalmente na junção miotendínea (KIVI *et al.* 2009).

Segundo Moisala *et al.* (2007) o quadro clínico da lesão muscular é determinado após avaliação do paciente, gravidade da lesão e a extensão do hematoma são fatores avaliados no exame físico. Os vasos sanguíneos intramusculares são facilmente lesionados em decorrência do trauma, o que pode gerar hematoma intra ou intermuscular. O hematoma intramuscular apresenta o sangue extravasado dentro da fáscia e o músculo está intacto causando aumento na pressão intramuscular delimitando o tamanho do hematoma, pois com o aumento da pressão os vasos sanguíneos são comprimidos, ao contrário, o hematoma intermuscular ocorre quando a fáscia é danificada assim o sangue extravasa para o espaço intersticial sem aumento significativo na pressão no interior da musculatura, desta forma o extravasamento de sangue é mais extenso.

A lesão muscular pode ser classificada em três graus: leve, moderada e grave. Lesão leve (grau I) ocorre por estiramento ou contusão apresentando lesões de poucas fibras musculares, pouco edema, desconforto acompanhado de nenhuma ou perda mínima de força muscular, apresenta pouca restrição do movimento. Lesão moderada (grau II) envolve maiores danos a musculatura

com perda de função importante, pode apresentar contratura muscular. Lesão grave (grau III) considera-se uma lesão através de toda a secção transversa do músculo, resultando completa perda de função muscular.

2.3 Patobiologia da Lesão Muscular

O processo de recuperação da lesão muscular segue um padrão diferente quanto aos de outros tecidos orgânicos. O músculo sofre processo de reparo ou regeneração que não tem ligação com o tipo de lesão (contusão, estiramento ou laceração) e sim, com a lesão ou não da lâmina basal. Quando existe a lesão da lâmina basal forma-se tecido cicatricial com grande quantidade de colágeno. Este tecido cicatricial provoca mudanças mecânicas, histológicas e funcionais. Quando a lâmina basal não está lesionada, o tecido sofre o processo de regeneração, mantendo-se com as mesmas características do tecido muscular nativo.

Segundo Järvinen *et al.* (2007), três fases demonstram o processo de reparo da lesão muscular: Fase de destruição, fase de reparo e fase de remodelação.

Fase de destruição é caracterizada pela ruptura e necrose das fibras musculares, formação de hematoma entre as miofibras lesionadas com presença de reação celular inflamatória.

Fase de reparo apresenta fagocitose do tecido necrosado, regeneração das fibras musculares e produção de tecido cicatricial. Nesta, fase, ocorre o processo de revascularização pelo crescimento de capilares em áreas lesadas.

Fase de remodelação é importante, pois, acontece a maturação das miofibras regeneradas, retração e reorganização do tecido cicatricial, desta forma ocorrendo a recuperação da capacidade funcional do músculo.

Após o trauma, as miofibras que foram rompidas contraem para suas extremidades formando o hematoma no local entre as miofibras. As extremidades lesadas das miofibras sofrem necrose localizada nesse local. Os macrófagos invadem a área da lesão removendo as partículas necrosadas e secretam fatores de crescimento ativando as células satélites (JARVINEN *et al.* 2007).

Tratando-se dos fatores de crescimento e citocinas liberadas no foco da lesão, há evidências de que o fator de necrose tumoral – α (TNF – α) apresenta papel na regeneração do músculo esquelético, como um inibidor da atividade muscular durante a recuperação. Além disso, fatores de crescimento de fibroblastos (FGF), fatores de crescimento insulina-like (IGF) e, fatores de crescimento de transformação – β (TGF- β), além de interleucinas 1 β (IL-1 β) e 6 (IL-6) são expressados no músculo lesado (WARREN *et al.* 2002; CHARGE *et al.* 2004; HAYSHI *et al.* 2004).

As IGFs 1 e 2 são precursores da mitose para os mioblastos, em lesões musculares. Para Järvinen *et al.* (2005) as células satélites se encontram quiescentes entre a lâmina basal das miofibras e o sarcolema. Estas células são responsáveis por formar mioblastos, fundi-los em miotubos e, finalmente, maturar em miofibras. (ENGERT *et al.* 1996; FLORINI *et al.* 1996; JARVINEN *et al.* 2000).

Kaariainen *et al.* (2000) apresentaram um quadro com os eventos durante a regeneração muscular.

Quadro 1. Seqüência temporal dos eventos durante a regeneração da fibra muscular após uma lesão.

Tempo pós-lesão	Eventos
0-24h	<ul style="list-style-type: none"> - Retração das miofibras rompidas e <i>gap</i> preenchido com hematoma - Miofibras rompidas iniciam a necrose - Banda de contração é formada permitindo a formação da membrana de demarcação, que impede a extensão da lesão - Ativação das células satélites em 24h.
Dia 2-3	<ul style="list-style-type: none"> - Diferenciação das células satélites em mioblastos e inicia a fusão em miotubos - Fagocitose de miofibras necrotizadas por macrófagos - Hematoma começa a ser substituído por tecido conectivo

Dia 5	- Miotubos começam a preencher membranas basais “vazias” - Miofibras regeneradas começam a aderir ao tecido conectivo formado
Dia 7	- Miofibras regeneradas mantêm-se fora das membranas - Tecido conectivo começa a densificar
Dia 14	- Formação de novas mini – junções miotendíneas
Dia 21-56	- Tecido “cicatricial” começa a diminuir e as miofibras começam a se entrelaçar - Fibras regeneradas maduras e mionúcleos na periferia

2.4 Colágeno

Os organismos multicelulares são formados por células especializadas organizando os tecidos. A matriz extracelular é formada por moléculas de diferentes natureza que são produzidas, exportadas e complexadas pelas células, modulando a estrutura, fisiologia e biomecânica dos tecidos (TAKALA *et al.* 2000).

O colágeno constitui um grupo de proteínas compostas por três cadeias polipeptídicas dispostas em tripla hélice sendo o principal componente da matriz extracelular (MEC) perfazendo aproximadamente 25% da massa protéica total do organismo (GHADIALLY, 1997). De modo geral, as fibras colágenas se dispõem num padrão ondulado e exibem extensão bastante variada, e têm papel fundamental na arquitetura tecidual, na resistência dos tecidos e em ampla variedade de interações célula-célula e célula-matriz (RICH, WHITTAKER, 2005; OLIVEIRA, 2010).

Aproximadamente 19 tipos de colágeno foram encontrados em vertebrados. São divididos em dois subgrupos, fibrilar e não fibrilar. No músculo esquelético o tipo fibrilar é representado pelos colágenos do tipo I, tipo II e tipo III e o tipo não fibrilar é representado pelo colágeno do tipo IV (TAKALA *et al.* 2000).

Os tipos I e o tipo III são encontrados no perimísio e no epimísio, com o tipo I sendo abundante em ambas as camadas. No entanto é no endomísio onde as maiores quantidades de colágeno são encontradas.

No músculo esquelético, o colágeno é produzido principalmente por fibroblastos sobre os ribossomos ligados à membrana do retículo endoplasmático rugoso. A biossíntese de colágeno é caracterizada pela presença de um extenso número de modificações pós-tradução das cadeias polipeptídicas, que contribuem para a qualidade e estabilidade da molécula do colágeno (KIVIRIKKO *et al.* 1982)

A rede de tecido conjuntivo do músculo esquelético tem um papel dinâmico durante a diferenciação e o crescimento muscular normal e serve como estrutura de suporte no músculo esquelético sendo dividido em bainhas de tecido conectivo denominadas endomísio, perimísio e epimísio.

O endomísio é a camada de tecido conectivo mais delicada que reveste e separa cada célula muscular individualmente. Nesta localização, o tecido apresenta-se rico em fibras finas de colágeno tipo III, fibras do sistema elástico, capilares e terminações nervosas. (Piedade, 2010).

A interação entre o conjunto de células musculares e o tecido conectivo na região da lâmina basal deve possuir resistência suficiente para suportar cargas de até 1000kg durante um trabalho de sobrecarga máxima. Para tanto, existem cadeias de moléculas específicas como a distrofina e as integrinas que, direta ou indiretamente, conectam os miofilamentos contráteis, através da membrana plasmática à matriz extracelular (KAARIANEN *et al.* 2000, JARVINEN *et al.* 2005; PIEDADE, 2010).

O perimísio é uma camada de tecido conjuntivo mais fibroso que o endomísio e envolve grupos de 10 a 20 células musculares, formando um fascículo. O epimísio envolve todo o músculo sendo considerada a camada mais resistente e espessa de tecido conjuntivo. Tanto o epimísio como o perimísio contém grande quantidade de colágeno tipo I em relação ao colágeno tipo III. (PIEADDE, 2010).

Kaarianen *et al.* (2008) demonstram que em fases iniciais do processo de cicatrização muscular estão presentes elementos da matriz extracelular que tem baixa capacidade de suportar forças de tração, como a fibrina, fibronectina, ácido hialurônico e as fibras de colágeno do tipo III. Estes achados seriam a explicação para a baixa resistência da cicatriz encontrada nos ensaios biomecânicos nas fases iniciais do reparo.

Segundo Kannus *et al.* (2003) a partir da fase de maturação e remodelamento o colágeno tipo I começa a aumentar proporcionalmente e se organiza estruturalmente aumentando a capacidade funcional do músculo reparado.

Ainda deve ser destacado que a disposição arquitetural típica das moléculas de colágeno em feixes fibrosos é altamente relevante para geração de força tênsil em um tecido exposto à agressão (PUGLIESE *et al.* 2003; RIBEIRO *et al.* 2009).

Durante o reparo cicatricial, a síntese de colágeno tem início em média no terceiro dia, atinge seu pico máximo em três a seis semanas e entra em fase de remodelação. O colágeno tipo III é inicialmente depositado, sendo gradativamente substituído por colágeno tipo I à medida que ocorre maturação do tecido cicatricial (CARNEIRO *et al.* 2005; OLIVEIRA, 2010).

2.5 Laser de Baixa Intensidade: Aspectos Físicos e interações com tecido biológico

A luz tem sido utilizada com fins terapêuticos ainda em tempos antigos. A origem do laser se dá a partir de eventos que ocorrem dentro de uma cavidade óptica, na qual determinado material após ter seus elétrons excitados, culminando em geração de emissão estimulada de fótons com a mesma frequência, direção e comprimento de onda. (COTTON, 2004).

O estágio final deste processo, denominado de amplificação da luz, decorre pela existência de espelhos dentro da cavidade, um totalmente refletor e outro parcialmente, fazendo com que os fótons sofram reflexão, estimulando novos fótons e emitindo o feixe laser (COTTON, 2004; KARU *et al.* 2005).

As características, isto é, as propriedades que diferem o feixe laser de outras fontes luminosas são a monocromaticidade, colimação, coerência e polarização. A monocromaticidade indica que cada meio gerador de laser corresponde a um único comprimento de onda, característica importante, pois determina quais moléculas absorverão o laser e sofrerão os efeitos fotobiológicos específicos. O laser é colimado por consequência de apenas os fótons que estão perpendiculares aos espelhos contribuem para o processo de

amplificação. A coerência ocorre, pois os fótons estão em fase, consequências do processo de emissão estimulada. Esta coerência pode ser temporal, quando as ondas de luz se encontram em fase, ou espacial, quando os fótons estão ajustados em planos espaciais paralelos entre si, sendo mantidos por grandes distâncias (KARU *et al.* 2005).

A polarização ocorre quando as ondas de luz estão todas orientadas num só plano, gerando a vibração dos campos elétricos em uma só direção, podendo ser linear ou circular (COTTON, 2004).

O espectro eletromagnético mais utilizado na laserterapia de baixa intensidade está entre os comprimentos de onda de 630 a 1300 nm, incluindo a luz visível e parte próxima da luz infravermelha. Esta parte do espectro é denominada de janela óptica, por ser esta faixa capaz de penetrar nos tecidos e produzir os efeitos específicos. (COTTON, 2004)

A radiação luminosa ao atingir o tecido biológico pode ser refletida, transmitida, absorvida ou espalhada. A absorção é o principal parâmetro da interação laser-tecido, pois dela depende a quantidade de energia entregue ao tecido e os efeitos nele provocados. Dependendo da energia do fóton, a radiação pode ser transferida à molécula causando transições rotacionais, vibracionais ou eletrônicos, provocando nos tecidos, efeitos fotoquímicos, fotofísicos, fototérmicos, fotomecânicos e fotoelétricos (KARU *et al.* 2005)

O princípio básico da laserterapia de baixa intensidade é o fato que a irradiação, através da propriedade de monocromaticidade, possui capacidade de alterar o comportamento celular sem que seja necessária a presença de aquecimento. Por esta razão denomina-se de terapia de baixa potência ou intensidade. O fenômeno apesar de ser primeiramente denominado de bioestimulante, notou-se que em certos momentos apresenta-se efeito inibitório sobre as ações celulares tendo assim a sua terminologia modificada para biomodulador (BASFORD, 1995; KLEBANOV *et al.* 2001)

A interação biológica laser-tecido promove reações atérmicas, produzindo o efeito fotoquímico. Este efeito está associado à absorção particular de cada cromóforo, isto é, substâncias absorvedoras de luz presentes nos tecidos, tendo como alvo principal os citocromos presentes nas mitocôndrias. Para lasers de 488 e 515 nm (Argônio), tem-se a hemoglobina como cromóforo, enquanto para 10.600 nm (CO₂) a água. Para o 632,8 nm

(He-Ne), 904 nm (GaAs) e 630-830 nm (GaAlAs), ou seja, comprimentos na região do vermelho e infravermelho próximo, não apresentam fortes cromóforos, possibilitando maior capacidade de penetração. (COTTON, 2004; VLADIMIROV *et al.* 2004)

Karu, *et al.* (2005) afirmaram que estes efeitos podem ocorrer por processos que provocam modificações no potencial da membrana, resultando em aumento da síntese de ATP, gerando os efeitos de biomodulação.

