

DANIELA APARECIDA SUSSAI

ANÁLISE DOS NÍVEIS DE CREATINA KINASE SÉRICA E
DA APOPTOSE CELULAR NO MÚSCULO
GASTROCNÊMIO DE RATOS SUBMETIDOS A
NATAÇÃO FORÇADA E TRATADOS COM LASER DE
BAIXA POTÊNCIA (660nm)

Campo Grande,
2008

DANIELA APARECIDA SUSSAI

ANÁLISE DOS NÍVEIS DE CREATINA KINASE SÉRICA E
DA APOPTOSE CELULAR NO MÚSCULO
GASTROCNÊMIO DE RATOS SUBMETIDOS A
NATAÇÃO FORÇADA E TRATADOS COM LASER DE
BAIXA POTÊNCIA (660nm)

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

Área de Concentração: Tecnologia e Saúde
Orientador: Prof. Dr. Paulo de Tarso Camillo de Carvalho

Campo Grande,
2008

FOLHA DE APROVAÇÃO

SUSSAI, D.A. Análise dos níveis de creatina kinase sérica e da apoptose celular no músculo gastrocnêmio de ratos submetidos a natação forçada e tratados com laser de baixa potência (660nm) [Dissertação Mestrado]. Campo Grande: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul; 2008

Campo Grande, ____/____/____

Banca Examinadora:

1) Prof (a). Dr (a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

2) Prof (a). Dr (a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

3) Prof (a). Dr (a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar presente em todos os momentos da minha vida, guiando meus passos e me dando forças para continuar sempre que pensei em desistir.

Ao Prof. Dr. Paulo de Tarso Camillo de Carvalho , não só pela orientação deste trabalho mas, sobretudo, pela compreensão das minhas limitações.

Ao Prof. Ms. Luís Ferreira Monteiro Neto, por sua amizade e por depositar sua confiança em mim.

À Prof^a Doroty Mesquita Dourado, sempre prestativa para contribuir com a construção do meu trabalho.

À amiga Ana Paula, a quem devo muito por ter me ajudado em todo processo experimental deste trabalho.

Ao meu amor Renan, pela sua incontestável compreensão e companheirismo, e por proporcionar esse momento maravilhoso que estou vivendo à espera do nosso primeiro filho, nosso querido Davi, que hoje já é o meu maior incentivo.

Em especial à minha família, pela força que sempre deram e presença constante nas minhas empreitadas.

RESUMO

Estudos recentes sugerem que o exercício físico de alta intensidade pode provocar alterações danosas no músculo esquelético tais como, dor, fadiga, processo inflamatório e apoptose celular. O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos do Laser de Baixa Potência (LLLT), 660nm na diminuição dos níveis de Creatina Kinase (CK) e na apoptose celular no músculo gastrocnêmio de ratos submetidos a natação forçada. Material e método: Vinte ratos Wistar machos (300 ± 50 g) foram utilizados e divididos aleatoriamente em dois grupos (n = 10): Grupo 1 – Controle - ratos submetido à natação forçada; Grupo 2, ratos submetido a natação forçada tratados com LLLT; os grupos foram ainda subdivididos conforme o período de coleta das amostras 24 e 48 horas. Os animais foram submetidos à natação forçada até o momento que os animais não conseguissem nadar por tempo de 10 s; após o exercício foi realizada uma única aplicação de laser InGaAlP, densidade de potência de 100 mW, comprimento de onda (λ) de 660 nm e densidade de energia de 4 joules cm^2 . O nível de CK foi verificado 48 horas antes da realização do exercício e após 24 e 48 do teste de natação forçada. Os animais foram submetidos à eutanásia e amostras do músculo gastrocnêmio processadas para verificação da presença de apoptose pela técnica *TUNEL*. Resultados: Obteve-se uma diminuição dos níveis de CK do grupo tratado com LLLT comparado com o grupo controle e na análise estatística pela ANOVA apresenta diferença significativa entre os grupos ($p < 0,0001$), no *post hoc* test de Tukey's demonstra diferença significativa entre o grupo controle quando comparado ao grupo LLLT, após 24 e 48 horas ($p < 0,001$); na contagem de células apoptóticas obteve-se diferença estatística ($p < 0,001$) no cruzamento do grupo controle e tratado com LLLT. Conclusão: Os resultados deste estudo sugerem que o LLLT influenciou o perfil metabólico do CK, diminuindo o nível sérico. Os achados também demonstram que o LLLT pode atuar como preventivo da apoptose celular.

Palavras Chave: Células Musculares, Apoptose, Creatina Kinase.

ABSTRACT

Recent studies suggest that the exercise of high intensity can cause harmful changes in skeletal muscle such as pain, fatigue, inflammatory process and cellular apoptosis. This study aimed to investigate the effects of the Low Power Laser (LLLT), 660nm in decreased levels of Creatine Kinase (CK) and cellular apoptosis in gastrocnemius muscle of rats subjected to forced swimming. Materials and methods: Twenty male rats (300 ± 50) were used and randomly divided into two groups (n = 10): Group 1 - Control - rats subjected to forced swimming, Group 2, rats subjected to forced swimming treated with LLLT; the groups were further divided as the period of collection of samples 24 and 48 hours. The animals were submitted to forced swimming so far that the animals failed to swim for 10s; after the exercise was carried out a single application of laser InGaAlP, density of 100 mW of power, wavelength (λ), 660 nm and an energy density of 4 cm² joules. The CK level was found 48 hours before the beginning of the exercise and after 24 and 48 of forced swimming test. The animals were subjected to euthanasia and samples of the gastrocnemius muscle processed for verification of the presence of apoptosis by TUNEL technique. Results: It had a decrease in levels of CK in the group treated with LLLT compared with the control group and the statistical analysis by ANOVA presents significant difference between groups ($p < 0,0001$), at *post hoc* Tukey's test shows a significant difference between the control group when compared to the LLLT group, after 24 and 48 hours ($p < 0001$); the counting of apoptotic cells returned to statistical difference ($p < 0001$) at the intersection of the control group and treated with LLLT. Conclusion: The results of this study suggest that the LLLT influenced the metabolic profile of CK, reducing the serum. The findings also show that LLLT can act as a preventive of cellular apoptosis.

Key words: Muscle cells, Apoptosis, Creatine Kinase.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|------------|---|----|
| Figura 1. | Distinção das diferentes alterações morfológicas nos processos de morte celular por apoptose versus necrose..... | 21 |
| Figura 2. | Figura ilustrativa do processo de indução da fadiga muscular: A – Tanque utilizado para a natação dos animais; B – Natação dos animais..... | 24 |
| Figura 3. | Figura ilustrativa do processo de punção cardíaca | 25 |
| Figura 4. | Figura ilustrativa da dissecação do músculo gastrocnêmio..... | 25 |
| Figura 5. | Gráfico comparativo das médias e desvio padrão de CK entre os grupos tratados com LLLT e não tratados (controle)..... | 29 |
| Figura 6. | Gráfico comparativo das médias e desvio padrão de CK entre os grupos tratados com LLLT e não tratados (controle) 24 horas após o exercício de natação forçada..... | 29 |
| Figura 7. | Gráfico comparativo das médias e desvio padrão de CK entre os grupos tratados com LLLT e não tratados (controle) 48 horas após o exercício de natação forçada..... | 30 |
| Figura 8. | Gráfico comparativo das médias e desvio padrão da apoptose obtidas pelo método TUNEL entre os grupos tratados com LLLT e não tratados (controle) 24 e 48 horas após o exercício de natação forçada. | 32 |
| Figura 9. | Gráfico comparativo das médias e desvio padrão da apoptose obtidas pelo método TUNEL entre os grupos tratados com LLLT e não tratados (controle) 24 horas após o exercício de natação forçada..... | 32 |
| Figura 10. | Gráfico comparativo das médias e desvio padrão da apoptose obtidas pelo método TUNEL entre os grupos tratados com LLLT e não tratados (controle) 48 horas após o exercício de natação forçada..... | 33 |
| Figura 11. | Fotomicrografia do corte histológico grupo controle 24 horas, onde podemos observar núcleos de células em apoptose..... | 33 |

| | | |
|------------|---|----|
| Figura 12. | Fotomicrografia do corte histológico grupo controle 48 horas, onde podemos observar núcleos de células em apoptose..... | 34 |
| Figura 13. | Fotomicrografia do corte histológico grupo laser 24 horas, onde podemos observar núcleos de células em apoptose..... | 34 |
| Figura 14. | Fotomicrografia do corte histológico grupo laser 48 horas, onde podemos observar núcleos de células em apoptose..... | 35 |

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Valores obtidos por meio da análise da creatina kinase sérica, valores expressos em média e desvio padrão para os grupos controle e grupo tratado com LLLT..... 28
- Tabela 2. Valores obtidos pela histomorfometria do músculo gastrocnêmico de ratos para células positivas ao TUNEL , expressos em média e desvio padrão para os grupos controle e grupo tratado com LLLT..... 31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AsGaAl - Arsenieto Gálio – Alumínio

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

CK - Creatina Kinase

cm² - centímetro quadrado

DNA - Ácido desoxirribonucléico

EROs - Espécies Reativas de Oxigênio

FM - Fadiga Muscular

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

HeNe - Hélio e Neônio

InGaAlP - Fosfeto Índio-Gálio-Alumínio

J/cm² - Joules por centímetro quadrado

LASER – Luz amplificada por emissão estimulada de radiação

LDH - lactato desidrogenase

LLLT – Laserterapia de baixa intensidade

mg/Kg - miligramas por quilo

mtDNA – DNA mitocondrial

mW- miliwats

mW/cm² - miliwats por centímetro quadrado

nm - nanômetros

NADH - nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida

O₂^{·-3/4} - ânion superóxido

OH - radical hidróxil

RNA - Ácido Ribonucleico

UFMS – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

UNIDERP - Universidade Para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal

TUNEL - Terminal Deoxyribonucleotidyl Transferase mediated dUTP nick end Labeling

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| RESUMO | 6 |
| ABSTRACT | 7 |
| LISTA DE FIGURAS | 8 |
| LISTA DE TABELAS | 10 |
| LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS | 11 |
| SUMÁRIO | 12 |
| | |
| 1 INTRODUÇÃO | 13 |
| 1.1 Laserterapia- Fotobioestimulação..... | 15 |
| 1.2 Exercício Físico e Lesão Muscular..... | 17 |
| 1.3 Fadiga Muscular..... | 19 |
| 1.4 Exercícios e Apoptose Celular..... | 20 |
| | |
| 2 OBJETIVOS | 22 |
| 2.1 Gerais..... | 22 |
| 2.2 Específicos..... | 22 |
| | |
| 3 MATERIAL E MÉTODO | 23 |
| 3.1 Animais de Experimentação..... | 23 |
| 3.2 Grupos Experimentais..... | 23 |
| 3.3 Protocolo de Exercício por meio da natação forçada..... | 23 |
| 3.4 Aplicação da Laserterapia..... | 24 |
| 3.5 Verificação da Creatina Kinase..... | 24 |
| 3.6 Eutanásia..... | 25 |
| 3.7 Verificação da Apoptose “in situ” pelo método TUNEL (terminal deoxyribonucleotidy1 transferase mediated dUTP nick end labelling)..... | 26 |
| 3.8 Análise Histomorfométrica..... | 26 |
| 3.9 Análise Estatística..... | 27 |
| | |
| 4 RESULTADOS | 28 |
| 4.1 Atividade da Creatina Kinase Sérica..... | 28 |

| | |
|--|-----------|
| Verificação da Apoptose pelo TUNEL..... | 30 |
| 5 DISCUSSÃO..... | 36 |
| 6 CONCLUSÃO..... | 41 |
| 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 42 |
| 8 ANEXOS..... | 53 |

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas os efeitos benéficos e nocivos do exercício físico têm sido alvo de discussão entre diversos pesquisadores. A procura do corpo perfeito ou mesmo a melhora na qualidade de vida tem feito com que muitas pessoas ultrapassem os limites fisiológicos do corpo desencadeando lesões.

Nas atividades de vida diária, no trabalho e no esporte a fadiga muscular apresenta-se muitas vezes como limitante do desempenho humano, e causadora de lesões em diversos níveis do sistema músculo-esquelético (WOLEDGE, 1998).

A fadiga muscular (FM), definida como qualquer redução na capacidade do sistema neuromuscular de gerar força, é um fenômeno comum em esportes de resistência e é uma experiência usual nas atividades diárias (TAYLOR et al., 2000).

A lesão muscular pode ser induzida através do exercício físico. Entre os fatores propostos como responsáveis por essa lesão estão: o estresse mecânico, o estresse oxidativo, o distúrbio da homeostasia do cálcio intracelular e a resposta inflamatória (CLARKSON; SAYERS, 1999). Os fatores mecânicos e oxidativos iniciam a lesão e alguns mediadores inflamatórios exacerbam a mesma nos dias que se seguem ao exercício (CLARKSON; SAYERS, 1999).

A ruptura do sarcolema permite o extravasamento do conteúdo intracelular, causando o aparecimento de enzimas, proteínas e fragmentos de proteína no sangue. Entre estes marcadores de lesão tecidual destacam-se a creatina kinase (CK), lactato desidrogenase (LDH), mioglobina, troponina I e fragmentos de miosina. Sendo assim, verificar o aparecimento destas enzimas no sangue serve como indicador de lesão tecidual (NOSAKA; NEWTON, 2002).

O desencadeamento da lesão pode ainda estar relacionado com a presença de espécies reativas de oxigênio (EROs), elevação da temperatura e a diminuição do pH resultante do acúmulo de ácido láctico gerado durante o exercício (SMOLKA et al., 2000; KREGEL, 2002)

A lesão muscular decorrente do estresse oxidativo tem sido relacionada com a presença de EROs tais como: ânion superóxido ($O_2^{\cdot -}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidróxil (OH) produzidos em resposta ao consumo elevado de oxigênio pela mitocôndria durante os exercícios de alta resistência ou excêntricos (SEN, 2001; TIIDUS, 1998). Por outro lado, a ativação da xantina oxidase também tem sido apontada como um importante sítio gerador de radicais livres (VIÑA et al., 2000).

Os oxidantes podem indiretamente induzir a ocorrência de apoptose celular. A alta produção de EROs é responsável por várias ações deletérias, dentre as quais estão: o aumento nos níveis de peroxidação de lipídios de membranas (ALESSIO, 1993), aumento na carbonilação de proteínas e até danos ao DNA (Ácido desoxirribonucléico) intracelular (RADAK et al., 1999), o que em última instância altera e prejudica o metabolismo intracelular, podendo inclusive ocasionar morte celular (HALLIWELL ; GUTTERIDGE, 1989).

Várias pesquisas têm demonstrado a presença de mecanismos de defesa do músculo esquelético frente às alterações causadas pelo exercício. Alterações na atividade das enzimas anti-oxidantes (JI, 1995; TIIDUS, 1998; POWERS; LENNON, 1999) em resposta a presença de espécies reativas de oxigênio.

Diversos relatos apontam resultados satisfatórios da aplicação do laser de baixa potência nos processos cicatriciais e regenerativos do sistema muscular (BIBIKOVA; ORON, 1995; BULIAKOVA et al., 2000; MINAMOTO et al., 2001; SHEFER et al., 2002).

Apesar do mecanismo de ação do laser permanecer indefinido, pressupõe-se que esse tipo de radiação possui capacidade de modificar o metabolismo celular, ou seja, estimular ou inibir atividades fisiológicas, proliferativas e bioquímicas, mesmo na ausência de aquecimento tecidual significante. Esse fenômeno denominado biomodulação, ocorre quando há absorção dos fótons por parte das biomoléculas (BASFOR, 1989; MORIMOTO et al., 1994; KITCHEN; BAZIN, 1996; BAXTER, 1997; ORTIZ; BRASILEIRO, 2004).

De acordo com Baxter (1997), a luz é absorvida através de um cromóforo por meio de absorção seletiva (GONZÁLEZ; CRUÑAS, 1988). A função fotorreguladora é promovida por meio de fotorreceptores, moléculas com variedades morfológicas disponíveis nas células.

Karu (1989) relata em seu estudo sobre os efeitos fotobiológicos do laser de baixa potência, que essa modalidade terapêutica auxilia no processo de reparo tecidual através da ativação do metabolismo celular, sendo a atividade respiratória das células o provável fotorreceptor responsável por desencadear esse processo, promovendo uma maior proliferação de células. Concluiu ainda, que a resposta aos efeitos fotobiológicos depende de fatores relacionados ao estado fisiológico das células estimuladas.

Diante do exposto, fica evidente que o exercício físico de alta intensidade pode levar a fadiga muscular e prováveis danos à estrutura e funcionamento do músculo o que justifica a procura por terapias que possam minimizar ou alterar os efeitos deletérios da fadiga muscular. O laser de baixa potência pode vir a ser uma alternativa de baixo custo e não invasiva para minimizar os efeitos da fadiga muscular.

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi investigar os efeitos do Laser de Baixa Intensidade (LLLT) de 660nm nos níveis de CK e na apoptose celular no músculo gastrocnêmico de ratos submetidos a natação forçada.

1.1 Laserterapia - Fotobioestimulação

No transcorrer dos anos, o Laser de Baixa Potência tem sido utilizado de modo corriqueiro na prática clínica, principalmente em lesões músculo esqueléticas, visando obter cicatrização mais rápida de feridas e melhores condições do tecido neo-formado. Entretanto, ainda há controvérsias sobre a eficácia da terapia laser de baixa potência utilizada em tecidos moles.

Os efeitos provocados pela radiação laser no processo de regeneração dos tecidos biológicos dependem da dose, comprimento de onda, frequência de irradiação e sincronismo (BIBIKOVA; ARON, 1994). É sabido também que a transmissão da luz através dos tecidos ocorre devido à especificidade de um comprimento de onda e depende do espectro absorvido nos cromossomos moleculares (HARRIS, 1991).

Karu (1998), através da avaliação do crescimento celular *in vitro*, observou que, na maior parte das curvas dose-resposta aparecia um limiar, um máximo e uma fase de declive, representando, portanto, uma dependência da dose.

A laserterapia de baixa potência deve seu êxito às particularidades das respostas que induz nos tecidos, como redução de edema, diminuição do processo inflamatório, aumento da fagocitose, da síntese de colágeno e da epitelização (BAXTER, 1994; GOGIA, 1995).

Segundo Vladimirov et al., (2004), os princípios fotobiológicos das aplicações terapêuticas da radiação laser proporcionam o aumento do metabolismo celular, do cálcio intracelular, da síntese de proteínas, divisão celular e da fagocitose. Essas ações são desencadeadas primariamente pela absorção da luz emitida pelo laser por fotorreceptores celulares constituintes do componente respiratório celular. Além disso, estes pesquisadores citam ainda outros mecanismos estudados, que incluem a promoção de uma maior vasodilatação, melhorando com isso o suprimento sanguíneo dos tecidos e a microcirculação local.