As porfirinas endógenas, presentes nas mitocôndrias, absorvem a luz na parte vermelha do espectro servindo como cromóforos da irradiação a laser e atuando como fotosensibilizadores, induzindo reações de radicais livres (incluindo a peroxidação lipídica com formação predominante de hidroperóxido de ácidos e gorduras não saturadas nos fosfolipídios) após a absorção do quantum de energia. (KLEBANOV *et al.* 2001).

A peroxidação lipídica aumenta a permeabilidade iônica da membrana plasmática, em particular, dos íons cálcio. O aumento intracelular da concentração de cálcio (Ca^{2+}) em leucócitos ativa processos dependentes de Ca^{2+} e finalmente incrementa o potencial funcional celular. Este processo é acompanhado pela reunião de NADPH-oxidases na membrana no estado ativo de espera e expressão de receptores de superfície. O aumento do potencial funcional dos leucócitos também é acompanhado pela produção de agentes bioativos como O_2 , H_2O_2 , ClO^- , NO e várias citocinas. Alguns possuem propriedades bactericidas enquanto outros afetam a microcirculação sangüínea. A participação do citocromo-c-oxidase e do Ca^{2+} -ATPase atuantes como cromóforos, não explicam todos os efeitos da irradiação infravermelha (KLEBANOV *et al.* 2001).

O óxido nítrico (NO) é considerado um mediador dos efeitos celulares decorrentes à laserterapia sendo responsável pelo incremento da ligação celular, estando associada à produção de energia, estimulação da biogênese de mitocôndrias, apoptose e envolvido com efeitos analgésicos, aumento da microcirculação possuindo reservatório nas hemoglobinas (KARU *et al.* 2005).

A irradiação a laser regula o aumento do peptídeo relacionado ao gene calcitonina (CGRP) que serve como um indicador da regeneração após a lesão (SNYDER *et al.* 2002).

A proliferação de fibroblastos gengivais é aumentada pela aplicação da LBI, independentemente do comprimento de onda (670, 780, 692, 782 nm), mas com a mesma fluência (2 J/cm^2 , $0,02 \text{ J}$) e quanto menor o tempo de exposição (maior potência de saída) melhor serão os resultados (ALMEIDA-LOPES *et al.* 2001)

Karu (1987) verificou que a irradiação de mitocôndrias isoladas induzia alterações na homeostasia celular resultando em reações em cascata. Sugerindo que alguns componentes da cadeia respiratória (citocromos e NADH desidrogenase) serviriam como fotoreceptores ou cromóforos primários, ou seja, capazes de absorver luz de determinado comprimento de onda, ativando a cadeia respiratória. Resultando no aumento da síntese de ATP, afetando os níveis de hidrogênio da célula, ativando outros íons transportados como sódio e potássio, além de alterarem o fluxo de cálcio entre as mitocôndrias e o citoplasma.

Manteifel, *et al.* (2005) relatam a hipótese de que o citocromo-c-oxidase, enzima terminal da cadeia respiratória, é um fotoreceptor da luz na região do vermelho. A absorção da luz por esta enzima aceleraria o transporte de elétrons na cadeia respiratória levando ao aumento de potencial elétrico transmembrana da mitocôndria, ativando a síntese de ATP, conseqüentemente, o metabolismo celular.

Rochind e Quaknine (1992) relataram os efeitos do LBP são dependentes da densidade de energia, pois baixas densidades causam a regulação na oxi-redução do metabolismo celular, e com altas densidades ocorrem danos fotodinâmicos. Esta afirmação foi possível após analisarem diferentes comprimentos de ondas e densidades de energia aplicadas sobre células de fibroblastos, verificando que a 630 nm obtinha-se um maior número de mitoses em comparação a 360 nm e 780 nm enquanto o pico era alcançado com densidade de energia de 15 J/cm^2 , porém acima de 60 J/cm^2 apresentavam redução da reprodução celular.

2.6 Medicamentos Anti-inflamatórios

Conhecidos pela humanidade há cerca de 100 anos, os compostos antiinflamatórios não esteróides (AINES) estão entre os agentes

farmacológicos mais utilizados na prática médica. Apresentam um amplo espectro de indicações terapêuticas, como: analgesia, antiinflamação, antipirese, profilaxia contra doenças cardiovasculares. (DUBOIS *et al.* 1998; KUMMER *et al.*, 2002)

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINE) constituem um grupo de compostos muito heterogêneos com várias estruturas químicas, podendo ser distribuído em diversas classes, de acordo com o grupo químico a que pertencem.

A enzima ciclooxigenase apresenta duas isoformas intituladas COX-1 e COX-2. A partir de descobertas que rotulavam a COX-1 como fisiologicamente constitutiva, agindo como citoprotetora gástrica e mantenedora da homeostase renal e plaquetária e COX-2 ou indutiva, a qual surgia apenas em situação de trauma tissular, inflamação, surgiu a idéia de que inibidores específicos da COX-2 impediriam o processo inflamatório sem os efeitos colaterais indesejáveis, principalmente distúrbios gastrintestinais, advindos do bloqueio inespecífico da COX. (KUMMER *et al.* 2002).

O termo COX deve-se ao seu proposto mecanismo de ação consistir na formação de peróxidos bicíclicos (endoperóxidos) a partir da oxigenação de ácidos graxos polinsaturados. Segundo KUMMER *et al.* (2002) as isoformas COX-1 e 2 apresentam algumas diferenças como:

- A) Seqüência genética diferente para cada isoforma. Os genes são regulados por dois sistemas independentes e diferentes, apesar da reação enzimática por eles catalisada ser idêntica.
- B) O sítio de ligação do agente inibidor na isoforma COX-2 é estruturalmente cerca de 25% maior que o da COX-1, apresentando também local de ligação secundário, além do sítio catalítico. Isto tem permitido o desenvolvimento de agentes que bloqueiam a atividade COX-2, especificamente em concentrações que apresentam mínimos efeitos COX-1. O mesmo composto pode funcionar como um inibidor COX-2 em baixas concentrações e inibidor competitivo da COX-1 quando em altas dosagens. As bases moleculares para tais diferenças ainda não são completamente entendidas.
- C) A COX-1 é uma enzima presente na maioria dos tecidos. Diante de quadros inflamatórios, a atividade desta isoforma não parece ser

alterada ou apresenta um aumento discreto de 2 a 4 vezes na sua expressão. Em menores quantidades, a COX-2 encontra-se em determinados tecidos como cérebro, intestinos, rins, testículos, glândula tireóide, pâncreas, diante de quadro inflamatório, sua expressão é aumentada cerca de 20 vezes ou mais.

D) Além do ácido aracdônico, a COX-2 também é capaz de agir no metabolismo de outras substâncias como: ácido linolênico e ácido linoléico.

Dois agentes que mostram algum grau de inibição “preferencial” COX-2 são o meloxicam e o nimesulide. Para estes compostos tem sido difícil atribuir relação de “segurança” gastrointestinal quando comparados com os demais AINES convencionais, já que apesar de preferencial inibição COX-2, as doses terapêuticas destas drogas também resultarão em redução na atividade COX-1. (BROOKS *et al.* 1999).

2.6.1 Meloxicam

O meloxicam é um dos mais potentes antiinflamatórios não esteroidais que apresenta uma das mais altas proporções de atividade sobre a COX-2, desenvolvidos inicialmente para o tratamento da artrite reumatóide e osteoartrite (Engelhardt *et al.* 1995)

É uma droga antiinflamatória não esteroidal e pertence à classe farmacológica do ácido enólico derivada do grupo das oxicanas, recentemente introduzido no mercado farmacêutico brasileiro e que tem a característica de seletividade pela inibição da via COX-2 quase dez vezes superior ao diclofenaco e cem vezes maior que a do piroxicam. Isto justifica uma melhor tolerabilidade, preservando o organismo de reações adversas ligadas à excessiva inibição de COX-1, particularmente no estômago e rins. Além de que sua eliminação é mais rápida, em razão da meia-vida plasmática alta, sendo suficiente uma única dose diária (LARA, 1998; ANDRADE, 2000; GURGEL, 2003).

Em 1995, Engelhardt *et al.*, realizaram um estudo compararam o meloxicam com outras drogas antiinflamatórias não esteroidais em relação aos seus efeitos farmacodinâmicos característicos em ratos, como atividade

antiinflamatória, analgésica, anti-pirética e ulcerogênica. Conseguiram demonstrar que o meloxicam apresenta excelente capacidade terapêutica sendo três vezes superiores à indometacina, noventa e duas vezes mais potentes do que o piroxicam, 170 vezes mais potente que o tenoxicam e 3500 vezes mais potente do que o flurbiprofeno. O seu efeito sobre a síntese de prostaglandinas na mucosa gástrica foi menor do que as drogas testadas, sendo mais bem tolerada, e a sua inibição preferencial de COX-2 explicaram a maior capacidade antiinflamatória do meloxicam, suportando a sua utilização terapêutica.

2.6.2 Estrutura Química

Quimicamente conhecido como [4-hidroxi-2-metil-N-(5-metil-2-tiazol)-2H-1,2 benzotiazina-3-carboxamida-1,1-dióxido, o meloxicam foi lançado na Inglaterra em dezembro de 1996, (Hassan,2002; Noble e Balfour,1996; Rigato, 2005) e apresenta a seguinte estrutura molecular:

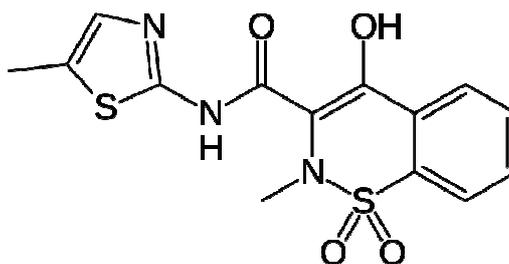


FIGURA 1: Estrutura química Meloxicam

Fonte: Hassan, 2002.

2.6.3 Mecanismo de Ação

O mecanismo de ação do meloxicam está em sua capacidade de inibir a biossíntese de prostaglandinas via ciclooxigenase. Difere-se dos AINES

tradicionais por desempenhar uma seletividade preferencial na inibição da enzima COX-2. (Vane e Botting, 2000; Rigato, 2005).

2.6.4 Propriedades Farmacológicas

Em estudos sobre osteoartrite o uso de comprimidos 7,5 mg e 15 mg de meloxicam, mostraram menores efeitos gastrointestinais adversos, (graves e não graves) que os comprimidos de piroxicam (20mg), diclofenaco de liberação lenta (100mg) e de naproxeno (750 e 100mg). (Distel *et al.* 1996; Rigato, 2005).

A vantagem terapêutica é justificada pela forma de ação preferencial da enzima COX-2, mostrando ser aproximadamente 10 vezes mais potente do que o COX-1, em experimentos *in vitro*. (Hawkey *et al.* 1998; Engelhardt *et al.* 1995; Engelhardt *et al.* 1996).

3 OBJETIVO

Avaliar o efeito do laser, meloxicam e de ambos associados na colagenogênese dos tipos I e III na lesão muscular induzida por impacto em ratos.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Local e Período de Estudo

A coleta de dados foi realizada no laboratório de cirurgia experimental da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, em Dezembro de 2011.

O estudo foi submetido à análise da Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA/UFMS e aprovado sob o protocolo 291, e todos os procedimentos respeitaram as normas internacionais para experimentação animal.

4.2 Seleção, Armazenagem e Pesagem dos Animais

Foram utilizados 60 ratos do gênero masculino *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar albinus, com massa corporal média de 300 g, procedentes do biotério da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno com dimensões de trinta e três centímetros de largura, quarenta centímetros de profundidade e dezessete centímetros de altura, com tampas/grades de aço inoxidável contendo espaço para ração e água – Brasholanda[®], em condições de temperatura, luz e umidade controlada, com água e comida *ad libitum*.