Entretanto, apesar das pesquisas se concentrarem na fotobioestimulação do processo de cicatrização e reparo dos tecidos, ainda não há consenso na literatura especializada sobre os reais efeitos da irradiação laser, existindo grandes divergências entre os diversos estudos e seus autores.

De acordo com Baxter (1997), a luz é absorvida através de um cromóforo, por meio de absorção seletiva (GONZÁLEZ; CRUÑAS, 1988). A função fotorreguladora é promovida por meio de fotorreceptores, moléculas com variedades morfológicas disponíveis nas células.

De acordo com a teoria fotobioquímica, os fotorreceptores são estimulados através da energia eletromagnética. Esses fotorreceptores fazem parte das vias bioquímicas celulares e são capazes de regular o metabolismo de componentes da cadeia respiratória, como por exemplo, NADH (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Reduzida) desidrogenase e citocromo C oxidase. Esses componentes após atingirem um estado de excitação eletrônica (mudança no potencial redox), responderão a uma faixa de luz específica, convertendo a energia eletromagnética em energia bioquímica (BECKERMAN et al., 1992; KARU, 1999; ORTIZ et al., 2001).

Para Wilden e Karthein (1998), os componentes da cadeia respiratória correspondem a uma espécie de “antenas ressonadoras” capazes de responder à radiação luminosa de comprimentos de ondas específicos, no intuito de aumentar o fluxo de elétrons, e conseqüentemente, vitalizar na célula o aumento do metabolismo energético.

Os fotorreceptores estão presentes na membrana mitocondrial e absorvem luz tanto no espectro do infravermelho próximo, quanto no espectro visível quando se encontram em seu estado redox intermediário. Dessa maneira, nem totalmente reduzido e nem oxidado, a excitação eletrônica desses componentes numa determinada seqüência poderá influenciar a transferência de elétrons e ocasionar uma resposta biológica (MORIMOTO et al., 1994; BAXTER, 1997; WILDEN, KARTHEIN, 1998 e KARU, 1999).

Karu (1989) relata em seu estudo sobre os efeitos fotobiológicos do laser de baixa potência, que essa modalidade terapêutica auxilia no processo de reparo tecidual através da ativação do metabolismo celular, sendo a atividade respiratória das células o provável fotorreceptor responsável por desencadear esse processo, promovendo uma maior proliferação de células. Concluiu ainda, que a resposta aos efeitos fotobiológicos depende de fatores relacionados ao estado fisiológico das células estimuladas.

Weiss e Aron (1992) realizaram uma incisão parcial no músculo gastrocnêmio de ratos da raça Charles River e trataram com laser HeNe (mW). A análise histológica de células mononucleadas, miotúbulos e miofibras jovens mostrou que as células mononucleadas diminuía em fração de volume nos animais tratados em relação ao grupo controle. Houve também uma rápida taxa de regeneração das miofibras e o volume dos miotúbulos nas margens em relação ao centro da lesão.

Parizotto (1998) observou pela microscopia eletrônica de varredura, que houve melhora na organização tecidual e maior número de células para a síntese de material extra celular produzido pela

fotoestimulação com laser HeNe após tenectomia de ratos. Além disso, mostrou que o laser estimulou a formação de colágeno precocemente, com melhor empacotamento e organização.

Buliakova et al., (2000), examinaram o efeito da radiação a laser infravermelha (0,89 micrômetros) na regeneração do músculo gastrocnêmio em ratos adultos (dez exposições 3-minutos, 2-3 procedimentos semanais por um mês após a operação, modulando na frequência de 10 hertz, dose total 3,6 J/cm²). Parâmetros histológicos, morfométricos e bioquímicos da regeneração muscular, assim como índices bioquímicos, mostram a regeneração realçada do músculo esquelético. A formação do órgão muscular termina precocemente em relação aos músculos não-tratados.

Amaral et al., (2001), demonstraram que o laser HeNe foi eficaz no processo de regeneração muscular utilizando-se uma dosagem de 2,6 J/cm², por 6 segundos, apresentando efeitos significativos, tais como aumento da área da fibra muscular e densidade mitocondrial.

Albertini et al., (2002), analisaram os efeitos do laser de baixa potência (AsGaAl) no modelo de inflamação de edema de pata em ratos. Os resultados demonstraram que com a irradiação de 1 J/cm² e 2,5 J/cm² há redução do edema em 27% e 45,47%, respectivamente, e que com a irradiação de 2,5 J/cm² os efeitos antiinflamatórios produzidos são equivalentes a uma dose de 1 mg/Kg de diclofenaco de sódio.

Pugliese et al., (2003), em um estudo sobre a influência da terapia a laser de baixa potência na biomodulação das fibras colágenas e elásticas, observaram em seus resultados uma significativa diminuição do infiltrado inflamatório e edema, além do aumento da expressividade das fibras colágenas e elásticas, ocasionados pela irradiação do laser.

Buliakova e Azarova (2004), estudaram os efeitos do laser HeNe na regeneração do músculo gastrocnêmio de ratos após serem lesionados. Os ratos foram divididos em 6 grupos submetidos a dez aplicações do laser com densidade de potência de 2,5- 3,0 mW/cm² e densidade de energia de 9,0- 10,8 J/cm², três minutos para cada membro, 2-3 exposições semanais, durante 30 dias após a lesão. A atividade regenerativa foi estimulada pelo laser no músculo esquelético.

1.2 Exercício Físico e Lesão Muscular

Visando estudar as fases da degeneração e reparo das fibras musculares, muitos pesquisadores utilizam métodos que induzem a lesão muscular através da denervação (JAKUBIEC-PUKA et al., 1999), da contusão (MINAMOTO et al., 2001), da eletroestimulação (HILL; WERNIG; GOLDSPINK, 2003), dos exercícios físicos (SERRÃO et al., 2003) e das injeções de miotoxinas (HILL; WERNIG; GOLDSPINK, 2003).

De acordo com Astrand e Rodahl (1986), o exercício físico induz um aumento de aproximadamente 20 vezes no volume do oxigênio total consumido. Esse aumento está associado ao aumento na produção das espécies reativas do oxigênio (JENKINS; GOLDFARB, 1993).

As EROs são produzidas na membrana citoplasmática, no retículo endoplasmático, nos lisossomos, nas mitocôndrias, nos peroxissomos e no citosol. Sua produção é proporcional à quantidade de oxigênio

consumida pelas mitocôndrias num determinado tempo e, conseqüentemente, aumenta durante a atividade física, o que provoca um desequilíbrio das EROs levando ao stress oxidativo (DUARTE, 1993).

Diversos estudos correlacionam o aumento na produção da EROs a instalação do processo de fadiga muscular (BARCLAY; HANSEL, 1990; BROTTTO; NOSEK, 1996) e do processo de lesão muscular (FRANKIEWICZ-JOZKO; FAFF; SIERADZAN-GABELSKA, 1996).

As lesões musculares podem ser definidas como qualquer alteração que promova um funcionamento inadequado do músculo, seja ela morfológica ou histoquímica (FAULKNER, 1993).

Os níveis de uma lesão são determinados pela duração e intensidade dos exercícios. Se realizados de maneira exaustiva, ambos provocam danos celulares e a degeneração ocorre segundo níveis crescentes, partindo das miofibrilas ou miofibrilas e sarcoplasma, seguindo para o sarcolema; atinge células miosatélites, chegando ao endomísio e aos capilares. Deste modo, atividades de resistência ou de explosão produzem vários níveis de resposta celular e de lesão muscular (DAL PAI, 1994).

A análise da concentração plasmática de algumas proteínas miofibrilares é, normalmente, utilizada para averiguar a ocorrência de lesão do músculo esquelético e a sua magnitude (SORICHTER et al., 1997), salientando-se a creatina kinase (CK), a aspartato aminotransferase, a lactato desidrogenase, a mioglobina e a troponina (KASPER; TALBOT; GAINES, 2002). O aumento em níveis plasmáticos constitui uma indicação de que as células musculares que sofreram stress perderam a capacidade de regular a permeabilidade destas proteínas (KAUHANEN; LEIVO; MICHELSSON, 1993). Das proteínas citadas, a CK é um dos marcadores mais usados na clínica para diagnosticar uma lesão muscular.

Chen e Hsieh (2001), relataram que a força isométrica máxima e a amplitude de movimento de sujeitos cujo músculo bíceps braquial foi submetido a exercícios excêntricos máximos diminuíram consideravelmente e que a circunferência do membro e a atividade da CK plasmática aumentaram devido aos mesmos exercícios excêntricos.

1.3 Fadiga Muscular

Em mamíferos, o tecido muscular esquelético possui capacidade de produzir níveis elevados de força quando são ativados. A incapacidade de produzir repetidamente esse elevado nível de força ou potência muscular designa-se por fadiga neuromuscular, fenômeno que pode se manifestar de maneira aguda e que pode persistir por dias e até semanas.

A FM é um fenômeno comum em esportes de resistência e é uma experiência usual nas atividades diárias. Definida como uma incapacidade na manutenção de um nível esperado de força (ENOKA; STUART, 1992; DIMITROVA; DIMITROV, 2003), a fadiga muscular tem sido amplamente investigada tanto na área clínica e quanto na desportiva. Há um consenso entre diversos pesquisadores de que o termo fadiga é a diminuição da capacidade muscular de manter a geração da força e a velocidade de relaxamento, indução de alterações nas características contráteis do músculo e das propriedades elétricas que geram disfunções no sistema neuromuscular humano (HICKS, KENT- BRAUN; DITOR, 2001; SCHAEFER et al. 2002).

A compreensão dos mecanismos que envolvem a regulação da contração muscular sob condições de fadiga tem importância fundamental, já que os mecanismos exatos que levam às alterações causadas por ela ainda não são esclarecidos (LEES et al., 2001).

Evidentemente, a fadiga muscular é acompanhada por mudanças fisiológicas e metabólicas. Dentre elas, podemos citar fatores indicativos como parâmetros hematológicos e imunológicos, glicemia, nível de lipídios, atividade enzimática, uréia sanguínea, ácido úrico e outros fatores (TSOPANAKIS; TSOPANAKIS, 1998).

De acordo com Rassier e Macintosh (2000) e Bilodeau et al, (2001), a natureza da atividade física realizada influencia nos mecanismos específicos responsáveis pela redução na capacidade de produção de força e conseqüentemente à fadiga. Iniciar a atividade muscular voluntariamente envolve muitos processos que começam com o controle cortical no cérebro e terminam com a formação das pontes cruzadas dentro da fibra muscular. A fadiga muscular pode, portanto, ocorrer como resultado da falha de qualquer um dos processos envolvidos na contração muscular (GANDEVIA, 1998).

1.4 Exercícios e Apoptose Celular

A apoptose é um processo de morte celular individual, regulado pela ativação de determinados genes. Ela é executada através de vias de sinalização específicas, eventualmente levando à fragmentação do DNA, condensação nuclear, proteólise, invaginação inespecífica da membrana e fragmentação celular com formação de corpos apoptóticos, os quais são fagocitados por macrófagos e neutrófilos, ou outras células vizinhas. Há ainda dois mecanismos distintos responsáveis pela execução final da morte celular nomeados de via caspase-independente e via apoptose caspase-dependente. Esta última é executada através das caspases, que são endoproteases integradas à execução final da morte celular (DANIAL; KORSMEYER, 2004) e são as principais responsáveis pelas maiores alterações bioquímicas e morfológicas que ocorrem durante a apoptose (REHM et al., 2002).

As caspases normalmente são encontradas no citoplasma como precursores inativos (pro-caspases). Estas podem ser ativadas pela dimerização e segmentação proteolítica. O início da apoptose aciona a “cascata das caspases”, onde as caspases “iniciadoras” são ativadas (caspase-8, caspase-9, caspase-12). Estas, por vez ativam as caspases “efetadoras” (caspase-3, caspase-6, caspase-7) as quais realizam os verdadeiros eventos proteolíticos e fragmentação do DNA (via DNAase ativada por caspase) que, por fim, resulta na degradação da célula (DANIAL; KORSMEYER, 2004).

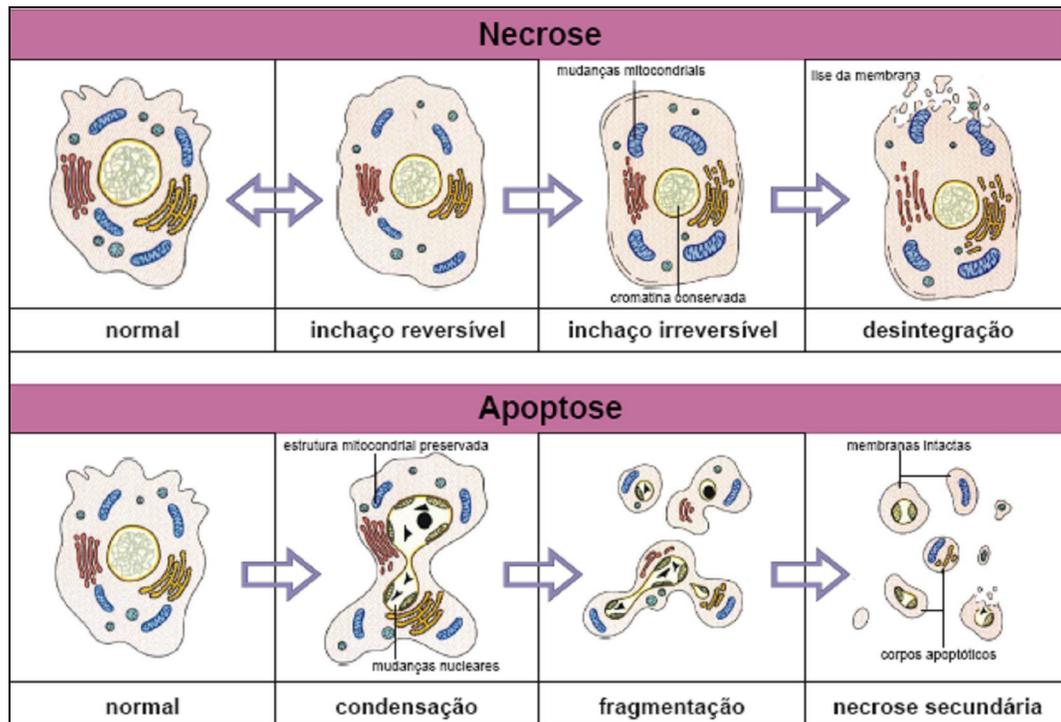
O mecanismo apoptótico caspase-independente ocorre através da liberação de mediadores a partir da mitocôndria (fator de indução da apoptose e endonuclease G) que são capazes de produzir diretamente a fragmentação de DNA em grande escala. Atualmente a mitocôndria é considerada o centro-chave para a indução e regulação da apoptose (GABAI, SHERMAN, 2002; DANIAL; KORSMEYER, 2004). Sugere-se que estímulos celulares endógenos, tais como níveis elevados de cálcio ou de espécies reativas de oxigênio (EROs), possam desencadear a apoptose (PRIMEAU; ADHIHETTY; HOOD, 2002).

Sabe-se também que sob certos estímulos, muito bem estabelecidos (danos causados por acúmulo de mtDNA, stress oxidativo e privação de fatores de crescimento), a mitocôndria pode induzir apoptose tanto via caspase-dependente, quanto via caspase-independente (DANIAL; KORSMEYER, 2004).

Pode-se citar como exemplo de apoptose via caspase-dependente o estresse do retículo endoplasmático, que ao liberar cálcio para o citoplasma ativa a pró-caspase-12. A ativação das caspases leva a

reorganização do citoesqueleto, interrompe a reparação do DNA, quebra a estrutura nuclear e desintegra a célula em corpos apoptóticos (DIRKS; LEEUWENBURGH, 2002).

A apoptose caracteriza-se pela destruição do núcleo e está envolvida na remodelação de tecidos durante situações fisiológicas, tais como o desenvolvimento embrionário e o controle do número de células em tecidos proliferativos, e durante estados patológicos, tais como a doença e a lesão (ALLEN; ROY ; EDGERTON, 1999; ADAMS et al., 2001).



Fonte: Anazetti, Melo (2007).

Figura 1. Distinção das diferentes alterações morfológicas nos processos de morte celular por apoptose versus necrose. A necrose (a) é caracterizada pela perda de integridade de membrana plasmática, floculação da cromatina, inchaço seguido de lise celular com extravasamento do conteúdo intracelular e desintegração de organelas. O processo apoptótico (b) envolve alteração de permeabilidade de membranas, condensação cromatínica, encolhimento celular, formação de corpos apoptóticos sem desintegração de organelas.

2. OBJETIVOS

2.1 Gerais

Avaliar a ação do laser de baixa potência 660nm no músculo gastrocnêmico de ratos em períodos de 24 horas e 48 horas após sessão única de exercício exaustivo.

2.2 Específicos

Verificar se o laser de baixa potência 660nm é capaz de alterar a expressão sérica da Creatina Kinase em ratos submetidos a fadiga muscular induzida por meio de exercícios físicos exaustivos.

Verificar se o laser de baixa potência 660nm promove alteração nas células apoptóticas do músculo gastrocnêmico induzida por meio de exercícios físicos exaustivos.

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Animais de experimentação

A amostra foi composta de 20 ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*), da linhagem WISTAR, com peso corpóreo variando entre 230 a 350 gramas, adultos procedentes do Biotério Central da Universidade Para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal - UNIDERP, Campo Grande, MS.

Os animais foram confinados em gaiolas de 0,15 m², com 4 animais por gaiola, mantidos em fotoperíodo de 12 horas, temperatura e umidade mantidas por ar condicionado, ruídos mínimos, ração sólida e água *ad libitum*, ficando sob observação por um período de dois dias, antes da sua utilização no experimento.

Todos os procedimentos experimentais adotados estão de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA e as normas para a prática didático-científica da vivisseção de animais (Lei 6638 de 08/05/1979) e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul sob nº.138/2007. (Anexo A)

3.2 Grupos experimentais

Os animais (n=20), foram divididos aleatoriamente em dois grupos (n=10), assim denominados Grupo 1 (n=10)- animais submetidos a exercício físico de alta intensidade e posterior aplicação de laser de baixa potência; Grupo 2 (n=10)- controle, animais submetidos a exercício físico de alta intensidade e não aplicado laser. Cada grupo foi novamente dividido em 2 subgrupos de acordo com o período de eutanásia (24 e 48 horas) e receberam as seguintes denominações: controle 24 horas; controle 48 horas; LLLT 24 horas e LLLT 48 horas.

3.3 Protocolo de Exercício por meio da Natação Forçada

Para o teste de natação forçada foi utilizado o protocolo modificado, descrito por WU; CHENG; LIU, (2007). O teste foi induzido forçando os animais a nadar até a exaustão. Os ratos foram carregados com anéis de chumbo que pesavam 5% do seu peso corporal pela cauda, e foram então colocadas em um tanque de natação com água fresca (aproximadamente 1,20 m de profundidade).