No início do experimento, os animais foram pesados em balança de precisão da marca Marte AS 2000C, com variação de um centésimo de grama e identificados com marcas produzidas com canetas em sua calda, de acordo com o tipo de tratamento pré-estabelecido. Os animais foram pesados novamente antes de sofrerem a eutanásia.

4.3 Grupos Experimentais

Foram estudados 4 grupos experimentais, nos quais os animais foram alocados aleatoriamente, em grupos contendo 15 animais cada, conforme a figura 02.

GRUPO 1 : Grupo lesão

GRUPO 2: Grupo de lesão muscular tratado com laser.

GRUPO 3: Grupo de lesão muscular tratado com meloxicam

GRUPO 4: Grupo de lesão muscular tratado com laser associado com meloxicam.

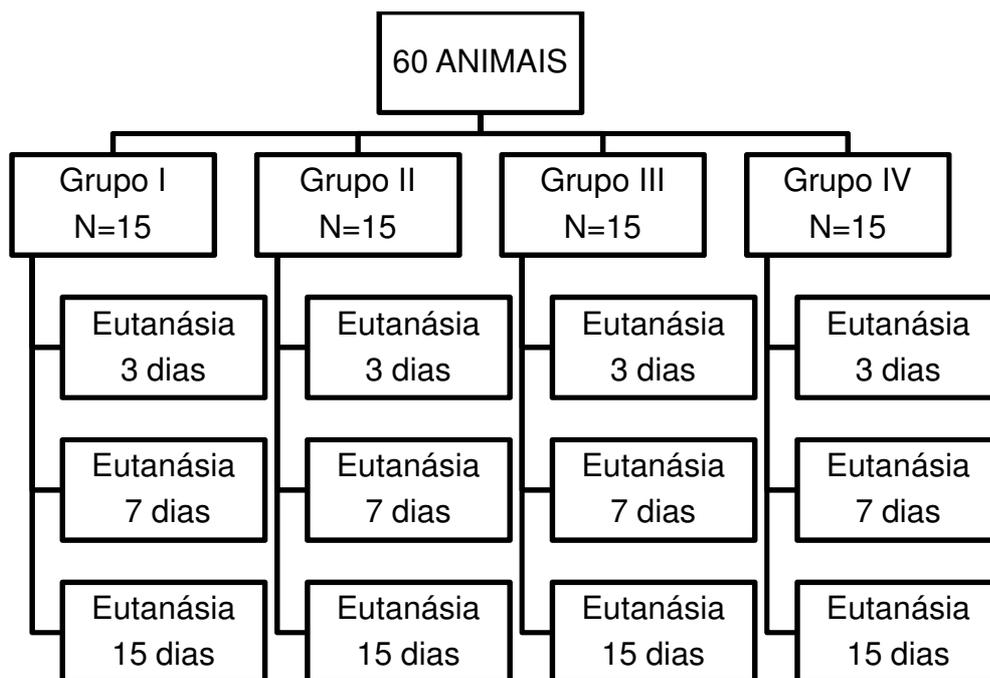


Figura 02 – Fluxograma dos grupos quanto ao número de animais e tempo para eutanásia.

4.4 Protocolo para produção da lesão experimental

Para realizar a lesão muscular, foi utilizado um aparelho desenvolvido por Sene *et al.*(2005) que consiste em duas hastas metálicas telescópicas ajustáveis onde é possível graduar a altura entre 30 a 40 cm e uma base plástica com área de 272,5 cm². Sobre essa base, foi acoplada uma superfície metálica retangular, de área de 12,25 cm², que serviu de apoio para a queda o peso.

Na parte superior final das hastas metálicas, foi fixado uma estrutura metálica que proporciona estabilidade, bem como suporta uma roldana pela

qual um fio guia fixa o peso a ser liberado. Entre as hastes, foi confeccionado, em acrílico transparente, um guia para conduzir o peso durante a queda livre, de 30 cm de altura, evitando desvios e oscilações do peso.



Figura 3- Aplicação de carga para indução da lesão muscular.

Fonte: Arquivo pessoal.

Oliveira et al. (2004), e Minamoto (1999), realizaram estudos pilotos com a utilização de uma carga de 200 g, liberada a uma altura de 30 centímetros, sendo a energia de impacto, no sítio da lesão, de aproximadamente 294 N, segundo a fórmula apresentada por Minamoto. (1999) $f = m \times g \times h \times \Delta S^{-1}$, assim temos:

F = força

M = massa

G = aceleração da gravidade

H = altura da liberação da carga

ΔS^{-1} = deformação tecidual estabelecida em 2 mm.

4.4.1 Procedimento para produção da lesão experimental

Os animais foram previamente anestesiados com Cloridrato de Ketamina (100 mg/Kg) e Xilazina (20 mg/Kg) e o terço médio do ventre muscular do gastrocnêmio direito e esquerdo sofreu a raspagem dos pêlos. Foi feita

analgesia preemptiva com 0,01 mg (100 g) de Butorfanol como medicação pré-anestésico.

O aparelho de produção da lesão por impacto foi fixado por meio de grampos, na mesa cirúrgica como forma de estabilização, desta forma, evitar que ocorra qualquer oscilação na queda do peso.

Para que a lesão por impacto ocorra sempre na mesma região, a carga foi liberada a uma altura de 30 cm conduzida pelo guia em acrílico e por um fio fixado diretamente sobre o peso lançado centralmente por meio de uma roldana posicionada nas hastes do equipamento.

Os animais foram submetidos a um único trauma e separados de acordo com o grupo experimental.

4.5 Aplicação do Laser de Baixa Intensidade

Foi utilizado o Laser Fosfeto Índio-Gálio-Alumínio-Fósforo (InGaAlP) da marca DMC® modelo Photon Lase III, com potência de 100mW (densidade de potência de $3,57 \text{ W/cm}^2$), área do feixe de $0,028 \text{ cm}^2$, e comprimento de onda de $\lambda 660\text{nm}$. A intensidade do equipamento foi aferida previamente ao experimento com o auxílio do medidor de potência (2-Watt Broadband Power/Energy Meter, Modelo 13 PEM 001/J, Holanda).



Figura 4- Equipamento Laser utilizado para irradiação.

Fonte: Arquivo pessoal.

4.5.1 Protocolo de estimulação por irradiação laser

Para aplicação do laser, os animais foram previamente imobilizados, sobre um suporte de PVC, com a parte posterior da pata exposta.

A radiação Laser foi realizada por três dias consecutivos com dois pontos no ventre do músculo gastrocnêmio.

O procedimento de aplicação foi realizado sobre o local da lesão, em contato com a pele, formando um ângulo de incidência do feixe de 90° de maneira semelhante à realizada por Amaral *et al.* (2001).

A densidade de energia de aplicação utilizada foi de 3 J/cm² com tempo de aplicação 30 segundos, segundo Costardi *et al.* 2008.

4.6 Terapia com AINH

Os animais do grupo lesão muscular tratado com meloxicam e do grupo laser associado ao meloxicam receberam injeção subcutânea diária, por três dias consecutivos, de meloxicam na dose de 0,5mg.Kg⁻¹, e foram mantidos em observação até completar os períodos de 3, 7 ou 15 dias. (TOGNINI,1999).

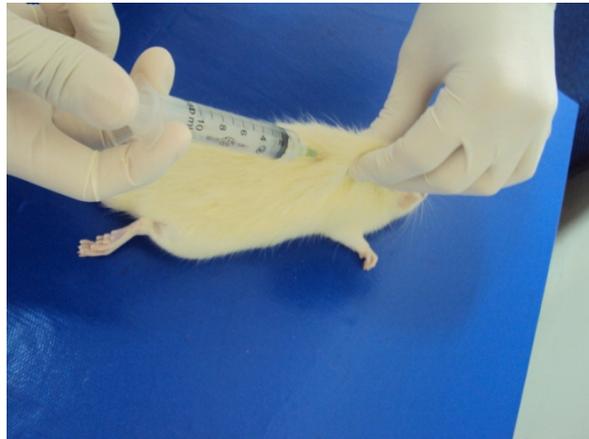


Figura 5- Aplicação de meloxicam.

Fonte: Arquivo pessoal.

4.7 Eutanásia

Nos períodos escolhidos para avaliação (3,7 ou 15 dias de pós-lesão), os animais dos respectivos grupos sofreram a eutanásia através de injeção letal da associação de solução injetável de Cloridrato de S(+) Cetamina (Cristália – Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda. – Campinas, SP) e Tiopental Sódico (Cristália – Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda. – Campinas, SP) pó estéril diluído em Solução Fisiológica de Cloreto de Sódio a 0,9% em concentração de 100mg/ml.

Após a dissecação do músculo gastrocnêmio, o descarte dos animais foi feito por incineração em ambiente apropriado.

4.8 Análise Histológica

Foi retirado o gastrocnêmio de cada animal, por meio da remoção de pele e tecidos moles. A integridade do músculo foi preservada mantendo a origem e a inserção.

Os segmentos destinados à análise histológica foram incluídos em blocos de parafina para realização de cortes transversais de 5 micrômetros (μm) para preparação das lâminas: corada com *Picrosirius Red*.

Para a realização quantitativa das fibras de colágeno tipo I e tipo III foi utilizado o *software* CFC_image V.1.0. Para quantificar e classificar as fibras de colágeno dos tipos I e III, o *software* realiza uma varredura na imagem e compara os valores RGB de cada pixel com uma faixa de valores pré-estabelecida, ou seja, um limiar selecionado pelo usuário. Inicialmente, verifica se a tonalidade do pixel deve ser considerada como fundo e pinta este pixel com a cor branca. Em seguida, verifica se a tonalidade pertence ao limiar considerado como fibra de colágeno do tipo III e atribui a cor verde ao pixel. Caso contrário substitui pela coloração vermelha, que é característica da fibra colágena do tipo I. Por último o *software* realiza a quantificação dos pixels com tonalidades verdes e vermelhas.

O exame quantitativo de fibroblastos foi realizado no Laboratório de histologia da Universidade Anhanguera-UNIDERP, mediante o uso de análise de imagens através de microscopia óptica.

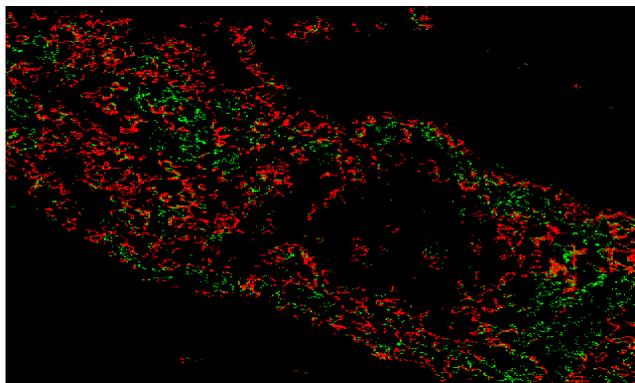


Figura 6- Imagem programaCFC_Image V.1.0. Pontos verdes colágeno tipo III. Pontos vermelhos colágeno tipo I. Objetiva 40x aumento 400x.

4.9 Análise estatística

As medidas das variáveis numéricas foram expressas em média \pm desvio padrão. A análise foi feita utilizando-se Análise de Variância (ANOVA) com *post hoc test* de *Tukey* nas amostras de distribuição normal e o teste de Kruskal-Wallis nas amostras de distribuição não normal. A normalidade dos grupos foi analisada através do teste de *Shapiro-Wilk*. O nível de significância considerado foi $p \leq 0,05$.

A tabulação dos resultados foi feita no software Microsoft Office Excel 2010, e o cálculo de normalidade no programa Bioestat 5.0. A comparação dos dados e elaboração dos gráficos foram realizadas no programa GraphPad Prism 4.0.

5 RESULTADOS

Tabela 2: média \pm desvio padrão da quantificação de colágeno nos grupos analisados. Campo Grande, MS, 2012. (n = 60).