A temperatura da água foi mantida a $25 \pm 0,5$ ° C. O esgotamento foi determinado pela perda de movimentos coordenados e enfraquecimento para voltar à superfície dentro de 10 segundos. Este critério de 10 segundos foi considerado uma correlação com exaustão, e foi utilizado como uma indicação da capacidade máxima de natação de cada animal. Os ratos foram removidos, neste ponto, antes do afogamento.



Fonte: Própria

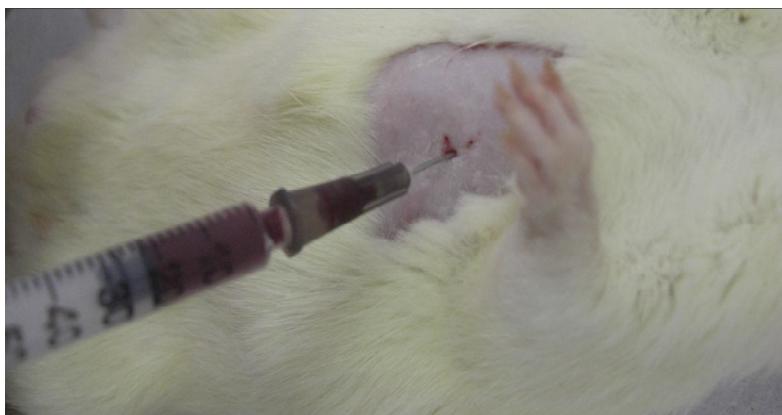
Figura 2. Figura ilustrativa do processo de indução da fadiga muscular: A – Tanque utilizado para a natação dos animais; B – Natação dos animais.

3.4 Aplicação da Laserterapia

Foi utilizado o Laser Fosfeto Índio-Gálio-Alumínio (InGaAlP) da marca DMC® modelo Photon Laser III, com potência de 100mW (densidade de potência de $1,4 \text{ W/cm}^2$), área do feixe de 3mm, e comprimento de onda de λ 660nm. A aplicação deu-se sob forma de um único ponto pelo método transcutâneo na região posterior sobre o músculo gastrocnêmio, com densidade de energia de 4 joules/cm^2 e tempo de 2,8 segundos.

3.5 Verificação da Creatina Kinase (CK)

Foi colhida uma amostra de sangue de cada animal (1.8 a 2.0 mL) por meio de punção cardíaca 48 horas antes da realização do exercício e 24 e 48 horas pós exercício de natação forçada. A análise foi realizada utilizando-se o kit “MPR3 CK NAC-ativado” (Wiener Lab., Rosário, Argentina). Juntou-se à solução tampão (frasco de 2,5 ml) um reagente específico, deixando-os em banho-maria a 37°C por um minuto. Em seguida, adicionou-se 50 µl de plasma à solução reativa, deixando novamente a mistura em banho-maria a 37 °C por mais um minuto. De forma imediata, realizou-se quatro leituras das absorbâncias de uma mesma amostra a 334 nm, com um minuto de intervalo entre uma leitura e outra, para que fosse obtido um valor D. O cálculo da atividade de CK (U/L) na amostra foi feito pela equação $CKp = 8252 \times D$ absorbância/minuto.



Fonte: Própria

Figura 3. Figura ilustrativa do processo de punção cardíaca.

3.6 Eutanásia

Ao término do período de experimentação os animais foram submetidos à eutanásia por injeção excessiva de anestésico pentobarbital sódico administrado de forma intraperitoneal na proporção de 100mg/Kg. Após constatada a morte dos animais, foi realizada uma incisão para a retirada do músculo tríceps sural que foi cuidadosamente dissecado para a retirada do músculo gastrocnêmio. As amostras foram colocadas em solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,2 - 7,4 por 17 horas para o procedimento do TUNEL.



Fonte: Própria

Figura 4. Figura ilustrativa da dissecação do músculo gastrocnêmio.

3.7 Verificação da Apoptose “*in situ*”, pelo método TUNEL (terminal deoxyribonucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labelling)

A presença de células em processo de apoptose foi investigada “*in situ*”, pelo método TUNEL (terminal deoxyribonucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labelling) descrito a seguir.

Os cortes foram colocados para desparafinização em xilol I, II e III por 10, 5 e 5 minutos, respectivamente. Em seguida foram reidratados em álcool a 100%, 100%, 95%, 80% e 70% por 5 minutos em cada álcool. Após a hidratação, os cortes foram circundados com Pap Pen e aplicou-se a proteinase K, na diluição de 20µg/ml em Tris-HCL 10mM pH 7,4 durante 30 min a 37°C. Após este procedimento, os cortes foram lavados em PBS 0,05 M, 3 vezes, durante 5 minutos. Incubou-se em solução bloqueadora de peróxido de hidrogênio a 3% em metanol por 30 minutos em temperatura ambiente. Novamente os cortes foram lavados em PBS 0,05M, 3 vezes, durante 5 minutos. Em seguida, tratados com solução permeabilizante de Triton X- 100 a 0,1 % em água destilada mais 0,1g de citrato de sódio. Lavou-se em PBS 0,05M, 3 vezes, durante 5 minutos. A 1º lâmina (controle positivo), foi tratada com Dnase por 15 minutos; a 2º lâmina (reação), foi tratada com PBS 0,05M por 15 minutos e a 3º lâmina (controle negativo), tratada com PBS 0,05M por 15 minutos. A seguir, a 1º lâmina (controle positivo) recebeu tratamento com solução enzima TDT terminal deoxynucleotidyl transferase + solução marcadora nucleotide mixture por 1 hora em temperatura de 37° C; a 2º lâmina (reação) recebeu tratamento com solução enzima TDT terminal deoxynucleotidyl transferase + solução marcadora nucleotide mixture por 1 hora em temperatura de 37°C e a 3º lâmina (controle negativo) recebeu tratamento com solução marcadora nucleotide mixture por 1 hora em temperatura de 37°C. Após esta reação, as lâminas foram lavadas em PBS 0,05M, 3 vezes, durante 5 minutos e incubadas com solução POD (anti-fluorescein antibody HRP) por 30 min a 37°C. Em seguida foram novamente lavadas em PBS 0,05M, 3 vezes, durante 5 minutos. Os cortes foram revelados com DAB e lavados em PBS 0,05M, 3 vezes, durante 5 minutos. Após o procedimento, foram desidratados e as lâminas montadas.

3.8 Análise Histomorfométrica

Para análise da apoptose evidenciada pelo método TUNEL, foi realizada uma avaliação morfológica das células por digitalização de imagens e análise computacional por meio de um programa específico de processamento e análise de imagens (IMAGE PRO PLUS 4.5).

Para a quantificação das áreas representativas foram digitalizados oito campos, usando-se um microscópio Axiolab (Carl Zeiss, objetiva 200x) acoplado a uma câmara para captura de imagem Sanyo Digital Active BLC, conectada ao microcomputador Processador Intel® Core™ 2 Duo E4500 (2.2 GHz, 800MHz), 2 Mb Cache, Dual Core - BRH7807 equipado com placa de vídeo.

3.9 Análise Estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística pela variância (Anova). Em seguida, aplicou-se o "post hoc test" teste de Tukey's , considerando a natureza das variáveis estudadas ou a variabilidade das medidas efetuadas, sendo utilizado para tanto o *GraphPad*. 4.00 Prism, fixou-se em 0,05 ou 5% ($\alpha \leq 0,05$) o nível de rejeição da hipótese de nulidade.

4 RESULTADOS

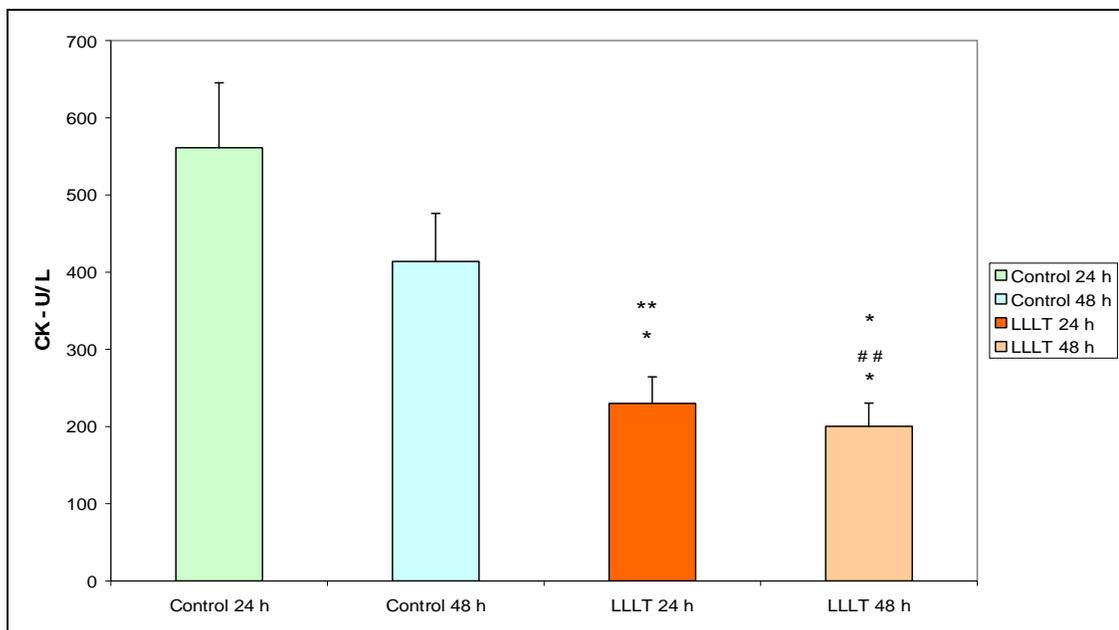
4.1 Atividade da Creatina Kinase Sérica

Os valores obtidos a partir da verificação dos níveis de CK sérica dos animais submetido à natação forçada até a exaustão encontram-se apresentados na forma de média e desvio padrão e podem ser verificados na Tabela 1, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) observou-se ($p < 0,0001$).

Tabela 1. Valores obtidos por meio da análise da creatina kinase sérica, valores expressos em média e desvio padrão para os grupos controle e grupo tratado com LLLT.

| | Grupo 1 | | Grupo 2 | |
|----------------------|----------------------|---------------------|---------------------|--------------------|
| | Controle 24 h | Controle 48h | (LLLTT 24 h) | (LLLTT 48h) |
| | 591.30 | 407.69 | 201.99 | 195.07 |
| | 530.01 | 403.61 | 225.77 | 157.14 |
| | 599.45 | 444.37 | 241.13 | 187.03 |
| | 512.80 | 399.41 | 214.69 | 190.0 |
| | 572.05 | 414.54 | 266.34 | 271.59 |
| Média | 561,1 | 413,9 | 230,0 | 180,2 |
| Desvio Padrão | 38,09 | 17,91 | 24,91 | 20,40 |

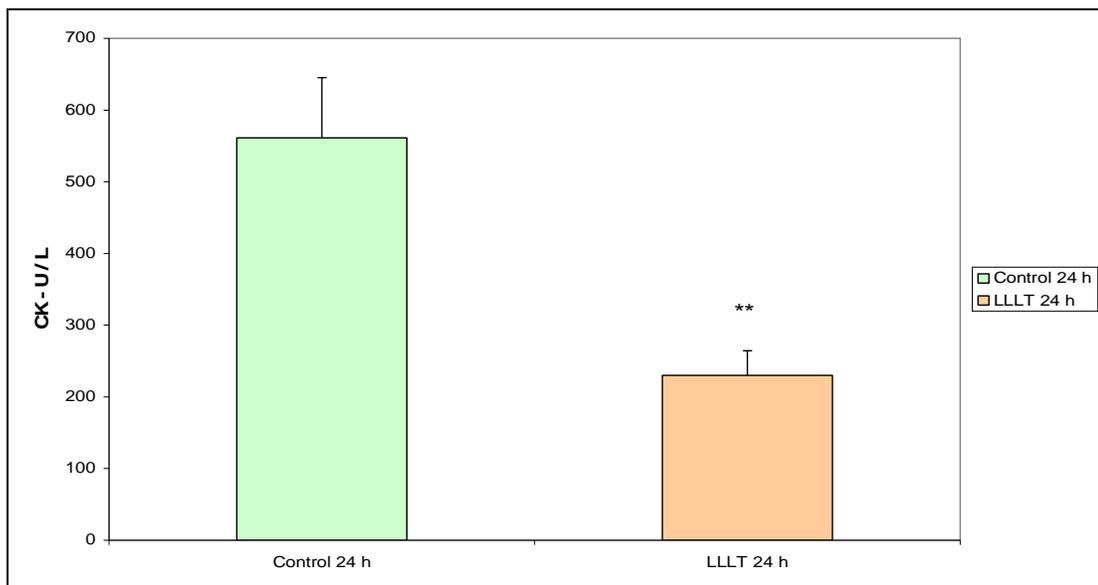
Pode-se notar um significativo aumento na liberação de Creatina Kinase no grupo 1 nas primeiras 24 horas ($561,1 \text{ U/l} \pm 38,09$) quando comparados ao grupo tratado com LLLT, após as mesma 24 horas ($230,0 \text{ U/l} \pm 24,91$), a análise estatística entre estes subgrupos pelo teste Tukey obteve-se ($p < 0,001$). (Figura 5)



**P<0,001 indica resultado altamente significativo em relação ao grupo controle 24 h; * p<0,001 indica resultado altamente significativo em relação ao grupo controle 48 h; # p>0,05 indica resultado não significativo em relação ao grupo LLLT 24 h.

Figura 5. Gráfico comparativo das médias e desvio padrão de CK entre os grupos tratados com LLLT e não tratados (controle).

Esta diferença se fez presente no período de 24 horas, comparando os mesmos grupos obteve-se ($p < 0,001$) o que indica uma grande diferença entre os resultados dos grupos nos diversos períodos do trabalho. (Figura 6)

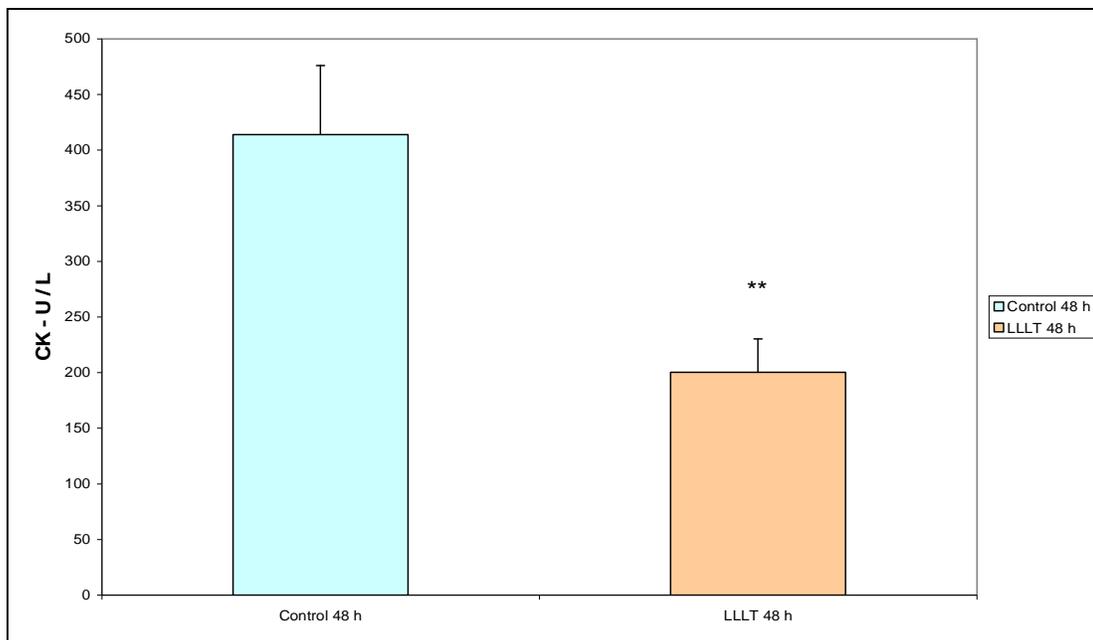


**P<0,001 indica resultado altamente significativo em relação ao grupo controle.

Figura 6. Gráfico comparativo das médias e desvio padrão de CK entre os grupos tratados com LLLT e não tratados (controle) 24 horas após o exercício de natação forçada.

O pico de liberação foi observado após 24 horas da realização do exercício físico no grupo controle a 599,45 U/L um valor elevado quando comparado com os valores do grupo tratado 48 horas que foi de 157,14 U/L.

Já na análise entre os sub-grupos para tratados e não tratados obteve-se resultado estatisticamente significativo ($p < 0,001$) para todos os cruzamentos estatísticos, com exceção para a comparação entre o subgrupo tratado ou seja 24 horas LLLT *versus* 48 horas LLLT com ($p > 0,05$). (Figura 7)



** $P < 0,001$ indica resultado altamente significativo em relação ao grupo controle.

Figura 7. Gráfico comparativo das médias e desvio padrão de CK entre os grupos tratados com LLLT e não tratados (controle) 48 horas após o exercício de natação forçada.

4.2 Verificação da Apoptose pelo TUNEL

Quando as lâminas processadas foram submetidas à análise *in situ* da fragmentação do DNA, os núcleos positivos para TUNEL foram detectados dentro das fibras musculares na posição sub-sarcolemal e central, confirmando a presença da maioria dos núcleos apoptóticos em nível intersticial.

Nos ratos submetidos ao exercício forçado e tratados com LLLT na verificação do subgrupo após 24 horas obteve-se um valor de $66,3 \pm 13,2$ células apoptóticas/ mm^3 de pico, e $39,0 \pm 6,8$ células apoptóticas/ mm^3 após 48h. No grupo controle não submetido ao LLLT apresenta valores muito superiores após 24 horas, com um pico ($159,4 \pm 25,8$) e após 48 horas da natação forçada ($89,2 \pm 25,4$). (Tabela2).

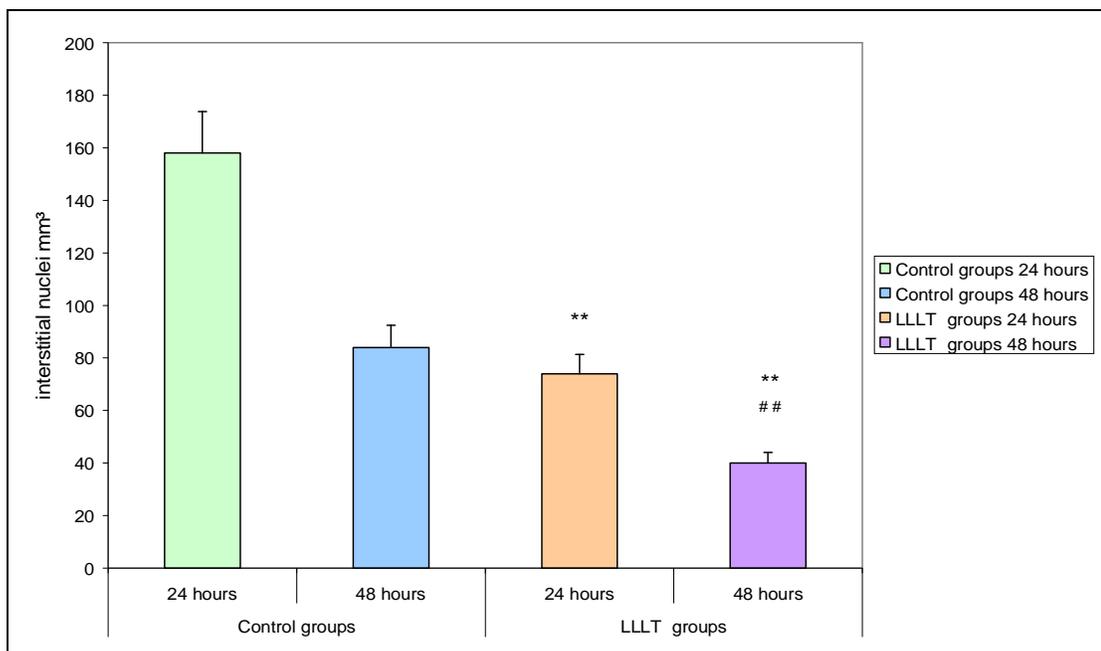
Tabela 2. Valores obtidos pela histomorfometria do músculo gastrocnêmico de ratos para células positivas ao TUNEL, expressos em média e desvio padrão para os grupos controle e grupo tratado com LLLT.

| Grupo Controle | | Grupo LLLT | |
|----------------|------|------------|------|
| 24 h | 48 h | 24 h | 48 h |
| 158 | 84 | 74 | 40 |
| 162 | 90 | 65 | 42 |

| | | | | |
|----------------------|-------|------|------|------|
| | 220 | 150 | 61 | 48 |
| | 140 | 71 | 59 | 30 |
| | 148 | 76 | 40 | 28 |
| | 139 | 73 | 79 | 45 |
| | 157 | 86 | 73 | 40 |
| | 151 | 84 | 80 | 39 |
| Média | 159,4 | 89,2 | 66,3 | 39,0 |
| Desvio Padrão | 25,8 | 25,4 | 13,2 | 6,8 |

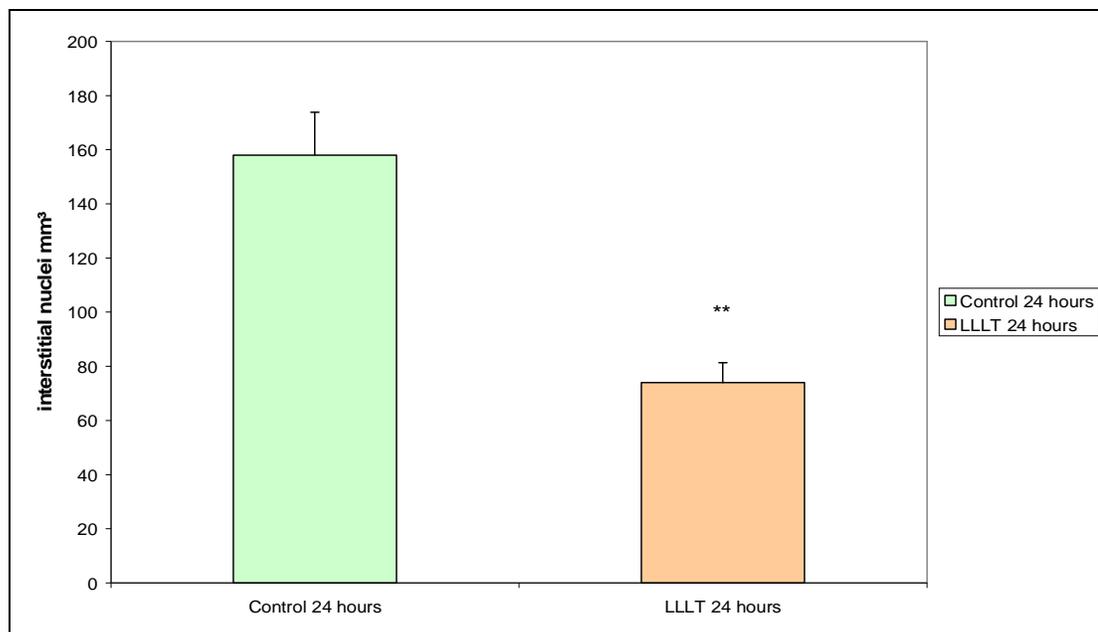
A análise estatística pela Variância ANOVA indica diferença estatística entre os grupos em ($p < 0,001$).

Quando a estes grupos foi aplicado o *post hoc* test de Tukey's, o resultado entre os cruzamentos grupo Controle 24 horas *versus* LLLT 24 horas obteve-se ($p < 0,001$); Controle 24 horas *versus* LLLT 48 horas ($p < 0,001$); Controle 48 horas *versus* LLLT 24 horas ($p > 0,05$) e Controle 48 horas *versus* LLLT 48 horas ($p < 0,001$).



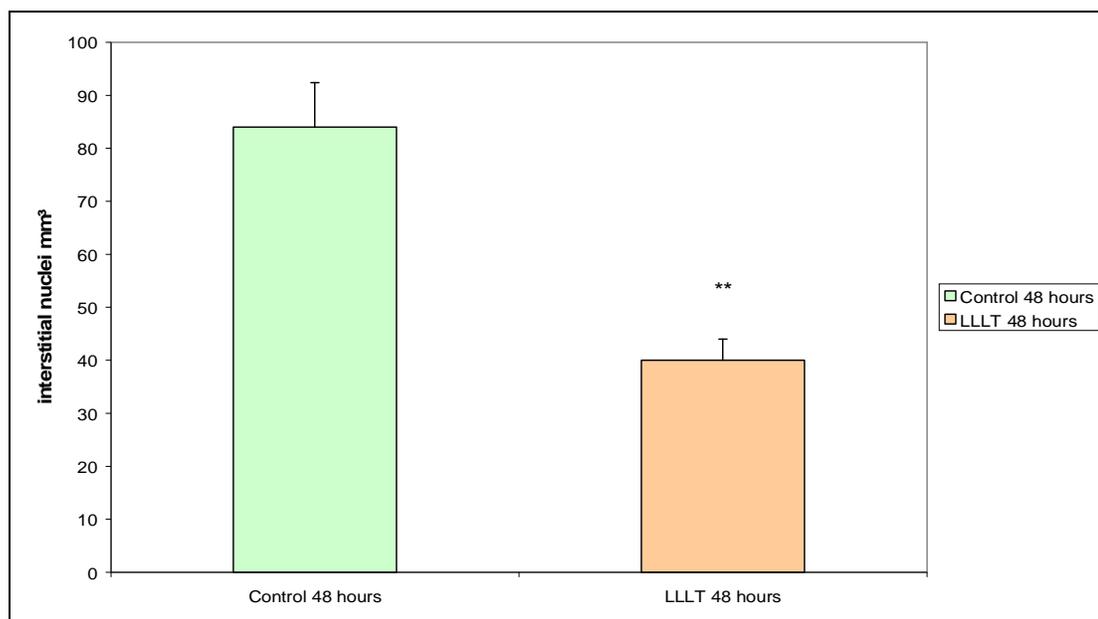
** $P < 0,001$ indica resultado altamente significativo em relação ao grupo controle 24 h; * $p < 0,001$ indica resultado altamente significativo em relação ao grupo controle 48 h; # $p > 0,05$ indica resultado não significativo em relação ao grupo LLLT 24 h.

Figura 8. Gráfico comparativo das médias e desvio padrão da apoptose obtidas pelo método TUNEL entre os grupos tratados com LLLT e não tratados (controle) 24 e 48 horas após o exercício de natação forçada.



**P<0.001 indica resultado altamente significativo em relação ao grupo controle.

Figura 9. Gráfico comparativo das médias e desvio padrão da apoptose obtidas pelo método TUNEL entre os grupos tratados com LLLT e não tratados (controle) 24 horas após o exercício de natação forçada.



**P<0.001 indica resultado altamente significativo em relação ao grupo controle.

Figura 10. Gráfico comparativo das médias e desvio padrão da apoptose obtidas pelo método TUNEL entre os grupos tratados com LLLT e não tratados (controle) 48 horas após o exercício de natação forçada.

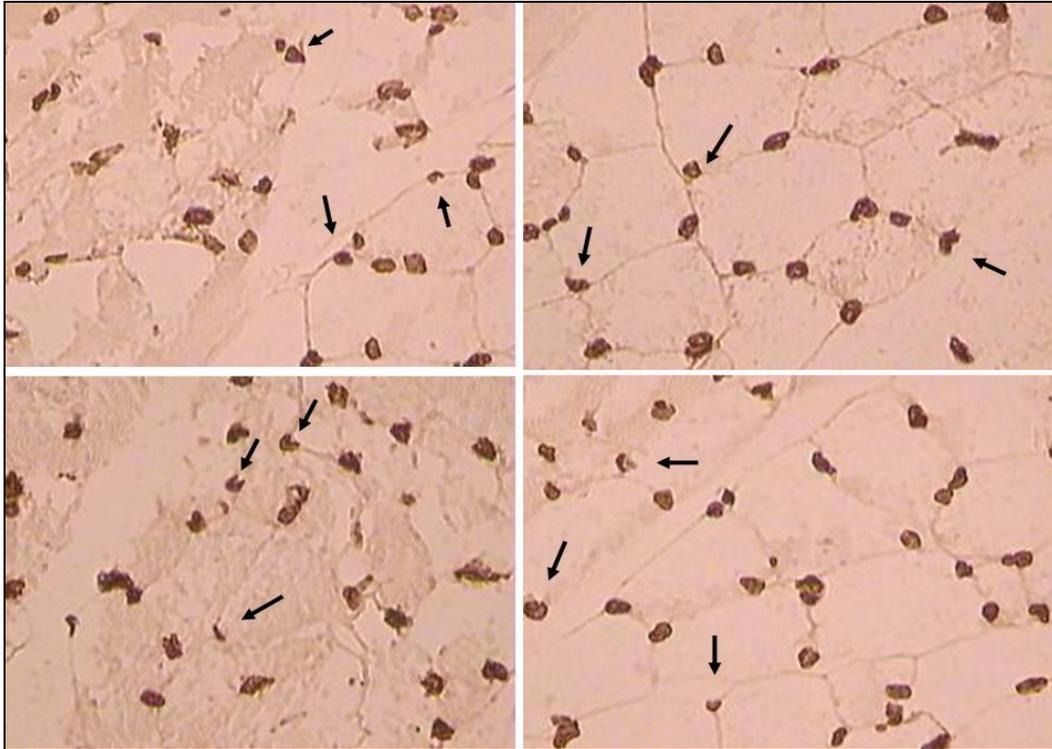


Figura 11. Fotomicrografia do corte histológico grupo controle 24 horas, onde podemos observar núcleos de células em apoptose.



Figura 12. Fotomicrografia do corte histológico grupo controle 48 horas, onde podemos observar núcleos de células em apoptose.

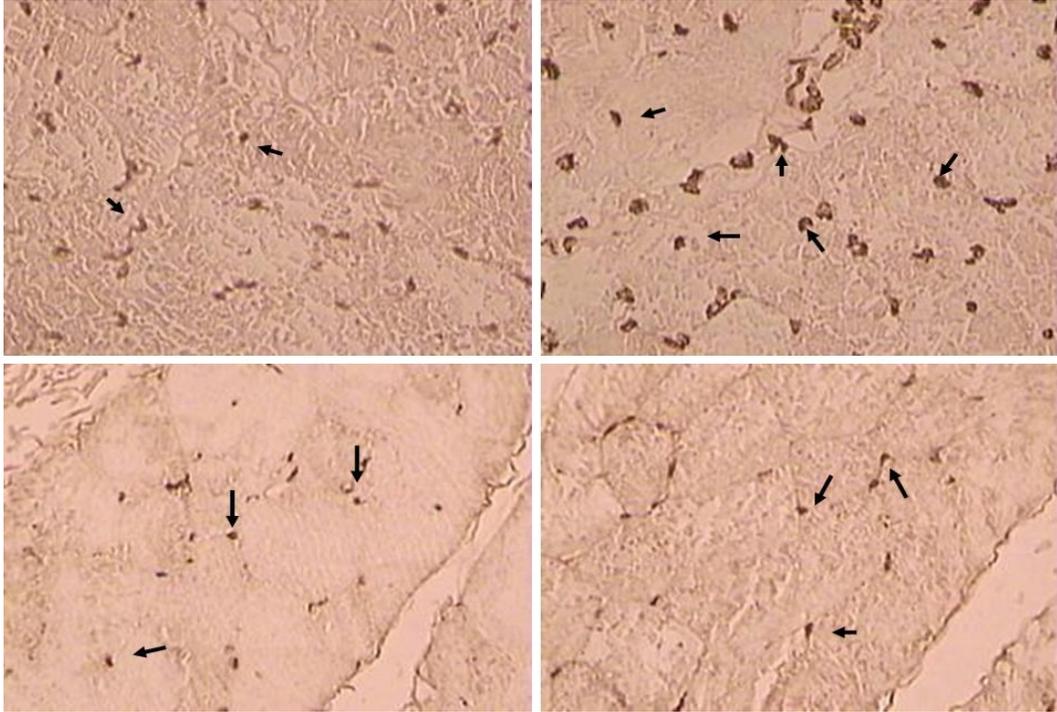


Figura 13. Fotomicrografia do corte histológico grupo laser 24 horas, onde podemos observar núcleos de células em apoptose.

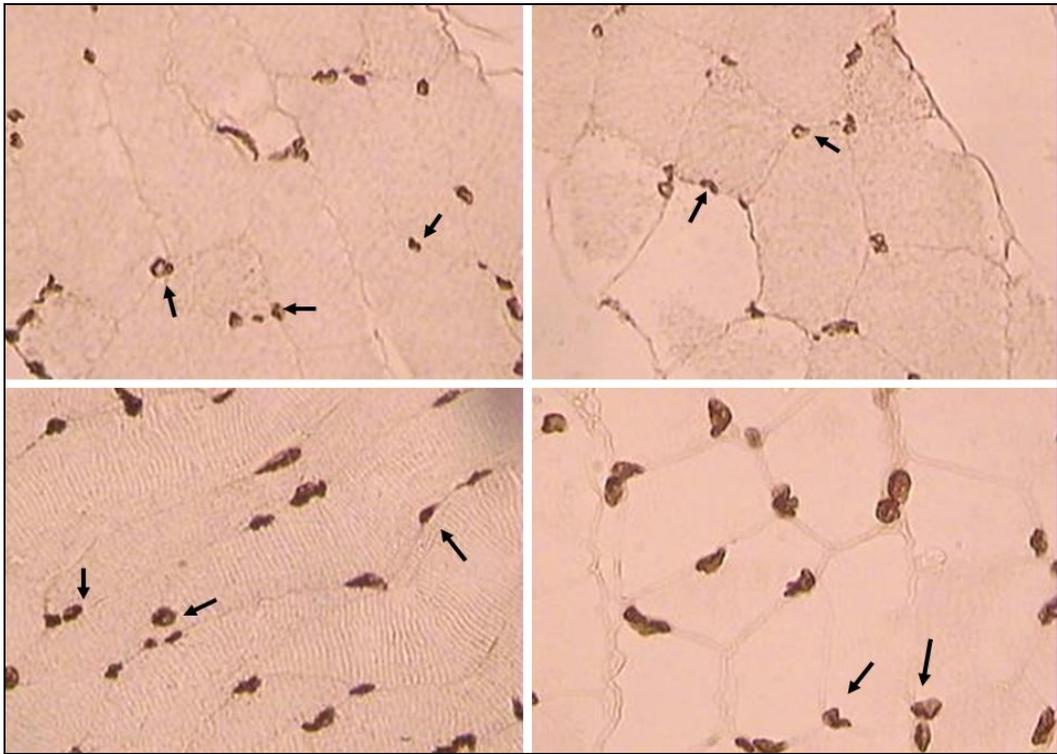


Figura 14. Fotomicrografia do corte histológico grupo laser 48 horas, onde podemos observar núcleos de células em apoptose.

5 **DISCUSSÃO**

O uso da laserterapia de baixa potência (LLLT) tem apresentado um crescimento significativo na prática clínica. Os efeitos terapêuticos do laser sobre os diferentes tipos de tecidos biológicos são amplos, dentre o quais destacam-se: os efeitos trófico-regenerativos, antiinflamatórios e analgésicos, demonstrados em estudos tanto *in vitro* como *in vivo*. Aliados à segurança do tratamento, estes efeitos parecem ser os principais responsáveis pelo crescimento da laserterapia, justificando também o aumento do interesse dos pesquisadores da área da saúde pela investigação dos mecanismos de ação e dos efeitos terapêuticos dos lasers de baixa potência.

Os benefícios evidentes do LLLT vêm sendo demonstrados em diversos trabalhos que relatam o aumento na microcirculação local: MIRÓ et al., (1984), MAIER, HAINA e LANDTHALER, (1990), no sistema linfático: LIEVENS, (1986; 1988; 1990; 1991), na proliferação de células epiteliais: STEINLECHNER e DYSON, (1993), nos fibroblastos WEBB, DYSON e LEWIS, (1998); LUBART et al., (1995), assim como aumento da síntese de colágeno dos fibroblastos: ENWEMEKA et al., (1990); CARVALHO et al., (2003).

A irradiação pelo laser de baixa potência exerce funções biomodulatórias na atividade celular. A absorção molecular inicial da luz do laser ainda é desconhecida e dependendo do comprimento de onda os efeitos são alterados devido aos diferentes cromóforos que podem ser disponíveis como fotorreceptores. Segundo Karu et al., (1995), é

provável que o processo de fotomodulação seja apenas um aspecto de muitos fenômenos da fotossinalização.

Diante do exposto neste trabalho, procuramos investigar os efeitos do LLLT, 660nm nos níveis de CK e na apoptose celular no músculo gastrocnêmico de ratos submetidos a natação forçada.

No presente estudo foi utilizado um modelo de natação forçada a fim de induzir o processo de fadiga muscular tendo em vista que este protocolo é comumente aceito para desencadear a fadiga muscular (LAWLER, et al., 1993; HILAKIVI-CLARKE; DICKSON, 1995; GIBALA, et al., 1998).

Também optamos por realizar uma investigação nos níveis séricos CK após a realização dos exercícios físicos uma vez que esta é amplamente aceita como um indicador de lesão muscular após o exercício físico. Diversos pesquisadores (VOLFINGER et al, 1994; LI; FENG; WANG, 2005), usam a enzima para indicar o prejuízo causado por danos dos músculos.

Os marcadores bioquímicos de lesão músculo esquelética são CK, aspartato aminotransferase, lactato desidrogenase, mioglobina, e troponina. A CK apresenta um aumento significativo nos níveis plasmáticos após procedimentos cirúrgicos, trauma, infarto do miocárdio e exercício muscular pesado (CARRARO, 1995; BRANCACCIO; MAFFULLI; LIMONGELLI, 2007). Entretanto, estudos relatam que exista baixa relação entre a atividade da CK plasmática e a quantidade correspondente de lesão, analisada através de alterações ultra-estruturais (MANFREDI et al., 1991) e função muscular (FRIDÉN; LIEBER, 2001), sugerindo que a atividade desta enzima possa ser um mau indicador tanto da morfologia quanto da fisiologia muscular.