	Lesão	Meloxicam	Laser	Meloxicam + Laser
COLÁGENO TIPO I				
3 dias	66,8 \pm 7,8	63,8 \pm 23,80	26,4 \pm 1,6	71,6 \pm 7,1
7 dias	76,2 \pm 1,0	73,5 \pm 3,7	41,8 \pm 23,40	76,7 \pm 2,7
15 dias	76,2 \pm 2,1	75,2 \pm 1,5	79,1 \pm 1,7	75,4 \pm 3,1
COLÁGENO TIPO III				
	Lesão	Meloxicam	Laser	Meloxicam + Laser
3 dias	33,2 \pm 7,8	36,2 \pm 23,70	73,7 \pm 1,8	28,4 \pm 7,1
7 dias	23,8 \pm 1,0	26,4 \pm 3,6	58,2 \pm 23,30	23,4 \pm 2,7
15 dias	23,7 \pm 2,0	24,8 \pm 1,5	20,9 \pm 1,8	24,6 \pm 3,1

Colágeno Tipo I - Lesão

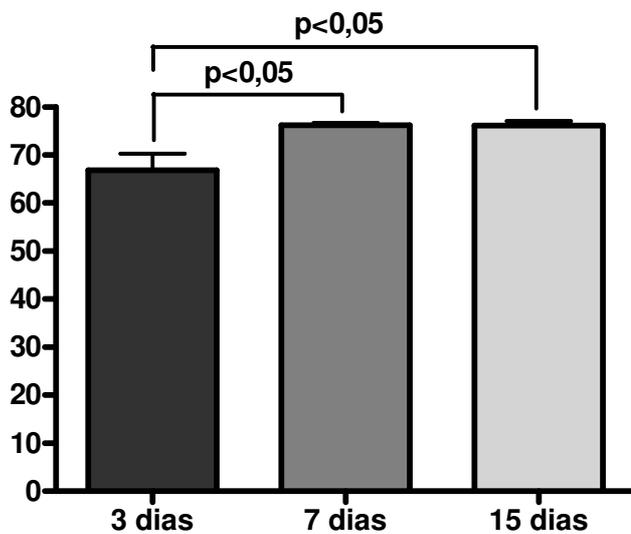


Figura 7: Comparação da quantificação de colágeno tipo I no grupo Lesão entre os vários momentos avaliados (Kruskal-Wallis; $p = 0,009$).

Houve diferença significativa na quantificação do colágeno tipo I no grupo lesão entre os períodos avaliados ($p = 0,009$), com diferença significativa entre o terceiro e o sétimo dia ($p < 0,05$) e entre o terceiro e o décimo quinto dia ($p < 0,05$). Não foi observada diferença entre o sétimo e o décimo quinto dia. (figura 7).

Colágeno Tipo I - Meloxicam

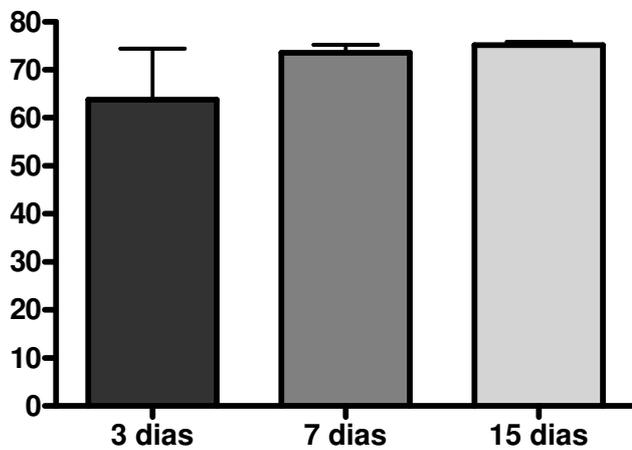


Figura 8: Comparação da quantificação de colágeno tipo I no grupo Meloxicam entre os vários momentos avaliados (Kruskal-Wallis; $p = 0,7239$).

Colágeno Tipo I - Laser

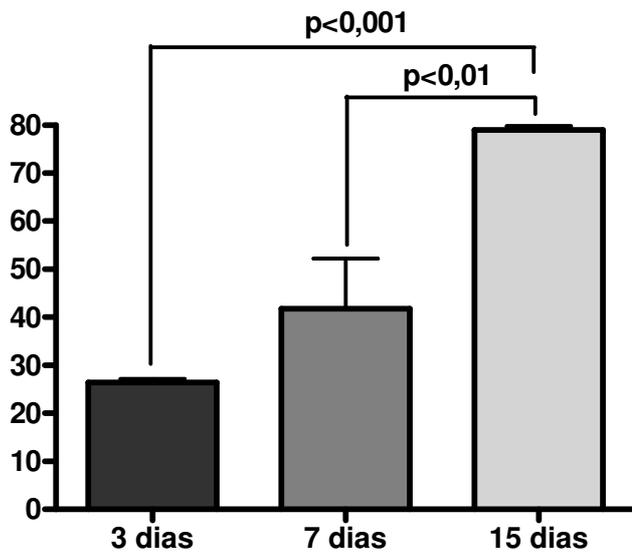


Figura 9: Comparação da quantificação de colágeno tipo I no grupo Laser entre os vários momentos avaliados (ANOVA; $p = 0,0002$).

Houve diferença significativa na quantificação do colágeno tipo I no grupo laser entre os períodos avaliados ($p = 0,0002$), com diferença significativa entre o terceiro e o décimo quinto dia ($p < 0,05$) e entre o sétimo e o décimo quinto dia ($p < 0,05$). Não foi observada diferença entre o terceiro e o sétimo dia (figura 9).

Colágeno Tipo I - Meloxicam + Laser

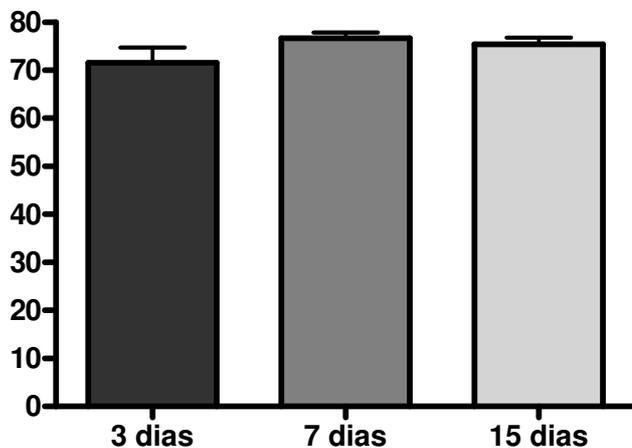


Figura 10: Comparação da quantificação de colágeno tipo I no grupo Meloxicam + Laser entre os vários momentos avaliados (Kruskal-Wallis; $p = 0,3068$).

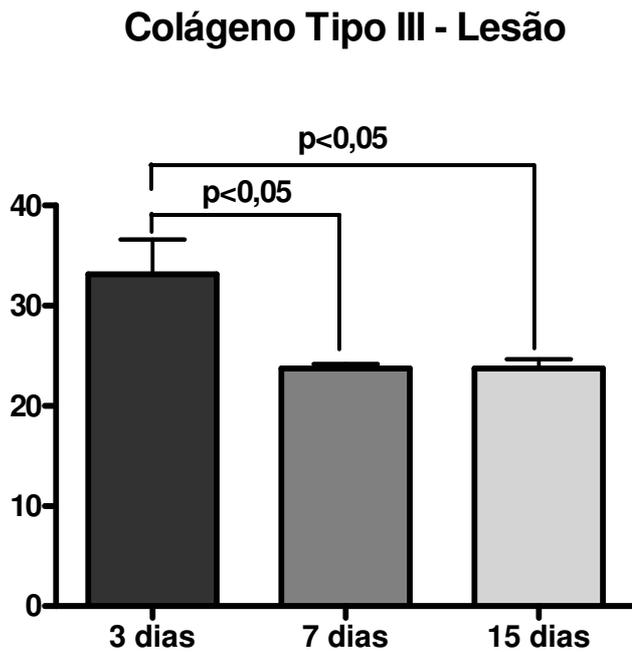


Figura 11: Comparação da quantificação de colágeno tipo III no grupo Lesão entre os vários momentos avaliados (Kruskal-Wallis; $p = 0,0091$).

Houve diferença significativa na quantificação do colágeno tipo III no grupo lesão entre os períodos avaliados ($p = 0,009$), com diferença significante entre o terceiro e o sétimo dia ($p < 0,05$) e entre o terceiro e o décimo quinto dia ($p < 0,05$). Não foi observada diferença entre o sétimo e o décimo quinto dia. (figura 11)

Colágeno Tipo III - Meloxicam

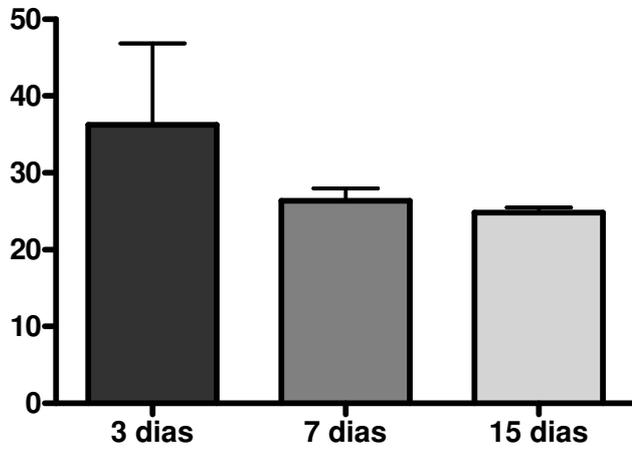


Figura 12: Comparação da quantificação de colágeno tipo III no grupo Meloxicam entre os vários momentos avaliados (Kruskal-Wallis; $p = 0,7239$).

Colágeno Tipo III - Laser

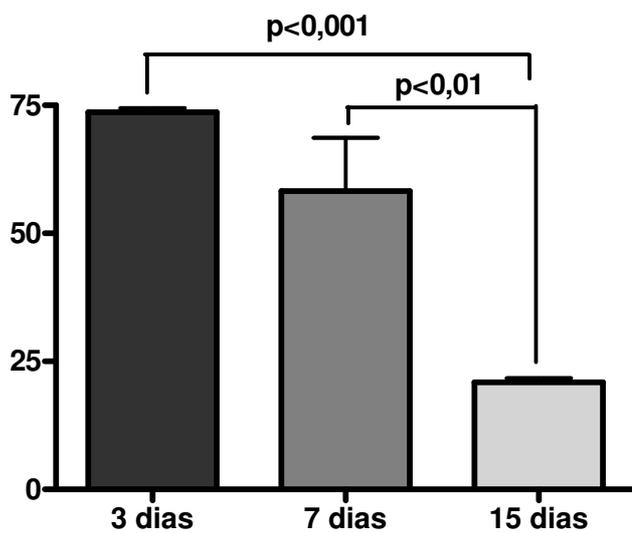


Figura 13: Comparação da quantificação de colágeno tipo III no grupo Laser entre os vários momentos avaliados (ANOVA; $p = 0,0001$).

Houve diferença significativa na quantificação do colágeno tipo III no grupo laser entre os períodos avaliados ($p = 0,009$), com diferença significativa entre o terceiro e o décimo quinto dia ($p < 0,05$) e entre o sétimo e o décimo quinto dia ($p < 0,05$). Não foi observada diferença entre o terceiro e o sétimo dia. (figura 13)

Colágeno Tipo III - Meloxicam + Laser

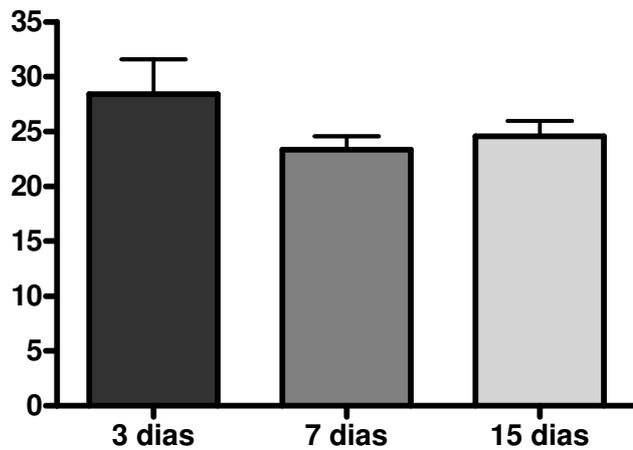


Figura 14: Comparação da quantificação de colágeno tipo III no grupo Meloxicam + Laser entre os vários momentos avaliados (Kruskal-Wallis; $p = 0,3693$).

Colágeno Tipo I - 3 dias

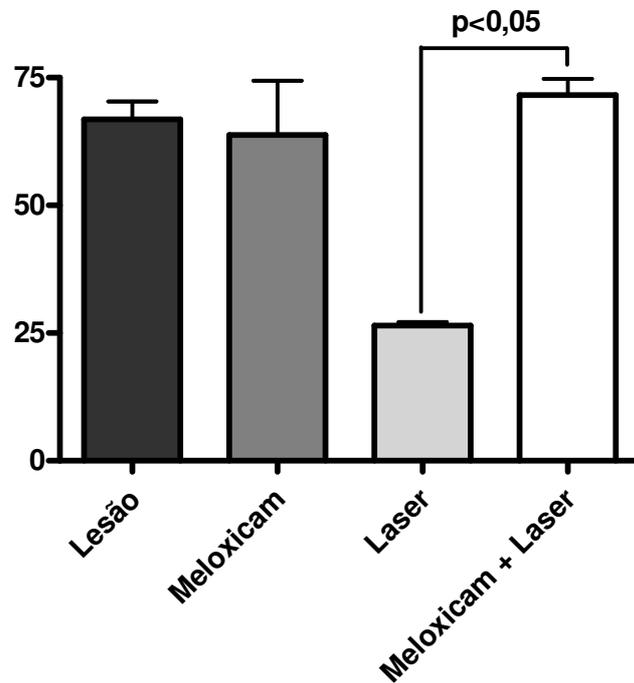


Figura 15: Comparação da quantificação de colágeno tipo I aos 3 dias de experimento entre os vários grupos avaliados (Kruskal-Wallis; $p = 0,0267$).