No presente estudo, os períodos de 24 e 48 horas foram escolhidos para análise de CK, pois, segundo Duncan (1994), há um aumento de suas taxas no soro em casos de lesão muscular reversível ou na necrose muscular. Esse aumento ocorre poucas horas após a lesão e atinge valores máximos em 24 horas, voltando ao normal em 48 horas depois de cessar a alteração de permeabilidade muscular.

No presente estudo foi possível observar que o LLLT diminuiu o indicador de lesão muscular (CK), após o exercício de natação. Os níveis de CK foram significativamente ($p < 0,05$), menores nos grupos LLLT do que nos grupos controle.

Os resultados encontrados em nosso estudo são corroborados pelos achados de LOPES-MARTINS et al., (2006), que descrevem a possível redução da fadiga muscular após a utilização do laser em animais submetidos a exercícios intensos. LOPES-MARTINS et al., (2006) investigaram se o LLLT poderia impedir a redução da força muscular ou o aumento previsto dos níveis de CK em ratos submetidos a um modelo experimental de estimulação elétrica do nervo para induzir a fadiga por meio da contração tetânica do músculo tibial. Eles concluíram que LLLT poderia reduzir a instalação da fadiga muscular local e possivelmente reduzir danos musculares após exercícios intensos.

Vieira et al., (2006), verificaram a atividade e o padrão eletroforético da LDH em resposta ao exercício em esteira em ratos submetidos à fotoestimulação por laser de baixa intensidade (780nm). A resposta foi maior no grupo submetido ao laser mediante exercício físico, provavelmente porque o “estresse metabólico” proporcionado pelo treinamento possa ter

favorecido a maior ação do laser e conseqüentemente maior efetividade da resposta estimulatória do tecido.

Neste estudo também realizamos uma investigação da apoptose celular, uma vez que estudos recentes demonstraram que músculos esqueléticos adultos podem sofrer apoptose celular quando estimulado por diversas vezes, como nas miopatias, exercícios, isquemia, denervação e atrofia (MATSUDA; NISHIKAWA; TANAKA, 1995; PODHORSKA-OKOLOW et al., 1998).

Segundo Danial e Korsmeyer (2004), a apoptose é um processo de morte celular individual, regulado pela ativação de determinados genes. Ela é executada através de vias de sinalização específicas, eventualmente levando à fragmentação do DNA, condensação nuclear, proteólise, invaginação inespecífica da membrana e fragmentação celular com formação de corpos apoptóticos, os quais são fagocitados por macrófagos e neutrófilos, ou outras células vizinhas. Há ainda dois mecanismos distintos responsáveis pela execução final da morte celular nomeados de via caspase-independente e via apoptose caspase-dependente. Esta última é executada através das caspases, que são endoproteases integradas à execução final da morte celular.

Uma das hipóteses para a ocorrência da apoptose durante o exercício intenso é que o fenômeno se deve a um aumento da geração de EROs durante a hiperemia sustentada que segue e acompanha a atividade física muscular. Quando há uma diminuição ou interrupção de atividade física, a hiperemia ocorre, mas o aumento do fluxo de oxigênio não é utilizado em processos metabólicos (MATSUDA; NISHIKAWA; TANAKA, 1995; SANDRI; CARRARO, 1999; ROSSINI et al., 2000; ALLEN; TRESINI, 2000).

Quantidades significativas de agentes oxidantes podem produzir danos ao DNA e desse modo, diretamente, induzir apoptose. Fibras do tipo I, as quais são predominantemente oxidativas, podem ser oprimidas pela quantidade de EROs produzidas e podem não ser capazes de efetivamente neutralizá-las (VOLTARELLI; MELLO; DUARTE, 2008).

Em nosso estudo, os períodos observados para verificação da apoptose foram de 24 e 48 horas após a realização de exercícios de alta intensidade tendo em vista que GÓIS et al. (2007), relatam que após o exercício físico intenso o processo de apoptose pode ainda permanecer por até 72 horas.

Cai et al.,(2006), observaram o efeito do exercício em esteira rolante realizado em diferentes intensidades (leve, moderada e exaustiva), sob o ponto de vista das alterações relacionadas à apoptose, no músculo gastrocnêmio de ratos. Esses autores verificaram que a apoptose foi observada somente nos músculos dos animais submetidos às intensidades moderada e intensa, alcançando os níveis mais elevados, após a realização do exercício, apenas no grupo de animais que efetuou exercício intenso. O índice de apoptose, ainda nesse mesmo estudo, continuou se elevando até o 1º e 3º dia após o término do exercício no grupo moderado e exaustivo, respectivamente. Os autores desse estudo preconizam que o exercício pode evocar a apoptose e acelerar a depuração celular por esse mecanismo, e o desequilíbrio entre esses dois eventos durante o exercício pode contribuir para a injúria da musculatura esquelética.

Em nosso estudo, foi obtida uma redução significativa ($p < 0,005$) do número de células apoptóticas do grupo submetido à radiação de LLLT, quando comparado ao grupo controle. Os mesmos resultados foram observados por SHEFER et al., (2002); FILLIPIN; MAURIZ (2005); RIZZI et al., (2006).

Esta diminuição evidenciada em nossos achados dá-se provavelmente devido à redução das EROs através da normalização do estado redox.

O estado redox das células é uma consequência do balanço entre os níveis de EROs, oxidantes e redutores equivalentes. Elevação nos níveis de EROs acima da capacidade de tamponamento e atividade enzimática designada para modular os níveis dessas espécies resulta em estresse oxidativo potencialmente citotóxico. Sob esta condição pró-oxidante, radicais altamente reativos podem danificar o DNA, RNA, proteínas e componentes lipídicos, que podem levar a morte celular. Apesar de várias macromoléculas estarem sujeitas ao ataque de EROs, o ataque a nucleotídeos livres ou ao DNA pode ocasionar danos permanentes devido aos efeitos deletérios destas espécies (ALLEN; TRESINI, 2000).

Nossos resultados correspondem com as conclusões de Carnevalli et al., (2003), que descrevem que a LLLT faz com que haja biomodulação positiva agindo no controle da homeostase celular, normalizando o estado redox de células que são mantidas sob condição de estresse nutricional; o laser também impede apoptose nas células CHO K-1. De acordo ainda com SHEFER et al., (2002), que obtiveram a redução da apoptose celular em cultura de células.

De acordo com Kreisler et al., (2003), o estímulo a fotorreceptores pelo laser na cadeia respiratória mitocondrial e a mudança nos níveis de ATP não estão totalmente estabelecidas, sendo um alvo de várias discussões. Geralmente admite-se que ambos os estímulos (simulador e inibidor) do laser nas células dependem da dose e duração da onda.

Fillipin e Mauriz (2005), encontraram valores de espécies reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) diminuídos significativamente em tendões de ratos irradiados e tratados com laser de baixa potência 14 e 21 dias, mostrando que a irradiação teve um efeito protetor, e as células desenvolveram um papel antioxidante positivo na inativação de excessos de EROs.

Wonbong et al., (2008), investigaram em seu estudo a proteção conferida pelo laser de 635nm contra a apoptose de fibroblastos da gengiva de humanos induzida pela exposição á irradiação ultra-violeta. Os pesquisadores concluíram que o laser serve como ferramenta de proteção contra a indução da apoptose pela irradiação ultra-violeta. Eles relatam ainda, que apesar dos mecanismos ainda não estarem bem compreendidos, acredita-se que a irradiação a laser de 635 nm seja capaz de bloquear os percursos intrínsecos e extrínsecos da apoptose celular.

Gao et al., (2006), estudaram a radiação do laser de baixa potência em apoptose induzida pelas células adenocarcinoma pulmonar (ASTC-a-1) e consideraram que a radiação laser de baixa potência (0,8 J/cm²) induziu a proliferação celular. No entanto, WU; CHENG; LIU (2007), em seu estudo, perceberam que os dados obtidos por GAO et al., (2006), não são suficientes para apoiar essas observações.

Diversos autores (KARU, 1987; KITCHEN; PARTRIDGE, 1991; BECKERMAN, 1992; WILDEN; KARTHEIN, 1998) relatam que a magnitude ou eficácia do efeito biomodulatório atribuído ao laser de baixa intensidade ao interagir com os tecidos biológicos, depende, dentre outros fatores, das condições metabólicas prévias do tecido, de

tal maneira que a resposta tende a ser ótima quando o potencial redox celular se encontra alterado como, por exemplo, num quadro de lesão tecidual, cujo ambiente celular apresenta condições que favoreçam a maior interação da radiação com os tecidos, e conseqüentemente, maior resposta biológica final (fotomodulação), diferente quando o ambiente celular encontra-se em condições de normalidade fisiológica.

Considerando os resultados obtidos podemos inferir que no grupo de exercício físico submetido ao LLLT, provavelmente, o "estresse metabólico", proporcionado pelo treinamento pode ter favorecido a maior ação do laser e, conseqüentemente, influenciado na eficácia da estimulação celular. No entanto sugerimos que novas investigações sejam realizadas analisando especificamente os mecanismos que envolvam o estado Redox e EROs.

6 CONCLUSÃO

Os achados deste estudo sugerem que o LLLT influenciou o perfil metabólico dos animais submetidos à fadiga, diminuindo o nível sérico de CK. Os achados também demonstram que o LLLT pode atuar como fator preventivo da apoptose desencadeada pelo exercício físico de alta intensidade.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADAMS, V. et al. Apoptosis in skeletal muscle. **Front Bioscience**, v. 6, p. D1-D11, 2001.
2. ALBERTINI, R. et al. Análise do efeito do laser de baixa potência (AS-Ga-Al) no modelo de inflamação de edema de pata em ratos. **Fisioterapia Brasil**, v. 3, n. 1, p. 5-15, 2002.
3. ALESSIO, H.M. Exercise-induce oxidative stress. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, Madison, v.25, p.218-24, 1993.
4. ALLEN, D. L.; ROY, R. R.; EDGERTON, V. R. Myonuclear domains in muscle adaptation and disease. **Muscle Nerve**, v. 22, n. 10, p. 1350-1360, 1999.
5. ALLEN, R.G.; TRESINI, M. Oxidative stress and gene regulation. **Free Radic Biol Med.**, v.28, n.3, p.463-99, 2000.
6. AMARAL A.C.; PARIZOTTO N.A.; SALVINI T.F. Dose-dependency of low-energy HeNe laser effect in regeneration of skeletal muscle in mice. **Lasers in Medical Science**, v.16, n. 1, p. 44 – 51, 2001.
7. ANAZETTI, M.C.; MELO, P.S. Morte Celular por Apoptose: uma visão bioquímica e molecular. **Metrocamp Pesquisa**, v.1, n.1, p.37-58, 2007.
8. ASTRAND, P.O.; RODAHL, K. **Textbook of work physiology**. New York: McGraw Hill, 1986.
9. BARCLAY, J.K.; HANSEL, M. Free radicals may contribute to oxidative muscle fatigue. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, Ottawa, v.69, p.279-84, 1990.

10. BASFORD, J.R. Low-energy Laser Therapy: controversies and new research findings. **Laser in Surgery and Medicine**, v.9, p.1-5, 1989.
11. BAXTER, G.D. **Therapeutic Lasers: Theory and Practice**. Edinburgh: Ed. Churchill Livingstone, 1994.
12. BAXTER, G.D. **Therapeutic lasers: theory and practice**. United States of America: Ed. Churchill Livingstone, 1997.
13. BERCKERMAN, H. et al. The efficacy of laser therapy for musculoskeletal and skin disorders: a criteria-based met- analysis of randomized clinical trials. **Physical Therapy**, Chicago, v. 72, n. 7, p. 483-491, 1992.
14. BIBIKOVA, A.; ORON, U. Attenuation of the process of muscle regeneration in the toad gastrocnemius muscle by low energy laser irradiation. **Lasers Surg Med**. v. 14, p.355-61, 1994.
15. BIBIKOVA, A.; ORON, U. Regeneration in denervated toad (*Bufo viridis*) Gastrocnemius muscle and the promotion of the process by low energy laser irradiation. **The Anatomical Record**, v. 241, p.123-128, 1995.
16. BILODEAU, M.; HENDERSON, T.K.; NOLTA, B.E.; PURSLEY, P.J.; SANDFORT, G.L. Effect of aging on fatigue characteristics of elbow flexor muscle during sustained submaximal contraction. **J Appl Physiol**, v. 91, p.2654-64, 2001.
17. BULIAKOVA N.V. et al. Experimental study of the effect of pulsed infrared laser radiation on skeletal muscle regeneration after mechanical trauma. **Vopr Kurortol Fizioter Lech Fiz Kult**, v. 6, p.8-11, 2000.
18. BULIAKOVA N.V.; AZAROVA V.S. Regenerative capacity of muscle tissue and thymus state in irradiated rats exposed to long-term He-Ne laser radiation. **Izv Akad Nauk Ser Biol**. v.3, p.280-93, 2004.
19. BRANCACCIO, P.; MAFFULLI, N.; LIMONGELLI, F.M. Creatine kinase monitoring in sport medicine. **Br Med Bull**. v. 81-82, p. 209-30, 2007.
20. BROTTTO, M.A.P.; NOSEK, T.M. Hydrogen peroxide disrupts Ca²⁺ release from the sarcoplasmic reticulum of rat skeletal muscle fibres. **Journal of Applied Physiology**, Washington, v.81, n.2, 1996.
21. CAI, B.T.; YU, B.; ZHAO, J.P.; ZHANG, X. Exercises at different intensities and sequential changes of rat skeletal muscle cell apoptosis. **Nan Fang Yi ke Da Xue Xue Bao**, v. 26, n.7, p.1017-1029, 2006.
22. CARNEVALLI, C.M.; SOARES, C.P.; ZÂNGARO, R.A.; PINHEIRO, A.L.; SILVA, N.S. Laser light prevents apoptosis in Cho K-1 cell line. **J Clin Laser Med Surg**. v. 21, n.4, p.193-6, 2003.
23. CARRARO, U. Apoptotic death of dystrophic muscle fibers after exercise: a new hypothesis on the early events of muscle damage. **Basic Appl Myol**, v. 5, p.371-374, 1995.

24. CARVALHO, P. et al. Análise de fi bras de colágeno através da morfometria computadorizada em feridas cutâneas de ratos submetidos a irradiação do laser HeNe. **Rev. Fisioterapia Brasil**, v. 4, n. 4, p. 253-258, 2003.
25. CLARKSON, P.M.; SAYERS, S.P. Etiology of exercise-induced muscle damage. **Can. J. Appl. Physiol.**, v. 24, p. 234-248, 1999.
26. CHEN; HSIEH. Effects of a 7-day eccentric training period on muscle damage and inflammation. **Med. Sci. Sports Exerc.** v. 33, n.10, 2001.
27. DANIAL, N.N.; KORSMEYER, S. J. Cell death: critical control points. **Cell**, Cambridge, v.116, p.205–219, 2004.
28. DAL PAI V. Esporte e lesão muscular. **Rev Brasil Neurol**, v. 30, n.2, p. 45-8, 1994.
29. DIMITROVA, N. A.; DIMITROV, G. V. Interpretation of EMG changes with fatigue: facts, pitfalls, and fallacies. **Journal of Electromyography and Kinesiology**, Oxford, v.13, n. 1, p. 13-36, 2003.
30. DIRKS, A.; LEEUWENBURGH, C. Apoptosis in skeletal muscle with aging. **American Journal of Physiology and Regulation of Integrated Comparative Physiology**, v. 282, n. 2, p. R519-527, 2002.
31. DUARTE J.A.; APPELL H.J.; CARVALHO F.; BASTOS M.L.; SOARES J.M. Endothelium-derived oxidative stress may contribute to exercise- induce muscle damage. **Int J Sports Med.**, v.14, p. 440-3, 1993.
32. DUNCAN, J.R.; PRASSE, K.W.; MAHAFFEY, E.A. **Veterinary laboratory medicine – clinical pathology**. Iowa: Iowa State University, 3.ed., p. 300, 1994.
33. ENOKA, R. M.; STUART, D. G. Neurobiology of muscle fatigue. **Journal of Applied Physiology**, Washington, v.72, n. 5, p. 1631-1648, 1992.
34. ENWEMEKA, C. S. et al. Morphometries of collagen fibril populations in he-ne laser photostimulated tendons. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, n. 8, p.151-156, 1990.
35. FAULKNER, J. A. Injury to skeletal muscle fibers during contractions: conditions of occurency and preventions. **Physical Therapy**, v.73, n.12, p. 911-20, 1993.
36. FILLIPIN, L.I.; MAURIZ, J.L. Low- level laser therapy (LLLT) prevents oxidative stress and reduces fibrosis in rat traumatized Achilles tendon. **Lasers Surg Med.**, v. 37, p. 293-300, 2005.
37. FRANKIEWICZ-JOZKO, A.; FAFF, J.; SIERADZAN-GABELSKA, B. Changes in concentration of tissue free radical marker and serum creatine kinase during the post-exercise period in rats. **European Journal of Applied Physiology**, Berlin, v.74, n.5, p. 470-74, 1996.
38. FRIDÉN, J.; LIEBER R.L. Eccentric exercise-induced injuries to contractile and cytoskeletal muscle fiber components. **Acta Physiol Scand**. v.171, p. 321- 326, 2001.

39. GABAI, V. L.; SHERMAN, M.Y. Invited review: Interplay between molecular chaperones and signaling pathways in survival of heat shock. **Journal of Applied Physiology**, v. 92, n. 4, p. 1743-1748, 2002.
40. GANDEVIA, S.C. Neural control in human muscle fatigue: changes in muscle afferents, motoneurons and motor cortical drive. **Acta Physiol Scand**, v.162, p. 275-83, 1998.
41. GAO, X.; CHEN, T.; XING, D.; WANG, F.; PEI, Y.; WEI, X. Single cell analysis of PKC activation during proliferation and apoptosis induced by laser irradiation. **J Cell Physiol.**, v.206, n.2, p. 441-8, 2006.
42. GIBALA, M. J.; MACLEAN, D. A.; GRAHAM, T. E.; SALTIN, B. Tricarboxylic acid cycle intermediate pool size and estimated cycle flux in human muscle during exercise. **American Journal of Physiology**. v. 275, n. 38, p. E235- E242, 1998.
43. GOGIA, P.P. **Laser Treatment: Clinical Wound Management**. United States of America. Slack Incorporated, p. 177-178, 1995.
44. GÓIS, L.C. et al. Mecanismos adaptativos do sistema imunológico em resposta ao treinamento físico. *Rev Bras Med Esporte*, v.13, n. 5, p. 343-348, 2007.
45. GONZÁLEZ, M.V.; CRUAÑAS, J.C. Comportamiento de la luz en la interacción con los tejidos, en especial el laser de baja potencia. **Boletim do Centro de Documentación Láser de Meditec**, n.15-16, p. 6-21, 1988.
46. HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. 2. ed. Oxford: Clarendon, 1989.
47. HARRIS, D.M. Biomolecular mechanism of laser stimulation: Editorial Comment. **J Clin Laser Med Surg.**, p. 277-80, 1991.
48. HICKS, A.L.; KENT-BRAUN, J.; DITOR, D.S. Sex differences in human skeletal muscle fatigue. **Exercise and Sport Sciences Reviews**, v. 29, p. 109-112, 2001.
49. HILAKIVI-CLARKE, L.; DICKSON, R.B. Stress influence on development of hepatocellular tumors in transgenic mice overexpressing TGF alpha. **Acta Oncol**. v.34, n. 7, p. 907-12, 1995.
50. HILL, M.; WERNIG, A.; GOLDSPINK, G. Muscle satellite (stem) cell activation during local tissue injury and repair. **J Anat.**, v. 203, n.1, p. 89-99, 2003.
51. JAKUBIEC-PUKA, A. et al. Contents of myosin heavy chains in denervated slow and fast rat leg muscles. **Comp Biochem Physiol**. v.122B, p. 355-362, 1999.

52. JENKINS, R.R.; GOLDFARB, A. Introduction: oxidant stress, aging and exercise. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, Madison, v.25, p.210-12, 1993.
53. JI, L.L. Exercise and oxidative stress: role of the cellular antioxidant systems. **Exercise and Sport Science Reviews**, v. 23, 1995, p. 135-166.
54. KASPER, C. E.; TALBOT, L. A.; GAINES, J. M. Skeletal muscle damage and recovery. **AACN Clinical Issues**, v. 13, n. 2, p. 237-247, 2002.
55. KAUFMAN, S.; LEIVO, I.; MICHELSSON, J. E. Early muscle changes after immobilization: An experimental study on muscle damage. **Clinical Orthopedic**, v. 297, p. 44-50, 1993.
56. KARU, T.I. Photobiological fundamentals of low power laser therapy. **IEEE J Quant elect QE**, v. 23, n.10, p.1703-17, 1987.
57. KARU, T. Photobiology of low-power laser effects. **Health Phys**, v. 56, n. 5, p.691-704, 1989.
58. KARU, T.; PYATIBRAT, L.; KALENDO, G. Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated in vitro. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 27, p. 219-223, 1995.
59. KARU, T. I. **The science of Low- Power Laser Therapy**. Australia: Gordon and Breach Science Publishers, 1998.
60. KARU, T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near- IR radiation on cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology- B: biology**, Lausanne, v. 49, n.1, p.1-17, 1999.
61. KITCHEN, S.S.; PARTRIDGE, C.J. A review of level laser therapy. Part I: background, physiological effects and hazards. *Physiotherapy*, v.77, n.3, p. 161-70, 1991.
62. KITCHEN, S.S.; BAZIN, S. **Eletroterapia de Clayton**. São Paulo: Ed. Manole Ltda., p. 191-210, 1996.
63. KREISLER, M.; CHRISTOFFERS, A.B.; WILLERSHAUSEN, B.; HOEDT, B. Low-level 809nm GaAlAs laser irradiation increases the proliferation rate of human laryngeal carcinoma cells in vitro. **Lasers Med Sci.**, v.18, p.100-103, 2003.
64. KREGEL, K.C. Molecular Biology of thermoregulation invited review: heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. **J. Appl. Physiol.**, v. 92, p. 2177-2186, 2002.
65. LAWLER, J. M.; POWERS, S. K.; VISSER, T.; DIJK, H. V.; KORDUS, M. J.; JI, L. L. Acute exercise and skeletal muscle antioxidant and metabolic enzymes: effects of fiber type and age. **American Journal of Physiology**, v. 265, n. 6, p. 1344-R1350, 1993.
66. LEES, S.J.; FRANKS, P.D.; SPANGENBURG, E.E.; WILLIAMS, J.H. Glycogen and glycogen phosphorylase associated with sarcoplasmic reticulum: effects of fatiguing activity. **J Appl Physiol**, v. 91, p.1638-44, 2001.

67. LI, G.; FENG, X.; WANG, S. Effects of Cu/Zn superoxide dismutase on strain injury induced oxidative damage to skeletal muscle in rats. **Physiol Res.**, v. 54, n.2, p.193-9, 2005.
68. LIEVENS, P. The influence of laser-irradiation on the motricity of the lymphatical system and on the wound healing process. In: INTERNATIONAL CONGRESS MEDICINE AND SURGERY ON LASER. **Proceedings...** Bologna, Itália, p.171-174, 1986.
69. LIEVENS, P. Effects of laser treatment on the lymphatic system and wound healing:laser. **J. Eur. Med. Laser. Ass.**, v. 1, n. 2, p.12, 1988.
70. LIEVENS, P. C. The effect of a combined HeNe and I.R. laser treatment on the regeneration of the lymphatic system during the process of wound healing. **Laser News**, v. 3, n. 3, p. 3-9, 1990.
71. LIEVENS, P.C. The effect of I.R. laser irradiation on the vasomotricity of the lymphatic system. **Laser Med. Sci.**, v. 6, p. 189-191, 1991.
72. LOPES-MARTINS, R.A.; MARCOS, R.L.; LEONARDO, P.S.; PRIANTI JR, A.C.; MUSCARÁ, M.N.; AIMBIRE, F.; FRIGO, L.; IVERSEN, V.V.; BJORDAL, J.M. Effect of low-level laser (Ga-Al-As 655 nm) on skeletal muscle fatigue induced by electrical stimulation in rats. **J Appl Physiol.**, v. 101, n.1, p.283-8, 2006.
73. LUBART, R. et al. Biostimulation of photosensitised fibroblasts by low incident levels of visible light energy. **Laser Therapy**, v. 7, p. 101-106, 1995.
74. MAIER, M.; HAINA, D.; LANDTHALER, M. Effect of low energy laser on the growth and regeneration of capillaries. **Lasers Med. Sci.**, v. 5, p. 381-386, 1990.
75. MANFREDI, T.G. et al. Plasma creatine kinase activity and exercise-induced muscle damage in older men. **Med Sci Sports Exerc.** v. 23, n. 9, p. 1028-1034, 1991.
76. MATSUDA, R.; NISHIKAW, A.; TANAKA, H. Visualization of dystrophic muscle fibers in mdx mouse by vital staining with Evans Blue: evidence of apoptosis in dystrophin deficient muscle. **J Biochem.**, v.118, p. 959-964, 1995.
77. MINAMOTO, V.B. et al. Regenerated rat skeletal muscle after periodic contusions. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.34, p. 1447-1452, 2001.
78. MIRÓ, L. et al. Estudio capiloscópico de la acción de un láser de AsGa sobre la microcirculación. **Inv. Clin. Laser.**, v. 1, n. 2, p. 9-14, 1984.
79. MORIMOTO, Y.; ARAI, T.; KIKUCHI, M.; NAKAJIMA, S.; NAKAMURA, H. Effect of Low- intensity Argon Laser Irradiation on Mitochondrial Respiration. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.15, p. 191-199, 1994.

80. NOSAKA, K.; NEWTON, M. Concentric or eccentric training effect on eccentric exercise-induced muscle damage. **Medicine Science Sport Exercise**. v. 34, p. 63-69, 2002.
81. ORTIZ, M.C.S. et al. Laser de baixa intensidade princípios e generalidades- parte 1. **Revista Fisioterapia Brasil**, Rio de Janeiro, v.2, n.4, p.221-240, 2001.
82. ORTIZ, M.C.S.; BRASILEIRO, J.S. **Aplicações dos recursos eletrotermofototerápicos em idosos**. In: REBELATO, J.R.; MORELLI, J.G.S. *Fisioterapia geriátrica: a prática da assistência ao idoso*. Barueri: Manole, 2004. p.167-214.
83. PARIZOTTO, N.A. **Ação do laser de hélio-neônio sobre processo de reparo tecidual: um estudo do colágeno por microscopia eletrônica de varredura, microscopia de força atômica e espectroscopia por infravermelho**. 1998. 181f. Tese (Doutorado)- Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 1998.
84. PODHORSKA-OKOLOW, M.; SANDRI, M.; ZAMPIERI, S.; BRUN, B.; ROSSINI, K.; CARRARO, U. Apoptosis of myofibres and satellite cells: exercise-induced damage in skeletal muscle of the mouse. **Neuropathol Appl Neurobiol.**, v. 24, n. 6, p.518-31, 1998.
85. POWERS, S.K.; LENNON, S.L. Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. **Proc. Nutr. Soc.**, v. 58, p.1025-1033, 1999.
86. PUGLIESE, L. S.; MEDRADO, A. P.; REIS, S. R. A.; ANDRADE, Z. A. The influence of low-level laser therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers. **Pesqui Odontol Bras**. v.17, 2003.
87. PRIMEAU, A. J.; ADHIHETTY, P. J.; HOOD, D. A. Apoptosis in heart and skeletal muscle. **Canadian Journal of Applied Physiology**, v. 27, n. 4, p. 349-395, 2002.
88. RADAK, Z.; KANEKO, T.; TAHARA, S.; NAKAMOTO, H.; PUCSOK, J.; SASVARI, M.; NYAKAS, C.; GOTO, S. The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v.27, n.1/2, p.69-74, 1999.
89. RASSIER, D.E.; MACINTOSH, B.R. Coexistence of potentiation and fatigue in skeletal muscle. **Braz J Med Biol Res**, v. 33, p.499-508, 2000.
90. REHM, M. et al. Single-cell fluorescence resonance energy transfer analysis demonstrates that caspase activation during apoptosis is a rapid process. Role of caspase-3. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 27, p. 24506-24514, 2002.
91. RIZZI, C.F.; MAURIZ, J.L.; FREITAS CORRÊA, D.S.; MOREIRA, A.J.; ZETTLER, C.G.; FILIPPIN, L.I.; MARRONI, N.P.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J. Effects of low-level laser therapy (LLLT) on the nuclear factor (NF) kappaB signaling path. **Lasers Surg Med.**, v.38, p. 704-13, 2006.
92. ROSSINI, K.; DONÀ, A.; SANDRI, M.; DESTRO, C. DONÀ, M.; CARRARO, U. Time course of exercise and apoptosis in dystrophin-deficient muscle of mice. **Basic Appl Myol**

v.10, n.12, p.33-38, 2000.

93. SANDRI, M.; CARRARO, U. Apoptosis of skeletal muscles during development and disease. **Int J Biochem and Cell Biol.**, v.31, p.1373-1390, 1991.

94. SCHAEFER, A.; PIQUARD, F.; GENY, B.; DOUTRELEAU, S.; LAMPERT, E.; METTAUER, B. et al. Arginine reduces exercise-induced increase in plasma lactate and ammonia. **Int J Sports Med.**, p. 403-7, 2002.

95. SEN, C.K. Antioxidant and redox regulation of cellular signaling: introduction. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 33, p. 368-370, 2001.

96. SERRÃO, F.V. Et al. Functional changes of human quadriceps muscle injured by eccentric exercise. **Braz J Med Biol Res.** v. 36, n. 6, p. 781-786, 2003.

97. SHEFER, G. et al. Low-energy laser irradiation promotes the survival and cell cycle entry of skeletal muscle satellite cells. **Journal of Cell Science**, n. 115, p. 1461-1469, 2002.

98. SMOLKA, M.B.; ZOPPI, C.C.; ALVES, A.A.; SILVEIRA, L.R.; MARANGONI, S.; PEREIRA-DASILVA, L.; NOVELLO, J.C.; MACEDO, D.V. HSP72 as a complementary protection against oxidative stress induced by exercise in the soleus muscle of rats. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 279, p. R1539-45, 2000.

99. SORICHTER, S. et al. Skeletal troponin I as a marker of exercise-induced muscle damage. **Journal of Applied Physiology**, v. 83, n. 4, p. 1076-1082, 1997.

100. STEINLECHNER, C.W.B.; DYSON, M. The effects of low level laser therapy on the proliferation of keratinocytes. **Laser Therapy**, v. 5, p. 65-73, 1993.

101. TAYLOR, J.L.; BUTLER, J.E.; GANDEVIA, S.C. Changes in muscle afferents, motoneurons and motor drive during muscle fatigue. **Eur J Appl Physiol**, v. 83, p.106-115, 2000.

102. TIIDUS, P.M. Radical species in inflammation and overtraining. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v.76, p. 533-538, 1998.

103. TSOPANAKIS, C.; TSOPANAKIS, A. Stress hormonal factors, fatigue, and antioxidant responses to prolonged speed driving. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 60, p. 747-51, 1998.

104. VIEIRA, W.H.B.; GOES, R.; COSTA, F.C.; PARIZOTTO, N.A.; PEREZ, S.E.A.; BALDISSERA, V.; MUNIN, F.S.; SCHWANTES, M.L.B. Adaptação enzimática da LDH em ratos submetidos a treinamento aeróbico em esteira e laser de baixa potência. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v. 10, n. 2, p. 205-211, 2006.

105. VIÑA, J.; GOMEZ-CABRERA, M.C.; LLORET, A.; MARQUEZ, R.; MIRIANA, J.B.; PALLARDÓ; SASTRE, J. Free radicals in exhaustive physical exercise: mechanism of production, and protection by antioxidants. **IUBMB Life**, v. 50, p. 271-277, 2000.

106. VOLFINGER, L.; LASSOURD, V.; MICHAUX, J.M.; BRAUN, J.P.; TOUTAIN, P.L. Kinetic evaluation of muscle damage during exercise by calculation of amount of creatine kinase released. **Am J Physiol.**, v.266, p. 434-41, 1994.
107. VOLTARELLI, F.A.; MELLO, M.A.R.; DUARTE, J.A.R. Apoptose e exercício físico: efeitos sobre o músculo esquelético. **Rev. Bras. De Cineantropometria & Desempenho Humano**, v.10, n.1, p. 100-105, 2008.
108. VLADIMIROV, Y.A.; OSIPOV, A.N. ; KLEBANOV, G.I. Photobiological properties of therapeutic applications of laser irradiation. **Biochem**, Moscow, v. 69, n.1, p.81-90, 2004.
109. WEBB, C.; DYSON, M.; LEWIS, W. H. P. Stimulatory effect on 660 nm low level laser energy on hypertrophic scan-derived fibroblasts: possible mechanisms for increase in cell culture. **Lasers Surg. Med.**, v. 22, p. 294-301, 1998.
110. WEISS, N.; ARON, U. Enhancement of muscle regeneration in the rat gastrocnemius muscle by low energy laser radiation. **Anatomy and Embryology**, Berlin, v. 186, n.5, p. 450-497, 1992.
111. WILDEN, L.; KARTHEIN, R. Importof radiation phenomena of electrons and therapeutic low- level laser in regard to the mitochondrial energy transfer. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, v.16, n.3, p. 159-165, 1998.
112. WOLEDGE, R.C. Possible effects of fatigue on muscle efficiency. **Acta Physiol Scand** v.162, p.267-73, 1998.
113. WONBONG, L. et al. Ultraviolet-C – Induced Apoptosis Protected by 635-nm Laser Irradiation in Human Gingival Fibroblasts. **Photomedicine and Laser Surgery**, v.26, n. 3, p. 215-220, 2008.
114. WU, M.; CHENG, Y.I.; LIU, T. Single-cell analysis of protein kinase C activation during anti apoptosis and apoptosis induced by laser irradiation. **Photomed Laser Surg.**, v.25, n.2, p.129-30, 2007.

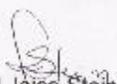
8. ANEXOS

ANEXO A- Certificado Comitê de Ética.

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº 138/2007 da Mestranda Daniela Aparecida Sussai, sob a Orientação do Prof. Paulo de Tarso Camilo Carvalho, referente ao projeto de pesquisa referente ao protocolo **“A influência da radiação Laser de baixa potência 660nm em células satélite durante o processo de reparo muscular”**, está de acordo com os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), 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 14 de março de 2007.

Campo Grande (MS), 14 de março de 2007.



Dr^a Joice Steih
Presidente da CEUA em Exercício

EDITORIAL SYSTEM



De: Archives of Medical Science [m.banach@termedia.pl]
Enviado: quinta-feira, 8 de maio de 2008 15:52
Para: Paulo de Tarso Camillo de Carvalho
Assunto: New manuscript received by Editorial office (AMS-00329-2008-01)

Dear Sir,

Thank you for your manuscript: **LOW LEVEL LASER THERAPY PREVENT INCREASE IN CREATINE KINASE LEVELS AND MUSCLE APOPTOSIS DURING RESISTANCE SWIMMING IN RATS.** The following number has been assigned to it: AMS-00329-2008-01. The manuscript will be rated by Editors and then sent to reviewers. You will be informed by email about any further decisions on this article. As you might know, we have adopted the Open Access Policy in order to makes the full text of articles of the Archives of Medical Science freely available worldwide, believing this is in the best interest of the scientific community. In order to continue this service, authors are requested to pay processing fee of 70.00 Euro (or 110 USD) for the publication of their manuscripts. This fee is requested only after positive evaluation of a manuscript.

Thank you for submitting your work to our journal.

Sincerely

Maciej Banach, MD
Editor-in-Chief
Archives of Medical Science

<http://www.archivesofmedicalsecience.com>

Editorial system is available here: <http://panel.termedia.pl/?ams>

Esta mensagem foi verificada pelo E-mail Protegido Terra.
Atualizado em 08/05/2008

ANEXO C- Artigo.

**LLLT PREVENT INCREASE IN CREATINE KINASE LEVELS AND MUSCLE
APOPTOSIS DURING FORCED SWIMMING IN RATS**

Daniella A. Sussai¹, Paulo T. C. Carvalho^{1,2}, Filipe A. dos Reis², Ana C. G. Belchior², Doroty M. Dourado², Iandara S. da Silva^{1,2}

¹ Post Graduate Program in Science Health and Development in the Central West Region, – Federal University de Mato Grosso do Sul – (UFMS), Campo Grande – MS, Brazil.

² University for the Development of the State and Pantanal Region (UNIDERP), Campo Grande – MS. Brazil.

* Correspondence to: Carvalho, P.T.C. University for the Development of the State and Pantanal Region (UNIDERP), Rua Abrico do Para Nº 146, Bairro Carandá Bosque Campo Grande – MS. Brazil. POBOX 79032423.