Houve diferença significativa na quantificação do colágeno tipo I entre os grupos laser e laser associado ao meloxicam lesão entre os períodos avaliados ($p = 0,0267$), com diferença significativa no terceiro dia ($p < 0,05$). (figura 15)

Colágeno Tipo I - 7 dias

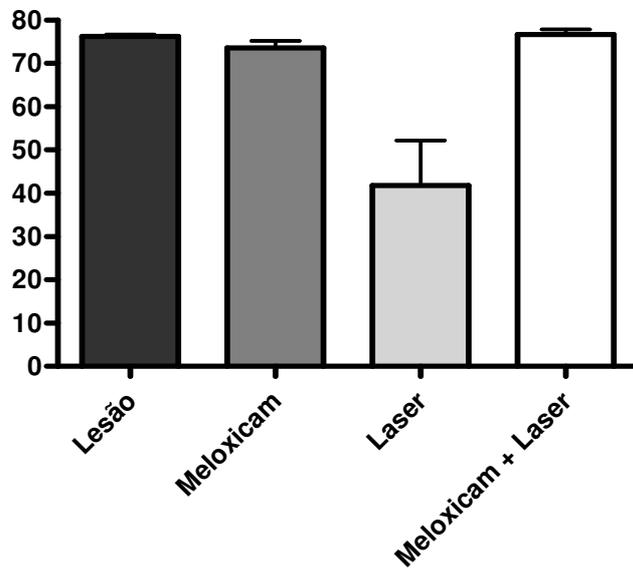


Figura 16: Comparação da quantificação de colágeno tipo I aos 7 dias de experimento entre os vários grupos avaliados (Kruskal-Wallis; $p = 0,1312$).

Colágeno Tipo I - 15 dias

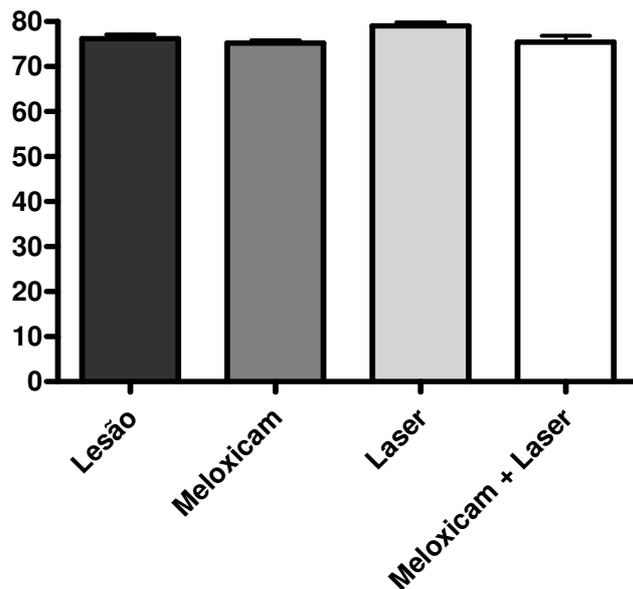


Figura 17: Comparação da quantificação de colágeno tipo I aos 15 dias de experimento entre os vários grupos avaliados (ANOVA; $p = 0,0445$).

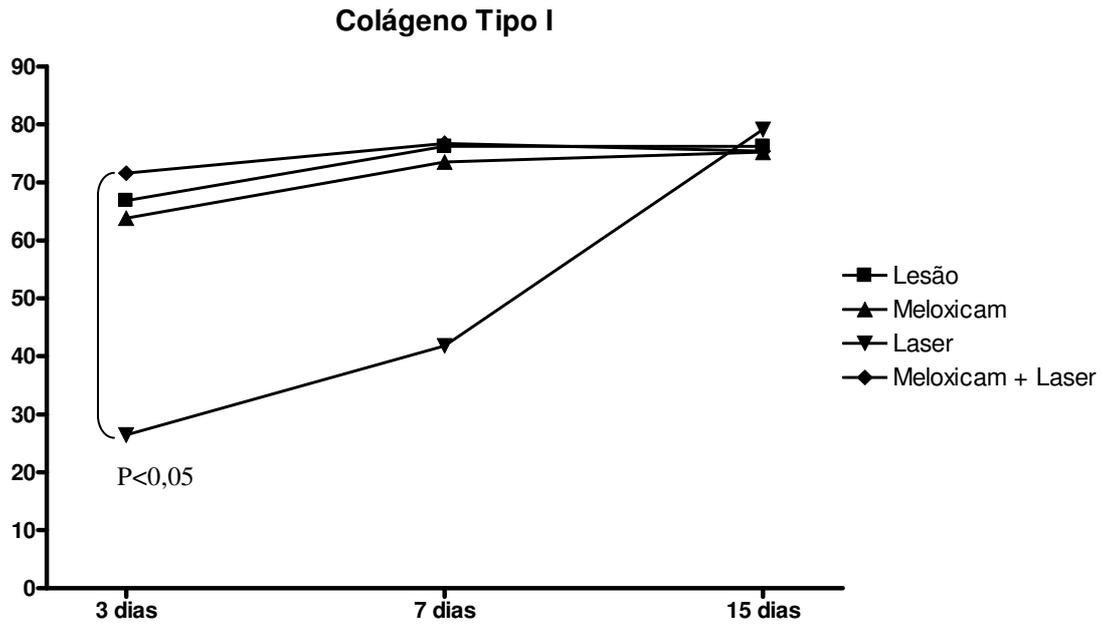


Figura 18: Variação do Colágeno Tipo I pelo tempo de avaliação de acordo com o grupo estudado. (Kruskal-Wallis; $p = 0,0267$). $P < 0,05$ ao 3º dia.

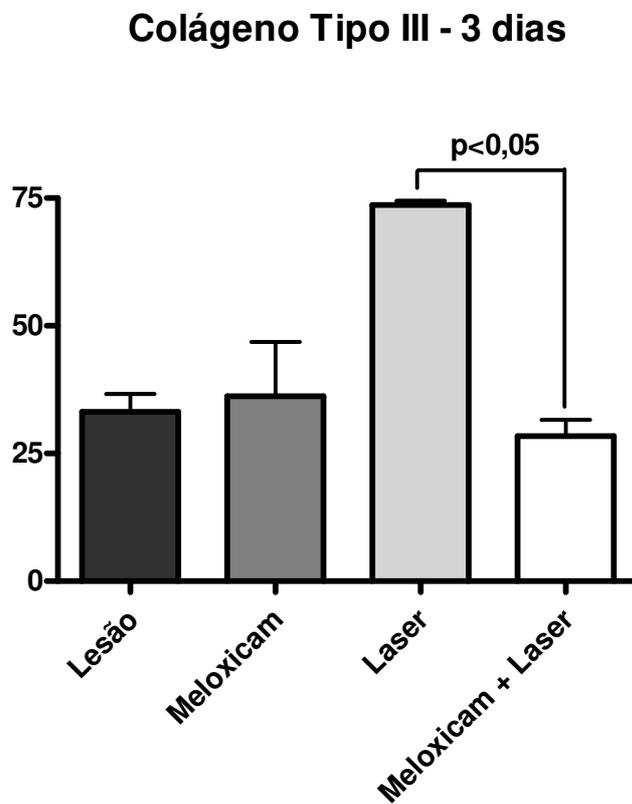


Figura 19: Comparação da quantificação de colágeno tipo III aos 3 dias de experimento entre os vários grupos avaliados (Kruskal-Wallis; $p = 0,0266$).

Houve diferença significativa na quantificação do colágeno tipo III entre os grupos laser e laser associado ao meloxicam lesão entre os períodos avaliados ($p = 0,0266$), com diferença significativa no terceiro dia ($p < 0,05$). (figura 19)

Colágeno Tipo III - 7 dias

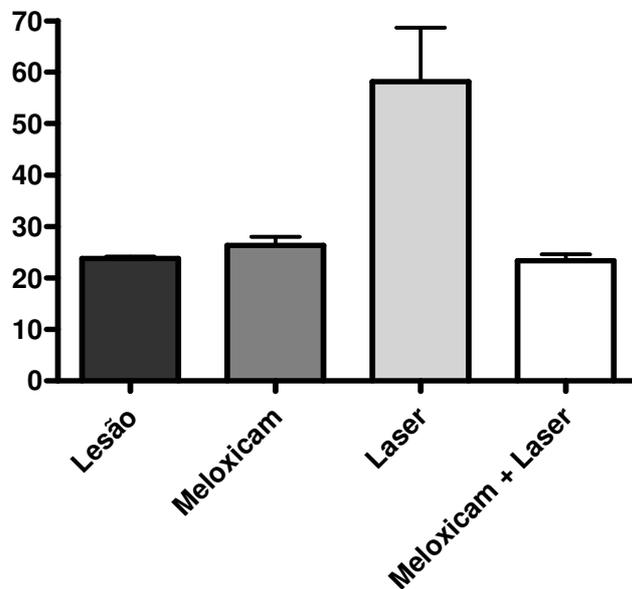


Figura 20: Comparação da quantificação de colágeno tipo III aos 7 dias de experimento entre os vários grupos avaliados (Kruskal-Wallis; $p = 0,1309$).

Colágeno Tipo III - 15 dias

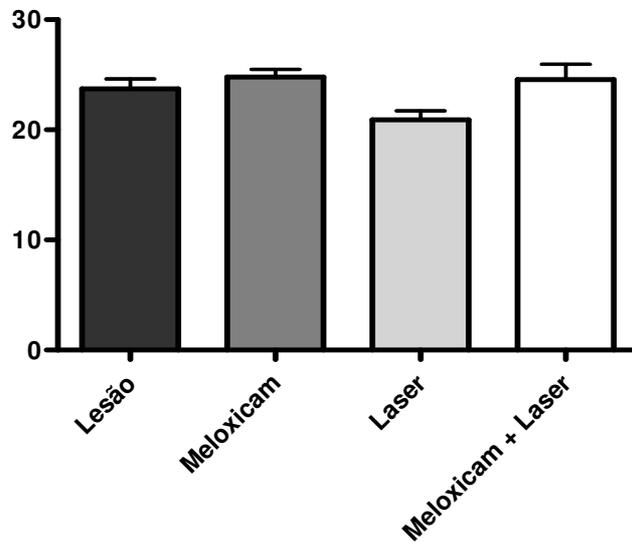


Figura 21: Comparação da quantificação de colágeno tipo III aos 15 dias de experimento entre os vários grupos avaliados (ANOVA; $p = 0,0459$).

Colágeno Tipo III

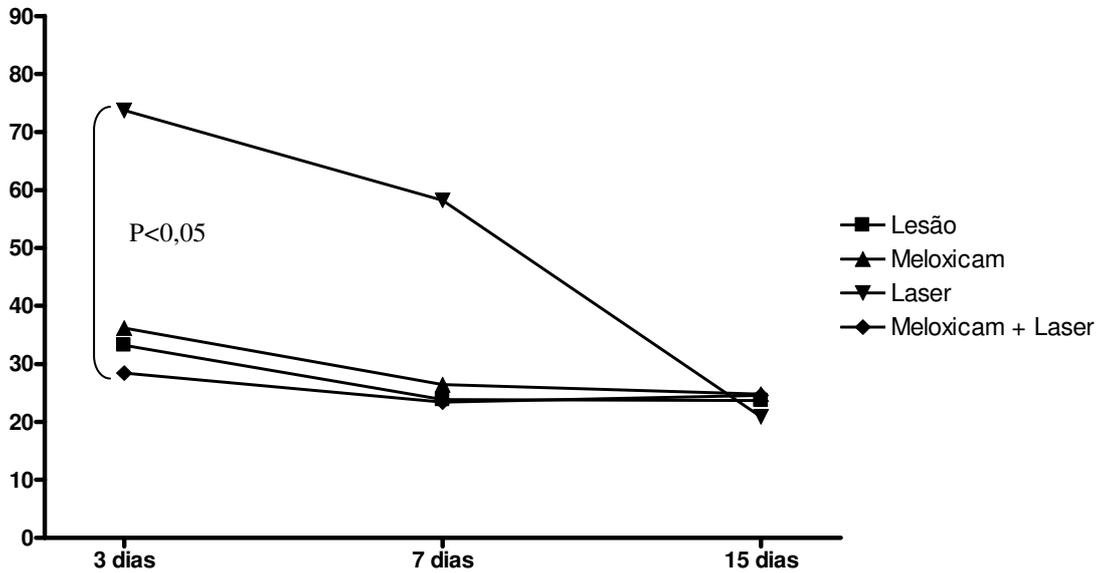


Figura 22: Variação do Colágeno Tipo III pelo tempo de avaliação de acordo com o grupo estudado. (Kruskal-Wallis; $p = 0,0266$).