Abstract

Introduction: Studies suggest that high intensity physical exercises can cause damage on skeletal muscle such as pain, fatigue, inflammatory process and cellular apoptosis. This study investigated the effects of low level laser therapy (LLLT), 660 nm on decrease of Creatine Kinase levels (CK) and on the cellular apoptosis. **Material and methods:** Twenty male Wistar rats were used and randomly into two equal groups: Group 1 (Control) resistance swimming; Group 2 (LLLT), resistance swimming treated with LLLT. The animals were submitted to resistance swimming using a surcharge of 5% of corporal weight fixed no more 10 seconds, immediately after the exercise was made one unique application of laser InGaIP, output power of 100 mw, wavelength (λ) of 660 nm and 4 joules cm^2 , in the group 2. The groups were already subdivided according to samples collecting length: 24 and 48 hours. The CK was measured before and after 24 and 48 hours of the test. The samples of the gastrocnemius muscles processed to evaluation of the presence of apoptosis by the technique Terminal *Deoxynucleotidyltransferase (TdT) – Mediated dUTP Nick End Labeling (TUNEL)*. **Results:** The CK presents significative difference between the groups ($p < 0.0001$); and between the control group 24 and 48 hours when compared to LLLT group, after the same 24 and 48 hours. **Conclusions:** This study suggest that the LLLT influenced the metabolic profile of the animals submitted to fatigue, lowering the seric level, demonstrate that the LLLT can act as preventive resource of cellular apoptosis unleashes by high intensity physical exercises.

Key words: Muscle cells, Apoptosis, Creatine Kinase.

Introduction

Muscle damage in response to strenuous exercise has been well documented in humans and animal models. Exercise-induced muscle damage is characterized by delayed-onset muscle soreness, muscle fiber disarrangement muscle protein release into plasma, an acute-phase immune response, and decreased muscle performance. Regional ATP depletion, disruptions in calcium homeostasis, and oxygen free radicals all have been implicated in the etiology of muscle fiber damage and necrosis [1].

Apoptosis is a process of individual cell death regulated by activation of specific genes. Characteristic morphological features of apoptosis include nuclear and cytoplasmic condensation, fragmentation of cell into apoptotic bodies which become engulfed by phagocytes, and local absence of inflammation [2-3].

Rossini et al. [4] had described that inflammation and interstitial apoptosis occur during an intense short term exercise. One explanation is that the phenomenon is due to an increased generation of reactive oxygen species during sustained hyperemia which accompanies and follows physical muscular activity. When there is a decreasing interruption of physical activity, hyperemia is present but the increased oxygen flow is not used in metabolic processes.

The study of creatine kinase (CK) in sport medicine allows obtaining information on the state of the muscle. High levels of serum CK in apparently healthy subjects may be correlated with physical training status. However, if these levels persist at rest, it may be a sign of subclinical muscle disease, which training loads may evidence through the onset of symptoms such as profound fatigue [5].

Low-level laser therapy (LLLT) is a form of phototherapy that involves the application of low power monochromatic and coherent light to injuries and lesions. It has been used successfully to induce wound healing in no healing defects. Other wounds treated with lasers include burns, amputation injuries, skin grafts, infected wounds, and trapping injuries [6].

Photo biological reactions involve the absorption of a specific wavelength of light by the functioning photo acceptor molecule. The photo biological nature of low-power laser effects means that some molecule (photo acceptor) must first absorb the light used for the irradiation. After the promotion of electronically excited states, primary molecular processes from these states can lead to a measurable biological effect at the cellular level [7].

Redox chains containing molecules that absorb light in the visible spectral region are usually key structures that can regulate metabolic pathways. One such example is NADPH-oxidase of phagocytes' cells, which is responsible for non mitochondrial respiratory burst. This multicomponent enzyme system is a redox chain that generates reactive oxygen species (ROS) as a response to the microbicidal or other types of activation. Irradiation with the He-Ne and semiconductor lasers and LEDs can activate this chain [7].

Physiological manifestation may be increased by high levels of creatine kinase (CK), which is considered to be an indirect sign of widespread micro traumas inside the muscle. It has been shown that the anti-inflammatory drug diclofenac reduces minor muscle damage and CK levels in delayed onset muscle soreness (DOMS). In clinical settings, positive effects have also been observed in chronic muscular pain conditions. For instance, painful fibromyalgia is associated with impaired local circulation, and this disorder also seems to benefit from LLLT [8].

In this perspective, there is a clear need to investigate whether LLLT can prevent apoptosis and muscular fatigue. We decided to use the experimental model of resistance swimming test to induce fatigue in rats and test whether LLLT could prevent the anticipated increase in CK levels and if the inflammation and interstitial apoptosis.

Materials and Methods

Animals

Twenty (20) adult male rats of Wistar lineage with body weight between 300 and 350 grams were used. They came from the central vivarium at UNIDERP and were kept in two cages (ten animals per cage) under controlled lighting and temperature conditions, with standard food and water available *ad libitum*.

All the experimental procedures were carried out in accordance with the norms of the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). The animals were cared in accordance with the national guidelines for the humane treatment of laboratory animals. This study was approved by the Committee of Ethics in Research at Universidade Federal do Mato Grosso do Sul – UFMS, under protocol number 16/2007/CEP/UFMS.

The animals were randomly divided into two experimental groups, according to the procedure to be carried out: Control group (n=10): animals induced by resistance to swim until exhaustion; LLLT group (n=10): animals induced by resistance to swim until exhaustion with *LLL* irradiation. Each of these groups was further subdivided into two groups (n=5).

Swimming induction to muscular fatigue.

Weight-loaded resistance swimming test was used as described previously with some modifications [9]. The test was induced by forcing animals to swim until exhaustion. The mice were loaded with lead rings that weighed 8% of their body weight attached to the tail, and were then placed in the swimming tank filled with fresh water (approximately 30 cm deep water).

Water temperature was maintained at 25 ± 0.5 °C. Exhaustion was determined by observing loss of coordinated movements and failure to return to the surface within 10 s. This 10 s criterion

was considered to correlate with exhaustion and was used as an indication of the maximum swimming capacity of the animal. Rats were removed at this point, before drowning.

Laser irradiation.

An InGaAlP type diode laser (Photon Laser III DMC[®]) with a continuous output power of 100 mW and wavelength (λ) of 660 nm (visible red) was used. The optical power was calibrated using a Newport multifunction optical meter model 1835C. The spot size was 2 mm².

The gastrocnemius muscle was irradiated with 4 J/cm² during 40s; the application was made just after the weight-loaded forced swimming. The animals were placed in *decubitus* position and the paw that was going to be treated was placed in extension and external rotation and the laser illumination spot was placed in contact with the central part prominence of the gastrocnemius muscle. Irradiated animals received irradiation on this single point.

Biochemical parameter CK activity

Blood samples (1.8 a 2.0 mL) of all experimental groups (n = 20) were collected by means of cardiac puncture directly into heparinized tubes at 24 h and 48 h. Immediately collection, the blood samples were centrifuged (2.000 rpm/25 min) for serum separation and colorimetric determination of CK (EC 2.7.3.2) activity using a CK-NAK kit (Wiener Lab., Rosario, Argentina). The CK value was expressed in units/liter (U/l), with one unit defined as the amount of enzyme phosphorylation producing one micromole of NADH/min at 25°C.

Terminal Deoxynucleotidyltransferase (TdT)-Mediated dUTP Nick End Labeling (TUNEL) Staining.

For TUNEL peroxidase staining, we used the *In Situ* Cell Death kit (Roche Diagnostics). The treated cells were attached on poly (L-lysine) – coated glass-bottomed dishes and fixed for 30 min in 4% paraformaldehyde in PBS (pH 7.4). After the cells being washed three times with PBS, the endogenous peroxidase was inactivated by incubation with 3% hydrogen peroxide (H₂O₂) in methanol for 30 min at room temperature. The cells were then washed with PBS and subsequently permeabilized for 2 min on ice with 0.1% sodium-citrate solution containing 0.1% Triton X-100. The cells were then washed twice with PBS, stained with the TUNEL reaction mixture for 60 min at 37°C, washed twice with PBS and labeled with peroxidase-conjugated goat Ab for 30 min at 37°C. DNA fragmentation was detected by staining with diaminobenzidine. Brown colors of nucleotides were taken as the positive staining of apoptotic cell and in each group were quantified by counting the output of positive cells per 08 fields in 400X power lens under light microscopy [10].

Statistical analysis

The original data were tested with GraphPad software. All the results are presented with mean ± standard deviation. One way analysis of variance (ANOVA) and post hoc Tukey's test was used for statistical analysis, and all tests were considered to be statistically significant at p<0.05.

Results

Activity of the Creatine Kinase

The values obtained from the checking of seric CK levels in the animals submitted to the exercise of swimming forced up to the exhaustion are presented in form of average standard deviation and they can be checked in the table I, the data were submitted to the analysis of variance (ANOVA) and we could observe that (p <0.0001):

Table I

It is possible to notice a significant increase ($p < 0.001$), in creatine kinase liberation in the group 1 (control), in the first 24 hours ($561.1 \text{ U/l} \pm 38.09$) when compared to the group treated with LLLT, after same time ($230.0 \text{ U/l} \pm 24.91$). (Figure 1)

Such distinguish occurred in the period of 48 hours. Comparing the same groups, it was obtained what indicates a great difference ($p < 0.001$) between the results of the groups in several periods of the work. (Figure 2)

The peak of liberation was observed after 24 hours of the realization of the physical exercise in the group control to 599.45 U/L , an elevated value when compared with the values of the group treated 48 hours what it was of 157.14 U/L .

On the other hand, in the analysis between the sub-groups for treaties and non-treaties, there was obtained statistically significant result ($p < 0.001$) for all the statistical crossroads, with exception for the comparison between the treated sub-group; in other words: 24 hours LLLT versus 48 LLLT with ($p > 0.05$). (Figure 3)

Terminal Deoxynucleotidyltransferase (TdT)-Mediated dUTP Nick End Labeling (TUNEL)

When slides processed for lamining were subjected to in situ analysis of DNA fragmentation, nucleotides were positive for TUNEL and were detected inside myofiber in subsarcolemmal. Nevertheless the double labeling confirmed the presence of most apoptotic level and the rats presented after 24 hours exercise with a peak 66.3 ± 13.2 apoptotic cell and 39.0 ± 6.8 after 48h. Apoptotic cell increased significantly in Control non LLLT group muscle after 24 hours exercise with a peak (159.4 ± 25.8) after 48 hours of forced swimming (89.2 ± 25.4) ($p < 0.05$). (Table II) (Figure 4 and 5)

Discussion

It is commonly accepted that swimming is an experimental exercise model. It has been demonstrated that swimming can also be used effectively as a stress factor since rats are not normally aquatic animals. Thus, it appeared that the rat swimming model used in this study can be employed to evaluate exercise durability and then stress study [8].

Serum CK is widely accepted as an indicator of muscle damage after endurance exercise. Many investigators have used the enzyme to indicate the injury damage of muscles [12-13].

Biochemical markers of skeletal muscle damage are creatine kinase (CK), aspartate aminotransferase, lactate dehydrogenase, myoglobin, and troponin. Creatine kinase is a muscle enzyme in which there is a significant rise in the plasma levels after surgical procedures, trauma, myocardial infarction and heavy muscular exercise [14-15].

The main findings of our study were the LLLT decreased the indicator of muscle damage after swimming exercise. The levels of serum CK were significantly lower in LLLT groups than in the control group.

Lopes-Martins et al. [8] investigated the LLLT effects in the experimental model of electrical nerve stimulation to induce fatigue by tetanic tibial muscle contraction in rats and test whether LLLT could prevent the anticipated reduction of strength muscle or the anticipated increase in CK levels and concludes that LLLT could reduce the debilitating influence of local fatigue on strength muscle and possibly reduce muscle damage after strenuous exercises.

Our results confirm those found by the researches previously mentioned that describe the LLLT positive in possible reduction of muscle fatigue and that could reduce muscle damage after strenuous exercises, considering the reduction of seric CK levels [11].

In this study we also carry out an investigation of the cellular apoptosis. Recent studies have shown that adult skeletal muscles can undergo apoptosis in murmur it is several times stimulated, like dystrophinopathies, exercise, ischemia, denervation and atrophy [16-17].

Apoptosis is a well accepted type of cell death during development of mammalian muscles, but death of adult myofibers in neuromuscular disorders and exercise-induced muscle damage is usually explained in terms of muscle necrosis [4].

The apoptosis occurs during an intense exercise. One explanation is that the phenomenon is due to an increased generation of reactive oxygen species during sustained hyperemia which follows and accompanies physical muscular activity. When there is a decreasing or interruption of physical activity hyperemia is present but the increased oxygen flow is not used in metabolic processes [4-17-18-19].

In our study it was obtained a significant reduction of the number of apoptic cells of the group radiated the LLLT when compared to the control the group; the reduction of apoptic cells is probably due to the reduction of reactive sorts of oxygen (ROS) through the normalization of the state redox. Same results observed by Rizzi et al. [20]

The redox state of the cells is a consequence of the swimming between the levels of ROS, oxidant and reducing equivalents. Elevation in the levels of ROS increase the capacity of tamponament and enzymatic activity used to modulate these levels and turns in stress oxidative potentially citoxic. In spite of several macromolecules are submitted to the attack of ROS, the attack to free nucleotides or to a DNA can cause constant damages due to the harmful effects on these species [21].

Our results match with the conclusions of Carnevali et al. [22] where they describe that LLLT, in addition you providing makes it positive biomodulation, acts in the criminal - establishment of cellular homeostasis when the cells plows maintained under the condition of nutritional stress; it also prevents apoptosis in CHO K-1 cells, and when they turned out to be

obtained by Shefer et al. [23] that obtained the reduction of the cellular apoptosis in culture of satellite muscular cells.

In agreement with Kreisler et al. [24] the stimulation of the photoreceptors by the laser in the respiratory mitochondrial chain, change in the levels of ATP are not quite established, being a target of several discussions. Generally it is accepted that both stimuli effects and inhibitory of the laser in the cells they are dose and length of dependent wave.

Gao et al. [25] observed that low power laser irradiation induced anti-apoptosis for lung Adenocarcinoma (ASTC-a-1) cells and considered that low-power laser irradiation (0.8 J/cm²) induced proliferation cells. Nevertheless, Wu and Cheng [26], in this study, realized that data obtained for Gao et al. [25] are not sufficient to support such observations.

Wu et al. [27] show also results: that the high-fluency LLLT (120 joules) does not activate caspase-8, indicating that the induced apoptosis was initiated directly from mitochondrial ROS generation and DeltaPsim decrease, independent of the caspase-8 activation.

According to Kreisler et al, [24], the stimulation of the photoreceptors for the laser in the mitochondrial respiratory chain and the change in the levels of ATP are not quite established, being a target of several discussions. Generally it is accepted that both effects stimulatory and inhibitory of the laser in the cells they are dose and length of dependent wave.

The magnitude or efficiency of the effect biomodulatory attributed to the laser of low intensity while interacting with the biological tissues, is dependent, among other factors, of the metabolic prior conditions of the tissue, in such a way that the answer tends towards to be the best when the potential redox cellular is changed.

Considering that the answer in the current study was mager in the group physical exercise undergoing to the LLLT, probably the " metabolic stress " provided by the training can have favored the biggest action of the laser and consequently major in the effectiveness of stimulatory cellular.

Conclusion

The results of our study suggest that the LLLT influenced the metabolic scheme of the animals undergoing to the fatigue, reducing the seric level of CK. The results also demonstrate that the LLLT can act like preventive factor of the apoptosis unleashed by the physical exercise of high intensity.

References

1. Stupka N, Lowther S, Chorneyko K, Bourgeois JM, Hogben C, Tamopolsky MA. Gender differences in muscle inflammation after eccentric exercise. *J Appl Physiol*. 2000 Dec; 89 (6):2325-32.
2. Steller H: Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 1995; 267: 1445-1449.
3. Hale AJ, Smith CA, Sutherland LC, Stoneman VEA, Longthorne VL, Culhane AC, Williams GT: Apoptosis: molecular regulation of cell death. *Eur J Biochem* 1996; 236: 1-26.
4. Rossini K, Donà A, Sandri M, Destro C, Donà M, Carraro U. Time-course of exercise and apoptosis in dystrophin-deficient muscle of mice. *Basic Appl Myol* 2000; 10 (1-2): 33-38.
5. Brancaccio P, Maffulli N, Limongelli FM. Creatine kinase monitoring in sport medicine. *Br Med Bull*. 2007; 81-82:209-30.
6. Hawkins D, Hourelid N, Abrahamse H. Low level laser therapy (LLLT) as an effective therapeutic modality for delayed wound healing. *Ann N Y Acad Sci*. 2005 Nov; 1056:486-93.
7. Karu T. Photobiology of low-power laser effects. *Health Phys*. 1989 May; 56(5):691-704.
8. Lopes-Martins RA, Marcos RL, Leonardo PS, Prianti AC Jr, Muscarà MN, Aimbire F, Frigo L, Iversen VV, Bjordal JM. Effect of low-level laser (Ga-Al-As 655 nm) on skeletal muscle fatigue induced by electrical stimulation in rats. *J Appl Physiol*. 2006 Jul;101(1):283-8.

9. Wu JL, Wu QP, Huang JM, Chen R, Cai M, Tan JB. Effects of L-malate on physical stamina and activities of enzymes related to the malate-aspartate shuttle in liver of mice. *Physiol Res.* 2007; 56(2):213-20.
10. Parton, M., Dowsett, M., Smith, I. Studies of apoptosis in breast cancer. *BMJ.* 2001; (322): 1528- 32.
11. Fillipin LI, Mauriz JL, Vedovelli K, Moreira AJ, Zettler CG, Lech O, Marroni NP, González-Gallego J. Low-level laser therapy (LLLT) prevents oxidative stress and reduces fibrosis in rat traumatized Achilles tendon. *Lasers Surg Med.* 2005 Oct ;37(4):293-300.
12. Hilakivi-Clarke L., Dickson, R.B. Stress influence on development of hepatocellular tumors in transgenic mice overexpressing TGF alpha. *Acta Oncol.* 1995; 34(7):907-12.
13. Volfinger L, Lassourd V, Michaux JM, Braun JP, Toutain PL. Kinetic evaluation of muscle damage during exercise by calculation of amount of creatine kinase released. *Am J Physiol.* 1994 Feb; 266(2 Pt 2):R434-41.
14. Li G, Feng X, Wang S. Effects of Cu/Zn superoxide dismutase on strain injury-induced oxidative damage to skeletal muscle in rats. *Physiol Res.* 2005; 54(2):193-9.
15. Brancaccio P, Maffulli N, Limongelli FM. Creatine kinase monitoring in sport medicine. *Br Med Bull.* 2007; 81-82: 209-30.
16. Carraro U: Apoptotic death of dystrophic muscle fibers after exercise: a new hypothesis on the early events of muscle damage. *Basic Appl Myol* 1995; 5: 371-374.
17. Podhorska-Okolow M, Sandri M, Zampieri S, Brun B, Rossini K, Carraro U. Apoptosis of myofibres and satellite cells: exercise-induced damage in skeletal muscle of the mouse. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1998 Dec; 24(6):518-31.
18. Matsuda R, Nishikawa A, Tanaka H: Visualization of dystrophic muscle fibers in mdx mouse by vital staining with Evans Blue: evidence of apoptosis in dystrophin-deficient muscle. *J Biochem* 1995; 118: 959-964.