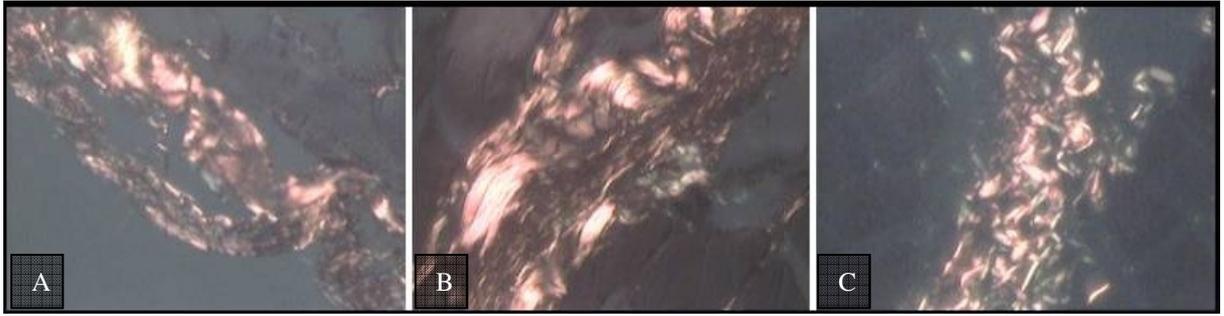


Figura 23: Imagens do grupo Lesão coradas com *Picrosirius Red*. Lente objetiva 40x com aumento de 400x. (A): lâmina do grupo de três dias. (B): lâmina do grupo sete dias. (C): lâmina do grupo quinze dias.



Figura 24: Imagens do grupo Laser coradas com *Picrosirius Red*. Lente objetiva 40x com aumento de 400x. (A): lâmina do grupo de três dias. (B): lâmina do grupo sete dias. (C): lâmina do grupo quinze dias.

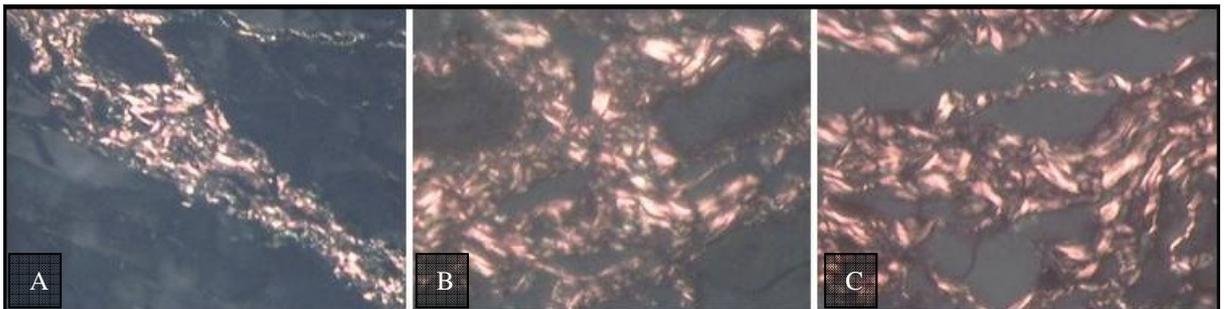


Figura 25: Imagens do grupo meloxicam coradas com *Picrosirius Red*. Lente objetiva 40x com aumento de 400x. (A): lâmina do grupo de três dias. (B): lâmina do grupo sete dias. (C): lâmina do grupo quinze dias.

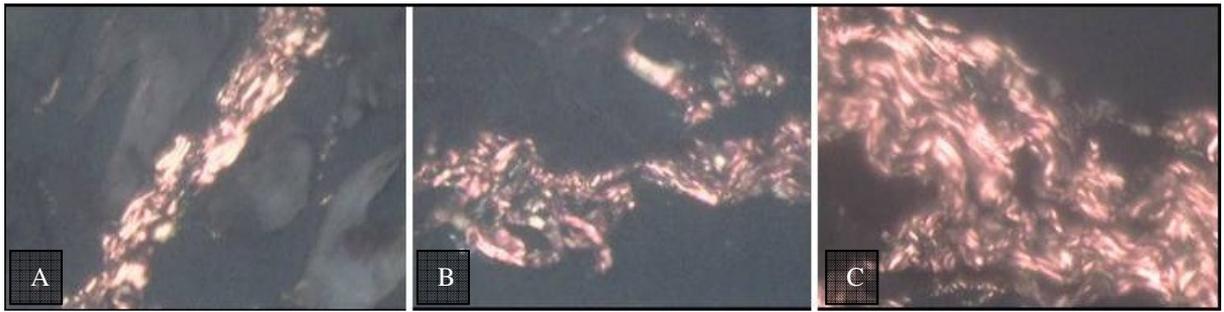


Figura 26: Imagens do grupo laser associado ao meloxicam coradas com *Picrosirius Red*. Lente objetiva 40x com aumento de 400x. (A): lâmina do grupo de três dias. (B): lâmina do grupo sete dias. (C): lâmina do grupo quinze dias.

6 DISCUSSÃO

O músculo esquelético é afetado por atividades esportivas e por traumas decorrentes de atividades de vida diária. A rápida recuperação através da manutenção de suas propriedades mecânicas é importante para o indivíduo com lesão muscular, em especial para atletas que necessitam de sua máxima eficiência durante as competições. (JARVINEN, *et al.* 2005).

O laser de baixa intensidade é um recurso de uso relativamente recente na terapêutica de lesões musculares, apresentando resultados satisfatórios ao analisar o processo de reparo das referidas lesões.

Os fármacos antiinflamatórios não esteroidais fazem parte dos grupos dos mais comercializados no mundo, e a sua utilização por parte do médico ortopedista faz parte da terapêutica das lesões musculares. Apresentam um amplo espectro de indicações terapêuticas, como: analgesia, anti-inflamação e antipirese. (KUMMER, *et al.*, 2002).

Este estudo teve como hipótese inicial a necessidade em determinar se a utilização de medicamento antiinflamatório e terapia laser são benéficos para o processo de reparo muscular pós-lesão traumática.

Sendo assim, o estudo foi baseado em um sistema de lesão muscular por mecanismo de impacto, com a liberação de peso sobre determinada altura. Neste estudo, optou-se por utilizar um mecanismo tem sido largamente utilizado em trabalhos com lesão muscular, por ser de fácil reprodutibilidade e excelente padronização das lesões obtidas. A escolha da carga 200 g e da

altura 30 cm foi determinada por estudos anteriores. O referido trabalho demonstrou, assim como os anteriores que, com a utilização de variáveis de carga e altura, pode-se observar a ocorrência de lesão muscular. (MINAMOTO;GRAZZIANO; SALVINI, 1994; MINAMOTO; BUNHO;SALVINI, 2001; RAHUSEN; WEINHOLD; ALMEKINDERS. 2008; OKUBO, 2009, SENE, 2005)

A utilização do modelo animal (Rato) foi devido às características vantajosas como a pronta, rápida e farta obtenção dos animais associada à facilidade de controle e manutenção em gaiolas, além da ótima aceitação de dieta e elevada resistência à infecção. Outro ponto, em virtude das similaridades anatômicas e biomecânicas entre o rato e o ser humano, é provável que os resultados obtidos nos estudos experimentais de cicatrização e reparo, utilizando esse animal, possam ser extrapolados para o homem. Justifica-se pelo fato de que para o tratamento clínico dos pacientes possa evoluir faz-se necessário associar os resultados obtidos com as avaliações clínicas, às alterações morfofisiológicas provocadas pelas diversas modalidades terapêuticas, informação esta que se torna mais viável de se obter por intermédio de estudos experimentais com animais e *in vitro*. (PIEADADE, 2010).

Dois eventos ocorrem durante a recuperação muscular: a regeneração tecidual em que células lesadas são substituídas por outras do mesmo tipo e a reparação em que a substituição do tecido perdido é feita por tecido cicatricial.

A musculatura esquelética de mamíferos adultos possui grande capacidade de adaptação às necessidades do organismo. Ele é capaz de se regenerar após diversos tipos de traumas graças às células mioprecursoras conhecidas como células satélites. Essas células atuam no crescimento muscular pós-natal, na regeneração de fibras musculares danificadas e na manutenção do músculo esquelético do indivíduo adulto.

O colágeno é o maior componente do tecido conjuntivo intramuscular, tendo este um importante papel na determinação da rigidez e elasticidade muscular. O tipo, o arranjo e o tamanho das fibras colágenas são de suma importância para manutenção da estrutura funcional do músculo. No músculo esquelético adulto, cinco tipos colágenos são encontrados: os tipos I, III, IV, V e VI, sendo os tipos I e III os predominantes embora haja variação das suas

concentrações de acordo com o músculo estudado, versando, ainda, que o tipo I predomina sobre o tipo III e que ambos têm grande importância na força tênsil tecidual e papel na limitação da elasticidade. (FISCHER, *et al.* 2000)

Nesse estudo encontrou-se boa proliferação de colágeno tipo I e tipo III, para o tipo I a partir do 7º dia em todos os grupos foi obtido aumento importante da proliferação. Sendo que os grupos com a utilização do meloxicam seguiram o padrão do grupo lesão, no entanto sem estatística significativa. Este fato torna-se motivo de preocupação, pois pode ser entendido como atraso no processo de proliferação do colágeno ao ser ministrado o meloxicam.

Mediante uma lesão tecidual, a lesão do tecido conjuntivo é certa, podendo resultar em complicações debilitantes e requerer um longo tempo de reabilitação. A organização do colágeno muscular no músculo sadio ou lesionado é de suma importância para a funcionalidade do músculo, podendo o excesso aliado à desorganização causar barreiras mecânicas que inibem a função e/ou regeneração muscular. (FISCHER *et al.* 2000).

Ao analisar os resultados do estudo atual verificou-se que o grupo lesão no terceiro dia tem a quantidade de colágeno tipo I significativamente menor em relação ao 7º e ao 15º dia. Segundo Fernandes; *et al.* (2012) a tendência durante o processo de reparo muscular é exatamente o que encontramos em nosso estudo para o grupo lesão, no início do processo cicatricial a proporção de colágeno tipo I é pequena e segue aumentando ao longo dos dias tendo o seu ápice a partir do 21º dia.

O grupo de análise de colágeno tipo I com o tratamento de meloxicam não demonstrou resultados estatisticamente significantes em nenhuma das comparações intra-grupo, contrariando a tendência demonstrada no grupo lesão. Chazaud, *et al.*(2008) relatam que o processo de reparo muscular conta com a presença de macrófagos durante a fase inicial pós lesão e que a diminuição da entrada de macrófagos no sítio da lesão pode retardar o processo de reparo. Almekinders, *et al.*; (1986) realizaram estudos com AINE durante o processo de reparo muscular e chegaram a conclusão que o uso dessa droga retarda a entrada de macrófagos no sítio da lesão e por consequência diminuição da produção de fatores de crescimento de mioblastos e fibroblastos desta forma diminuindo a força de tensão do tecido de reparo.

Fato este que coloca em dúvida quanto à utilização de meloxicam no tratamento da lesão muscular, pois, poderá prejudicar a funcionalidade muscular.

Os resultados do grupo tratado com laser e analisado à proliferação de colágeno tipo I demonstraram uma tendência inversa ao do grupo lesão principalmente no 3º e 7º dia. A aplicação de laser pode induzir tanto estimulação quanto inibição da formação de fibras musculares ou fibras colágenas. Este comportamento da utilização do LBI é dependente do tipo de laser, comprimento de onda, número de aplicações, distância da caneta ao tecido estimulado e da intensidade da irradiação utilizada. (KARU *et al*; 1995). O processo estimulatório ocorre com dose abaixo de 8J e o processo inibitório ocorre com doses acima de 8J. (VICENZO *et al*; 2001). Cressoni *et al*. (2008) avaliaram os efeitos do laser InGaAlP de 785nm com aplicação de 3.0 J por sessão em lesões musculares obtidas cirurgicamente e demonstraram quantitativamente que os grupos tratados com laser os leucócitos, polimorfonucleares e células mononucleares no infiltrado inflamatório no local da lesão foram menores do que os valores encontrados no grupo não irradiado. Por outro lado, o número de fibroblastos aumentou após oito sessões de tratamento. Quanto à regeneração das fibras musculares, após quatro sessões foi possível encontrar células musculares precursoras, tais como mioblastos e miotubos. Os resultados de Cressoni *et al*.(2008) corroboram com o do estudo atual que ocorre um aumento gradativo na proliferação colágeno, pois, foi utilizado a dose de 3 J.

A utilização do LBI no estudo atual alterou o padrão do reparo muscular encontrado no grupo lesão, demonstrando a forte influência que o LBI tem durante o processo de proliferação do colágeno. Os resultados do estudo atual tem demonstrado melhor organização entre a proliferação do colágeno tipo I e tipo III, esta influência sugere melhor organização no processo de reparo muscular pós lesão.

Jarvinen *et al*; (2000) descrevem as fases do processo de reparo muscular e é durante a fase de maturação e remodelamento (21 dias) que o colágeno tipo I esta em maior quantidade intramuscular para restaurar a capacidade funcional do músculo.

Quanto ao grupo meloxicam associado com laser, ao analisar o colágeno tipo I não foi encontrado resultado estatisticamente significante para a

análise intra-grupo. Este comportamento foi contra os resultados dos outros grupos que sempre tiveram grandes variações entre os dias analisados. Haedersdal *et al;*(1993) submeteram 120 ratos com feridas cirúrgicas a laser vapor de cobre (578 nm) a doses crescentes de 25,5; 31,8; 38,2 J/ cm² durante 27 dias, distribuídos em um grupo ao qual foi administrado antiinflamatório Cox-2 em baixas doses, outro que recebeu doses altas do mesmo medicamento e um terceiro participou como controle. Os resultados mostraram que o uso combinado de laser com antiinflamatório em altas doses retarda o processo de cicatrização e aumenta a concentração de tecido fibrótico.

Ao analisar o grupo laser associado com meloxicam no que tange a interação entre recursos terapêuticos ficou evidenciado que o meloxicam inibiu o efeito do LBI. Esta informação pode ser importante pois sugere uma desorganização no processo de reparo ao associar estes dois recursos, ficando a dúvida se é segura a interação entre laser e meloxicam.

Ao realizar a análise entre os grupos em função do tempo expresso em dias, foi observado que a expressão do colágeno tipo I esteve menor no 3° e 7° dias para o grupo irradiado com o laser e aumentando sua expressão a partir do 15° dia. Assis *et al;* (2012) realizaram um estudo com a aplicação de laser em ratos com lesão muscular induzida por criolesão, em sua conclusão relatam que o grupo irradiado com laser obteve diminuição da produção de colágeno tipo I e desta forma diminuindo o processo de fibrose.

Para a análise intragrupo do colágeno do tipo III do grupo lesão, foi encontrada diferença estatística apenas entre o grupo tratados com laser e a associação de meloxicam com laser (Figura 16). Souza *et al;* (2011) realizaram um estudo com a utilização de laser para o tratamento de criolesão no músculo tibial anterior de ratos foi realizado a técnica imunohistoquímica para a análise morfométrica da quantificação do colágeno tipo I e tipo III, porém, com resultados conflitantes quando comparados ao estudo atual principalmente para o colágeno tipo III, pois, quando foi comparado em relação aos dias (1°,7°, 14° e 21°) o colágeno tipo III obteve aumento em sua expressão com o passar dos dias, tendo o seu pico máximo no 21 dia em seres humanos.

O comportamento do colágeno tipo III no estudo em questão para a análise intragrupos de tratamento com laser foi compatível com o

comportamento demonstrado no grupo controle, onde a expressão do colágeno obteve diminuição estatisticamente significativa do 3° para o 7° dia e do 3° para o 15° dia. Este resultado é importante, pois, demonstra que existe uma inversão benéfica entre o colágeno tipo III e o colágeno tipo I, sendo que nos primeiros dias é extremamente necessária a presença do colágeno tipo III, pois as novas células tem sua arquitetura organizada pelo colágeno tipo III e após o 15° existe a necessidade de maior resistência à tração que culmina com o aumento da proliferação do colágeno tipo I.

Segundo Kaarianen *et al*, 2008 o colágeno tipo III está presente desde as fases iniciais do reparo e é gradativamente substituído pelo colágeno tipo I. Esta tendência foi repetida em todos os nossos grupos de tratamento, porém, nem todos com resultados estatisticamente significantes.

Nas análises entre os grupos em função temporal a única com resultado estatisticamente significativo foi o grupo laser com 3 dias de tratamento, porém após o 7° e o 15° dias as diferenças não demonstraram estatística significativa.

Este balanceio entre as proporções de colágeno encontrada no estudo atual pode ser importante se analisarmos a presença de fibrose no processo de reparo. Souza *et al*; (2011) relatam que o excesso de colágeno ao final do processo de reparo pode ser indicativo de fibrose, o que diminuiria a capacidade do músculo de sofrer tensão, levando a nova ruptura.

O conjunto dos resultados mostrou que o grupo tratado com meloxicam obedeceu a um padrão de reparo de fibras de colágeno tipo I e III semelhante ao grupo com nenhum tratamento (lesão), diferente do que foi observado no grupo tratado com laser, que apresentou diferença nos padrões de proliferação do colágeno tipo I e tipo III. Em relação à associação de laser e meloxicam no colágeno tipo I, houve também uma postura de semelhança ao grupo sem tratamento e o grupo tratado com meloxicam, demonstrando a ideia que em relação ao colágeno tipo I o meloxicam sobrepôs o efeito do laser, sugerindo que o pico de colágeno tipo I encontrado aos 15 dias no grupo laser associado ao meloxicam pode estar relacionado ao aumento de fibrose tecidual.

No entanto estes resultados não podem ser interpretados como verdade absoluta, pois, estudos com outros princípios ativos de medicamentos antiinflamatórios, outras densidades de energia do LBI e até mesmo com a

utilização de analgésicos devem ser realizados para maior conhecimento sobre a influência de formas de tratamento do processo de reparo e regeneração muscular.

7 CONCLUSÃO

O grupo tratado com laser mostrou diferença em relação ao colágeno tipo I que se mostrou significativamente menor do que os demais grupos no 3º dia de observação.

O grupo tratado com laser mostrou diferença em relação ao colágeno tipo III que se mostrou significativamente maior do que os demais grupos no 3º dia de observação.

A associação de laser e meloxicam e a aplicação de meloxicam apresentaram padrões semelhantes ao do grupo lesão.

8 REFERÊNCIAS

Almekinders LC, Gilbert JA: Healing of experimental muscle strains and the effects of nonsteroidal antiinflammatory medication. *Am J Sports Med.* 1986; 14: 303-308.

Almeida-Lopes L, Rigau J Zângaro RA, Guidugli-Neto J, Jaeger MMM. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. *Laser Surg Med* 2001 29:179-84.

Amaral AC, Parizzoto NA, Salvini TF, Dose-dependency of low-energy HeNe laser effect in regeneration of skeletal muscle in mice. *Laser Medicine Science.* 2001;16: 44-51.

Andrade ED. *Terapêutica Medicamentosa em Odontologia.* São Paulo/SP, Editora Artes Médicas, Divisão Odontológica, 2000;45-64.

Assis L, Moretti AIS, Abrahão TB, Souza HP, Hamblin MR, Parizotto NZ. Low-level laser therapy (808 nm) contributes to muscle regeneration and prevents fibrosis in rat tibialis anterior muscle after cryolesion. *Lasers Med sci.* 2012; 3-9.

Ben-Dov N, Shefer G, Irintchev A, Wernig A, Oron U, Halevy O. Low-energy laser irradiation affects satellite cell proliferation and differentiation in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1999; 1448: 372-80.

Bennell KL, Crossley K. Musculoskeletal injuries in track and field: incidence, distribution and risk factors. *Journal Sports Medicine Australia.* 1996; 28: 69-75.

Basford JR. Low intensity laser therapy: still not an established clinical tool. *Laser Surg Med* 1995 16:331-42.

Brooks P, Emery E, Evans F. Interpreting the clinical significance of the differential inhibition of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2. *Rheumatology*, 1999;38:779-788.

Carneiro CG, Sennes LU, Saldiva PHN, Tsuji DH, Ximenes Filho JA. Avaliação da deposição de colágeno após implante de fásia lata e de gordura na prega vocal de coelho: estudo histomorfométrico. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2005; 71(2): 798-802.

Charge SB, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev* 2004 84(1):209-38.

Chazaud B, Sonnet C, Lafuste P, et al. Satellite cells attract monocytes and use macrophages as a support to escape apoptosis and enhance muscle growth. *J Cell Biol*. 2003; 163:1133-1143.

Clebis NK, Natali MRM. Lesões musculares provocadas por exercícios excêntricos. *Revista brasileira de ciência e movimento*, 2001; 9(4): 47-53.

Cressoni MD, Dib Giusti HH, Casarotto RA, Anaruma CA. The effects of a 785 Mn AlGaInP laser on the regeneration of rat anterior tibialis muscle after surgically induced injury *Photomed Laser Surg*. 2008 Sep 18.

Costardi CHZ, Tamachiro C, Esteves IJ, Gomes AC. Efeito do laser de baixa intensidade (670nm) após contusão muscular em ratos. *Fisioterapia em Movimento*. 2008; 21(2): 21-30.

Cotton AM. A review of the principles and use of lasers in lower limb problems. *Lower Extremity Wounds* 2004 3(3):133-42.

Distel M, Mueller C, Bluhmki E, Fries J. Safety of meloxicam: A global analysis of clinical trials. *Br J Rheumatol*. 1996; 35(1): 68-77.

Dubois R, Abramson S, Crofford L. Cyclooxygenase in biology and disease. *Faseb J*. 1998;12:1063-1088.

Engelhardt G. Pharmacology of meloxicam, a new non-steroidal anti-inflammatory drug with an improved safety profile through preferential inhibition of COX-2. *Br J Rheumatol.* 1996a;35(suppl.1):4-12.

Engelhardt G, Bogel R, Schnitzer CHR, Utzman R. Meloxicam: Influence on arachidonic acid metabolism. *Biochemical Pharmacology.* 1996; 51: 21-29.

Engert JC, Berglund EB, Rosenthal N. Proliferation precedes differentiation in IGF-I-stimulated myogenesis. *Journal of Cell Biology* 1996 Oct;135(2):431-40.

Fisher BD, Rennie S, Warren S, Magee D, Koh J. The effects of low power laser therapy on muscle healing following acute blunt trauma. *Journal of Physical Therapy Science.* 2000; 12: 49-55.

Fernades TL, Pedrinelli A. Entendendo as bases da lesão muscular. *Ver Bras Med.* 2011; 68: 17-23.

Fische BD, Rennie S, Warren S, Magee D, Koh J. The effects of low power laser therapy muscle healing following acute blunt trauma. *J Phys Ther Sci* 2000;12(1):49-55.

Florini JR, Ewton DZ, Coolican SA. Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis. *Endocrine Reviews* 1996 Oct;17(5):481-517.

Garrett WE Jr, Best TM. Anatomy, physiology, and mechanics of skeletal muscle. In: Simon SR, editor. *Orthopaedic basic science.* Rosemont, IL: American Academy of Orthopaedic Surgeons; 1994: 89-125.

Ghadially FN. Extracellular matrix, *Ultrastructural Pathology of the cell and matrix.* 1997; 4 : 1307-1399.

Gurgel BCV. Influência do meloxicam sobre a perda óssea alveolar em periodontite experimental: Avaliação histométrica em ratos. Piracicaba. SP. 2003. 98p. Dissertação. UNICAMP.

Grote K, Lincoln TL, Gamble JG. Hip Adductor Injury in Competitive Swimmers. *American Journal of Sports Medicine*. 2008; 32(1): 104-108.

Haedersdal M, Poulsen T, Wulf HC. Laser Induced Wounds and Scarring Modified by Antiinflammatory Drugs: a murine model. *Lasers in Surgery and Medicine* 1993;13:55-61.

Hawkey C, Kahan A, Steinbruck K, Alegre C, Baumelou E, Bégaud B. Gastrointestinal tolerability of meloxicam compared to diclofenacin osteoarthritis patients. *Br J rheumatol*. 1998; 37: 937-945.

Hawkins D, Metheny J. Overuse injuries in youth sports: biomechanical considerations. *Medicine & Science in Sports & Exercise*. 2001; 33: 1701-1707.

Hayashi S, Aso H, Watanabe K, Nara H, Rose MT, Ohwada S. Sequence of IGF-I, IGF-II and HGF expression in regenerating skeletal muscle. *Hist Cell Biol* 2004 Nov;122(5):427-34.

Hootman JM, Macera CA, Ainsworth BE, Martin M, Addy CL, Blair SN. Predictors of lower extremity injury among recreationally active adults. *Clinical journal of sport medicine*. 2002; 12(2): 99-106.