19. Sandri M, Carraro U: Apoptosis of skeletal muscles during development and disease. *Int J Biochem and Cell Biol* 1999; 31: 1373-1390.
20. Rizzi CF , Mauriz, JL , Freitas Corrêa, DS , Moreira, AJ , Zettler, CG, Filippin, LI, Marroni, NP, González-Gallego, J. Effects of low-level laser therapy (LLL) on the nuclear factor (NF) kappaB signaling path. *Lasers Surg Med* (2006) 38: 704-13.
21. Allen RG, Tresini M. Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic Biol Med*. 2000 Feb 1;28 (3):463-99.
22. Carnevalli CM, Soares CP, Zângaro RA, Pinheiro AL, Silva NS. Laser light prevents apoptosis in Cho K-1 cell line. *J Clin Laser Med Surg*. 2003 Aug; 21(4):193-6.
23. Shefer G, Partridge TA, Heslop L, Gross JG, Oron U, Halevy O. Low-energy laser irradiation promotes the survival and cell cycle entry of skeletal muscle satellite cells. *J Cell Sci*. 2002 Apr 1;115 (Pt 7):1461-9.
24. Kreisler M, Christoffers AB, Willershausen B, Hoedt B. Low-level 809nm GaAlAs laser irradiation increases the proliferation rate of human laryngeal carcinoma cells in vitro. *Lasers Med Sci*. 2003;18:100-103.
25. Gao X, Chen T, Xing D, Wang F, Pei Y, Wei X. Single cell analysis of PKC activation during proliferation and apoptosis induced by laser irradiation. *J Cell Physiol*. 2006 Feb;206(2):441-8
26. Wu M, Cheng-Yi Liu T. Single-cell analysis of protein kinase C activation during anti-apoptosis and apoptosis induced by laser irradiation. *Photomed Laser Surg*. 2007 Apr; 25(2):129-30
27. Wu S, Xing D, Wang F, Chen T, Chen WR. Mechanistic study of apoptosis induced by high-fluence low-power laser irradiation using fluorescence imaging techniques. *J Biomed Opt*. 2007 Nov-Dec; 12 (6):064015.

Table I. Activities of CK in gastrocnemius muscle of rat 24 and 48 hours after forced swimming
LLLT and non LLLT irradiation.

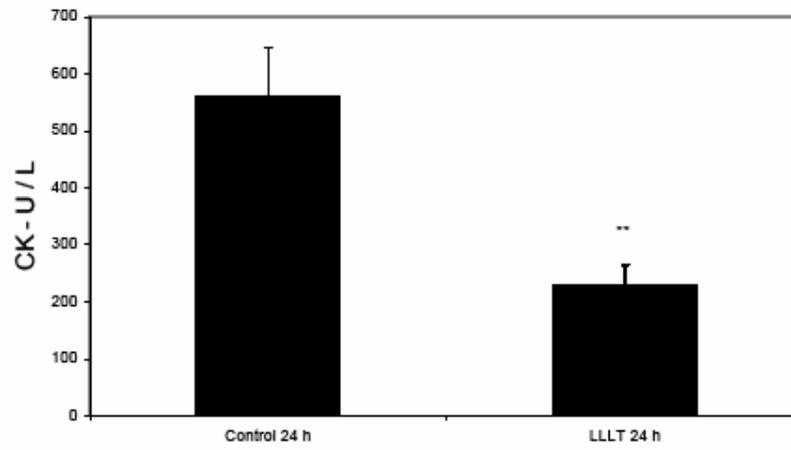
| Grupo 1 | | Grupo 2 | |
|----------------------|---------------------|--------------------|--------------------|
| Controle 24 h | Controle 48h | (LLLT 24 h) | (LLLT 48h) |
| 591.30 | 407.69 | 201.99 | 195.07 |
| 530.01 | 403.61 | 225.77 | 157.14 |
| 599.45 | 444.37 | 241.13 | 187.03 |
| 512.80 | 399.41 | 214.69 | 190.0 |
| 572.05 | 414.54 | 266.34 | 271.59 |
| 561.1±38.09 | 413.9±17.91 | 230.0±24.91 | 180.2±20.40 |

Values are the means and ± S.D.

Table II: The number of TUNEL-positive cells in the gastrocnemius muscle of rat 24 and 48 hours after forced swimming *LLT* and non *LLT* irradiation.

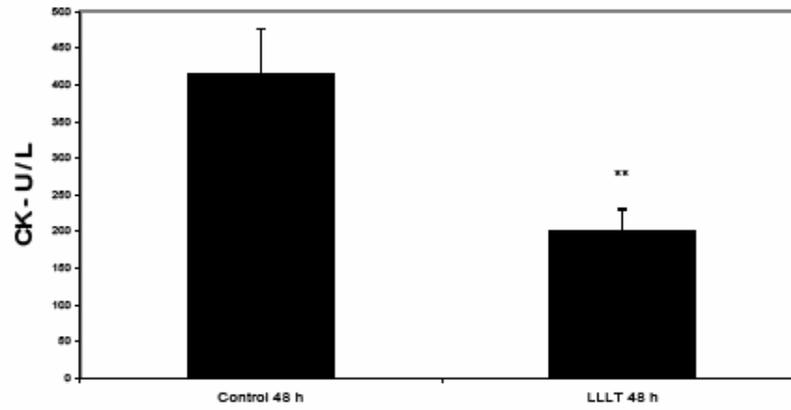
| Group 1 | | Group 2 | |
|---------------|--------------|------------|-----------|
| Controle 24 h | Controle 48h | (LLT 24 h) | (LLT 48h) |
| 158 | 84 | 74 | 40 |
| 162 | 90 | 65 | 42 |
| 220 | 150 | 61 | 48 |
| 140 | 71 | 59 | 30 |
| 148 | 76 | 40 | 28 |
| 139 | 73 | 79 | 45 |
| 157 | 86 | 73 | 40 |
| 151 | 84 | 80 | 39 |
| 159.4±25.8 | 89.2±25.4 | 66.3±13.2 | 39.0±6.8 |

Values are the means and ± S.D.



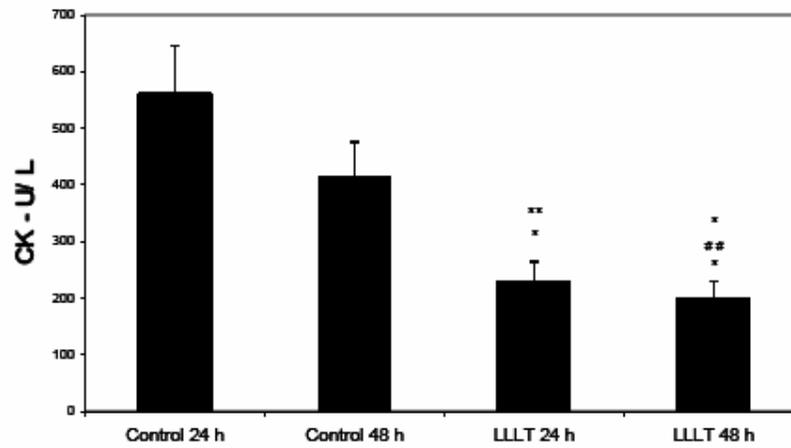
**p<0.001 indicates very significant difference of the control group.

Figure 1: Comparative of CK standard average between the groups treated with LLLT and control when it was not treated 24 hours after force swimming.



**p<0.001 indicates very significant difference related to control group.

Figure 2: Comparative printer of the averages and divert I standard of CK between the groups treated with LLLT and when (control) it was not treated 48 hours after the exercise of forced swimming.



**p<0.001 indicates very significant difference from the control group 24 h; * p<0,001 indicates very significant difference from the control group 48 h; # # p>0.05 indicates not significant difference from the group LLLT 24 h.

Figure 3: Comparative printer of the averages and I standard of CK between the groups treated with LLLT and when (control) it was not treated 48 hours after the exercise of forced swimming.

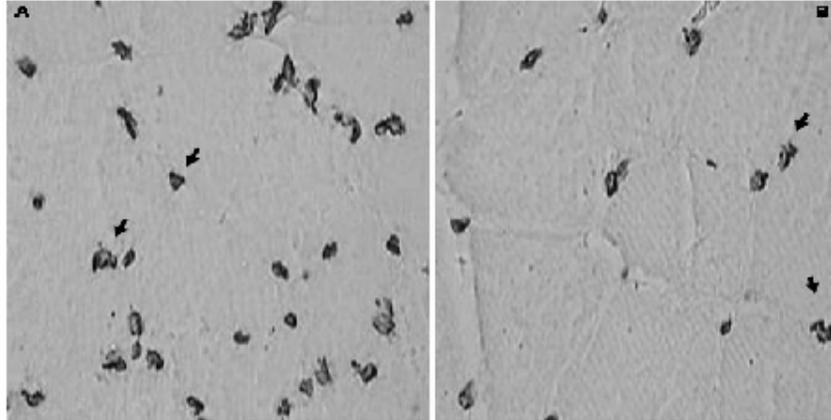
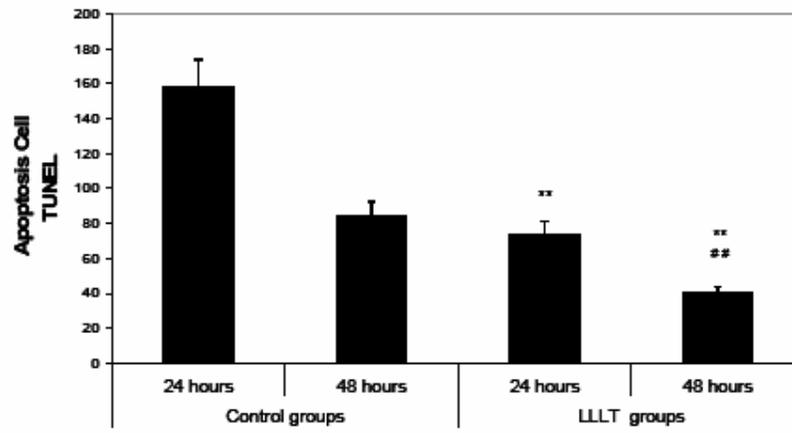


Figure 4: Muscular fibers submitted to the TUNEL technique. Letters A refer to the gastrocnemius muscle control group 24 hours; the arrows point to myonuclei with apoptotic characteristics, in B, LLLT group 24 hours.



**p<0.001 indicates very significant difference from the control group 24 h; ** p<0,001 indicates very significant difference from the control group 48 h.

Figure 5: Comparative printer of the averages and I divert standard of the apoptosis when TUNNEL was obtained by the method between the groups treated with LLLT and when (control) was not treated 24 and 48 hours after the exercise of forced swimming.

Table I. Activities of CK in gastrocnemius muscle of rat 24 and 48 hours after forced swimming
LLLT and non LLLT irradiation.

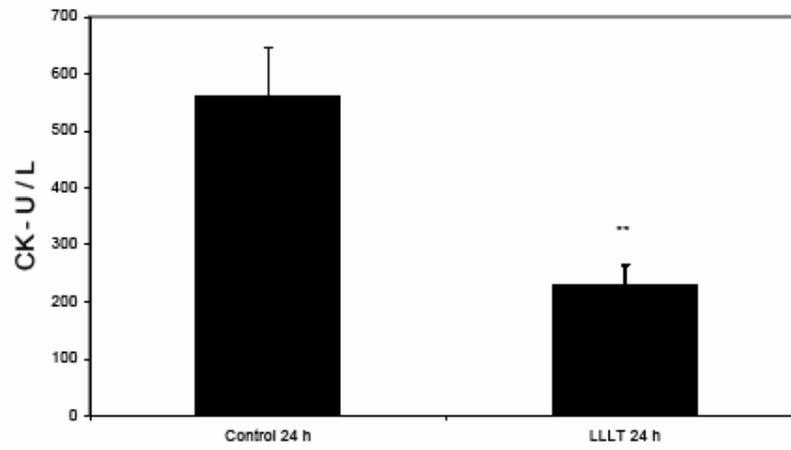
| Grupo 1 | | Grupo 2 | |
|----------------------|---------------------|--------------------|-------------------|
| Controle 24 h | Controle 48h | (LLLT 24 h) | (LLLT 48h) |
| 591.30 | 407.69 | 201.99 | 195.07 |
| 530.01 | 403.61 | 225.77 | 157.14 |
| 599.45 | 444.37 | 241.13 | 187.03 |
| 512.80 | 399.41 | 214.69 | 190.0 |
| 572.05 | 414.54 | 266.34 | 271.59 |
| 561.1±38.09 | 413.9±17.91 | 230.0±24.91 | 180.2±20.40 |

Values are the means and ± S.D.

Table II: The number of TUNEL-positive cells in the gastrocnemius muscle of rat 24 and 48 hours after forced swimming *LLT* and non *LLT* irradiation.

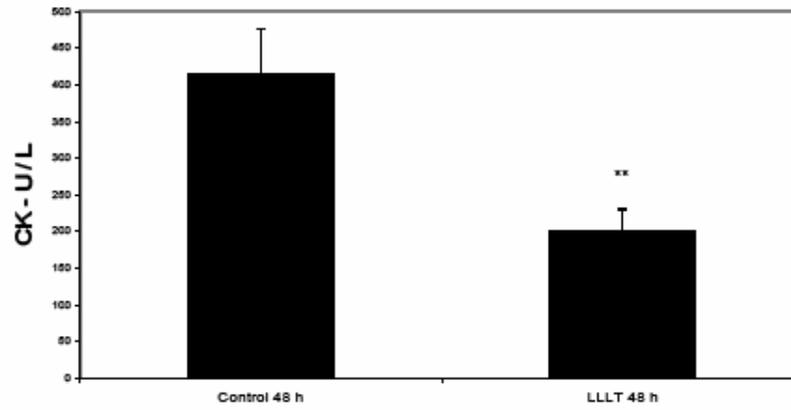
| Group 1 | | Group 2 | |
|---------------|--------------|------------|-----------|
| Controle 24 h | Controle 48h | (LLT 24 h) | (LLT 48h) |
| 158 | 84 | 74 | 40 |
| 162 | 90 | 65 | 42 |
| 220 | 150 | 61 | 48 |
| 140 | 71 | 59 | 30 |
| 148 | 76 | 40 | 28 |
| 139 | 73 | 79 | 45 |
| 157 | 86 | 73 | 40 |
| 151 | 84 | 80 | 39 |
| 159.4±25.8 | 89.2±25.4 | 66.3±13.2 | 39.0±6.8 |

Values are the means and ± S.D.



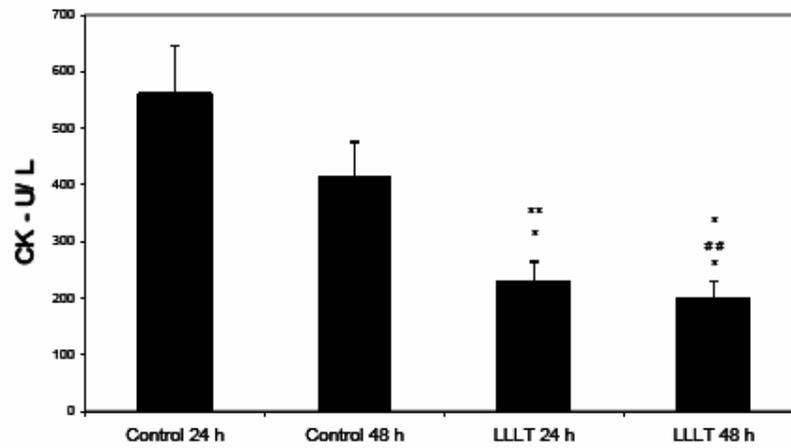
**p<0.001 indicates very significant difference of the control group.

Figure 1: Comparative of CK standard average between the groups treated with LLLT and control when it was not treated 24 hours after force swimming.



**p<0.001 indicates very significant difference related to control group.

Figure 2: Comparative printer of the averages and divert I standard of CK between the groups treated with LLLT and when (control) it was not treated 48 hours after the exercise of forced swimming.



** $p < 0.001$ indicates very significant difference from the control group 24 h; * $p < 0.001$ indicates very significant difference from the control group 48 h; # $p > 0.05$ indicates not significant difference from the group LLLT 24 h.

Figure 3: Comparative printer of the averages and I standard of CK between the groups treated with LLLT and when (control) it was not treated 48 hours after the exercise of forced swimming.

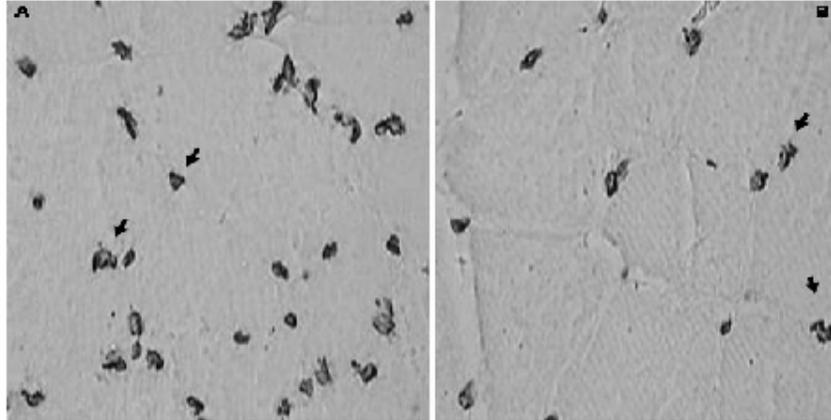
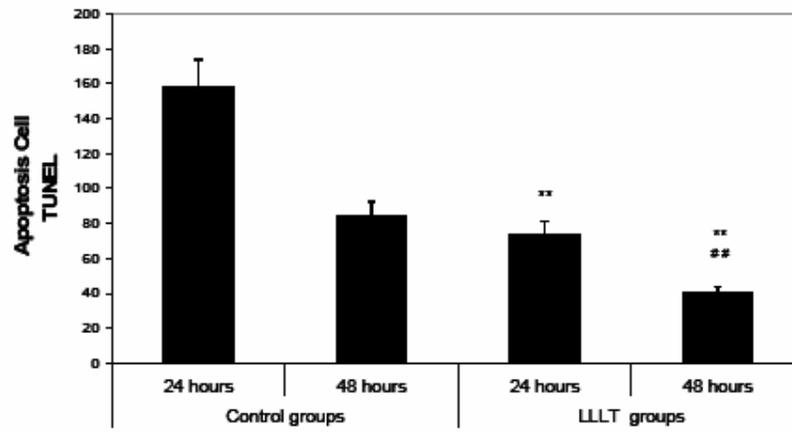


Figure 4: Muscular fibers submitted to the TUNEL technique. Letters A refer to the gastrocnemius muscle control group 24 hours; the arrows point to myonuclei with apoptotic characteristics, in B, LLLT group 24 hours.



**p<0.001 indicates very significant difference from the control group 24 h; ** p<0,001 indicates very significant difference from the control group 48 h.

Figure 5: Comparative printer of the averages and I divert standard of the apoptosis when TUNNEL was obtained by the method between the groups treated with LLLT and when (control) was not treated 24 and 48 hours after the exercise of forced swimming.