Huard J, Li Y, Fu FH. Muscle injuries and repair: current trends in research. *Journal of Bone Joint and Surgery American*. 2002; 84(5): 822-832.

Huijings PA. Muscle, the motor of movement: properties in function, experiment and modelling. *J Electromyogr Kinesiol* 1998 Apr;8(2):61-77. Review.

Inflammatory Phase of Skeletal Muscle Healing After Injury. *Journal of cellular physiology*. 2008; 214: 404-412.

Järvinen TA, Järvinen TL, Kääriäinen M, Aärimaa V, Vaittinen S, Kalimo H, Järvinen M. Muscle Injuries: optimizing recovery. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2007 Apr; 21(2):317-31. Review.

Jarvinen TA, Jarvinen TL, Kaariainen M, Kalimo H, Jarvinen, M. Muscle injuries: biology and treatment. *American Journal of Sports Medicine*. 2005; 33: 745-64.

Jarvinen TAH, Kaariainen M, Jarvinen M, Kalimo H. Muscle strain injuries. *Current Opinion in Rheumatology* 2000 Mar; 12(2):155-61.

Kaariainen M, Jarvinen T, Jarvinen M, Rantanen J, Kalimo H. Relation between myofibers and connective tissue during muscle injury repair. *Scand J Med Sci Sports* 2000 Dec;10(6):332-7.

Karu TI. Photobiological fundamentals of low power laser therapy. *IEEE J Quantun Elect* 1987 10:1703-19.

Karu T, Pyatibrat L, Kalendo G. Irradiation with He-Ne laser increase ATP level in cells cultivated in vitro. *Journal Photochemistry and Photobiol*.1995; 27: 219-223.

Karu TI, Pyatibrat LV, Polyakov SF, Afanasyeva NI. Absorption measurements of a cell monolayer relevant to phototherapy: reduction of cytochrome c oxidase under near IR radiation. *J Photoch and Photob* 2005 81:98-106.

Kaariainen M, Jarvinen T, Jarvinen M, Rantanen J, Kalimo H. Relation between myofibers and connective tissue during muscle injury repair. *Scand J Med Sci Sports*. 2000; 10: 332-337.

Kannus P, Parkkari J, Jarvinen TL, Jarvinen TA. Basic science and clinical studies coincide: active treatment approach is needed after a sports injury. *Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports*. 2003; 13: 150-154.

Klebanov GI, Kreinina MV, Poltanov EA, Khristoforova TV, Vladimirov YA. Mechanism of therapeutics effect of low-intensity infrared laser irradiation. *Bull Exper Boil Med* 2001 131(3):286-89.

Kettunen JA, Kujala UM, Kaprio J, Koskenvuo M, Sarna S. Lower-limb function among former elite male athletes. *American Journal of Sports Medicine*. 2001; 29: 2-8.

Kivi P, Aho H, Järvinen M. Tennis leg - calf muscle rupture of the middle-aged tennis aficionado. *Duodecim* 2009 125(16):1741-3.

Kivirikko KI, Myllyla R. Bioynthesis of the collagen. *Extracellular Matriz Biochemistry*. 1982: 83-118.

Kummer CL, Coelho TCRB. Anttinflamatórios não esteroides inibidores da ciclooxigenase-2 (COX-2): aspectos atuais. *Rev Bras Anestesiol*. 2002; 52(4): 498-512.

Lara PM. Os eicosanóides nos processos inflamatórios. In: Fascículo de atualização farmacológica da inflamação, Vol. II. Bios Comunicação e Editora Ltda, 1998.

Luger EJ, Rochkind S, Wollman Y, Kogan G, Dekel S. Effect of low-power laser irradiation on the mechanical properties of bone fracture healing in rats. *Lasers in surgery and medicine*. 1998; 22(2): 97-102.

Manteifel VM, Karu TI. Structure of mitochondria and activity of their respiratory chain in successive generations of yeast cells exposed to He-Ne laser light. *Biol Bull* 2005 32(6):556-66.

Martin R. Laser-accelerated inflammation/pain reduction and realigning. *Practical Pain Management*. 2003; 3(6): 20-25.

Mester A, Mester AF, Mester A. The biomedical effects of laser application. *Lasers in Surgery and Medicine*. 1985; 5(1): 31-39.

Mester E, Szende B, Tota JG. Effect of laser rays on wound healing. *American Journal of Surgery*. 1971; 122(5): 532-535.

Minamoto VB, Bunho SR, Salvini TF. Regenerated rat skeletal muscle after periodic contusions. *Braz J Med Biol Res*. 2001; 34(11): 1447-1452.

Minamoto VB, Grazziano CR, Salvini TF. Effect of single and periodic contusion on the rat *soleus* muscle at different stages of regeneration. *The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology*. 1999; 254(2): 287-291.

Minamoto VB, Bunho SR, Salvini TF. Regenerated rat skeletal muscle after periodic contusions. *Braz J Med Biol Res*. 2001; 34(11): 1447-1452.

Moisala AS, Järvelä T, Kannus P, Järvinen M. Muscle strength evaluations after ACL reconstruction. *Int J Sports Med* 2007 Oct;28(10):868-72.

Noble S, Balfour JA. Meloxicam: new drug profile. *Drugs*. 1996; 51(3): 424-430.

Okubo R. Análise funcional biomecânica e histológica de músculos gastrocnêmios de ratas submetidos à lesão experimental e tratados por eletroacupuntura. Ribeirão Preto, SP, 2009. 104 p. Dissertação – Universidade de São Paulo.

Oliveira FB. O ultrassom terapêutico associado à imobilização gessada nas propriedades mecânicas reparação muscular pós-trauma por mecanismo de impacto. Ribeirão Preto, SP, 2004. 126p. Tese – Programa interunidades em Bioengenharia EESC/FMRP/IQSC. Universidade de São Paulo.

Oliveira NL. Efeito dos extratos de própolis brasileira sobre a cicatrização de queimaduras dérmicas profundas. Aracaju, SE. 2010. 64.p. Dissertação. Universidade Tiradentes.

Pastre CM, Carvalho GF, Monteiro LH, Netto JJ, Padovani CR. Lesões desportivas na elite do atletismo brasileiro: estudo a partir de morbidade referida. Revista Brasileira de Medicina do Esporte. 2005; 11(1): 43-47.

Piedade MCB. Avaliação estrutural, estereológica e biomecânica do efeito da aplicação do ultrassom no reparo de lesão lacerativa experimental do gastrocnêmio de rato. São Paulo. SP. 2010. 166.p. TESE. Universidade de São Paulo.

Powers e Howley, Fisiologia do Exercício: Teoria e aplicação ao Condicionamento e ao Desempenho. Barueri – SP – Brasil: Manole Ltda, 2000.

Pugliese LS, Medrado AP, Reis SR, Andrade Zde A. The influence of low-level laser therapy no biomodulation of collagen and elastic fibers. Pesqui Odontol Bras. 2003 Oct-Dec;17(4):307-13.

Rahusen FTG, Weinhold PS, Almekinders LC. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and acetaminophen in the treatment of an acute muscle injury. American Journal of sports Medicine. 2004; 32(8): 1856-1859.

Ribeiro FAQ, Borges JP, Zaccbi FFS, Guaraldo L. Clinical and histological healing of surgical wounds treated with mitomycin C. Laryngoscope. 2004; 114(1): 148-152.

Rich L, Whittaker P. Collagen and picrosirius red staining: a polarized light assessment of fibrillar hue and spatial distribution. *Braz. J. morphol. Sci.* 2005; 22(2) : 97-104.

Rigato HM. Estudo de bioequivalencia entre duas formulações de meloxicam em voluntários sadios de ambos os sexos. Campinas. SP. 69p. 2005. Dissertação. UNICAMP.

Rizzi CF, Mauriz JL, Correa DSF, Moreira AJ, Zettler CG, Fillipin LI, Marroni NP, Gallego JG. Effects of Low-Level Laser Therapy (LLLT) on the Nuclear Factor (NF)- κ B Signaling Pathway in Traumatized Muscle. *Lasers in Surgery and Medicine.* 2006;38: 704-713.

Rochkind S, Quaknine GE, New trend in neuroscience: low power laser effect on peripheral and central nervous system (basic science, pre-clinical and clinical studies). *Neurological Research.* 1992; 14(1): 2-11.

Rochind S, Quaknine GE. New trend in neuroscience: low-power laser effect on peripheral and central nervous system (basic science, preclinical and clinical studies). *Neurol Res* 1992 14:2-11.

Rolls A, George K. The relationship between hamstring muscle injuries and hamstring muscle length in young elite footballers. *Physical Therapy in Sport.* 2004; 5: 179-184.

Sene GL. Influência do laser de baixa intensidade nas propriedades mecânicas do músculo gastrocnêmio submetido à lesão muscular por mecanismo de impacto. São Carlos, SP, 2005. 15-40 p. Dissertação – Bioengenharia – Escola de Engenharia de São Carlos.

Shefer G, Barash I, Oron U, Halevy O. Low-energy laser irradiation enhances de novo protein synthesis via its effects on translation-regulatory proteins in

skeletal muscle myoblasts. Biochimica et Biophysica Acta. 2003; 1593: 131-139.

Shefer G, Oron U, Irintchev A, Wernig A, Oron U, Halevy O. Skeletal muscle cell activation by lowenergy laser irradiation: A role for the MAPK/ERK pathway. *Journal of Cellular Physiology*. 2001; 187: 73-78.

Shefer G, Partridge TA, Heslop L, Gross JG, Oron U, Halevy O. Low-energy laser irradiation promotes the survival and cell cycle entry os skeletal muscle satellite cells. *Journal of Cell Science*. 2002; 115: 1461-1469.

Shen W, Li Y, Zhu J, Schwendener R, Huard J. Interaction Between Macrophages, TGF-b1, and the COX-2 Pathway During the Stratton SA, Heckmann R, Francis RS. Therapeutic ultrasound, its effects on the integrity of a nonpenetrating wound. *Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy*. 1984; 5: 278-281.

Snyder SK, Byrnes KR, Broke RC, Sanches A, Anders JJ. Quantitation of calcitonin gene-related peptide mRNA and Neuronal cell death in facial motor nuclei following axotomy and 633 nm low power laser. *Laser Surg Med* 2002 31:216-22.

Souza TOF, Mesquita DA, Ferrari RAM, Pinto Jr DS, Correa L, Bussadori SK, Fernandes KPS, Martins MD. Phototherapy with low-level laser affects the remodeling os types I and III collagen in Skeletal muscle repair. *Lasers Med Sci*. 2011; 26: 903-814.

Takala TE, Virtanen P. Biochemical composition of muscle extracellular matrix: the effect of loading. *Scand J Med Sci Sports*. 2000; 10:321-325.

Tognini JRF. Estudo biomecânico e morfológico da cicatrização da parede abdominal de ratos sob ação de meloxicam. São Paulo, SP, 1999.11.p. Tese – Medicina – Universidade Federal de São Paulo.

Vladimirov YA, Osipov AN, Klebanov GI. Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation. *Biochemistry* 2004 69(1):89-90.

Van Brelgel HH, Bar PR. He-Ne laser irradiation affects proliferation of cultured rat Schwann cells in a dose-dependent manner. *Journal of Neurocytology*. 1993; 22(3): 185-190.

Vane JR, Botting RM. New insights into the mode of action of anti-inflammatory drugs. *Inflamm Res*. 1995;44:1-10.

Vicenzo G. influência do laser de baixa energia no processo de consolidação de fraturas de tíbia: estudo experimental em ratos. *Revista Brasileira de Ortopedia*. 2001; 36: 174-178.

Warren GL, Hulderman T, Jensen N, McKintry M, Mishra M, Lustre MI. Physiological role of tumor necroses factor alpha In traumatic muscle injury. *Faseb J* 2002 Aug;16(10):1630-7.

Weiss N, Oron U. Enhancement of muscle regeneration in the rat gastrocnemius muscle by low energy laser irradiation. *Anatomy and Embryology*. 1992; 186(5): 467-503.

Yaakobi T, Maltz I, Oron U. Promotion of bone repair in the cortical bone of the tibia in rats by low energy laser (HeNe) irradiation. *Calcified Tissue International*. 1996; 59(4): 297-300.

ANEXO

ANEXO A - PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº 291 do Mestrando Gabriel Bogalho Nogueira, sob a orientação do Prof. Dr. João Ricardo Filgueiras Tognini , referente ao projeto de pesquisa, “O efeito do meloxicam associado com laser na terapêutica de lesões musculares de ratos”, está de acordo com os princípios éticos adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), com a legislação vigente e demais disposições da ética em investigação que envolvem diretamente os animais e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA/UFMS, em reunião de 11 de março de 2011.

Campo Grande (MS), 11 de março de 2011.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Joice Stein', is written over the printed name.

Dr^a Joice Stein
Coordenadora da CEUA