

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)

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 cm². 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- miliwatts

mW/cm² - miliwatts por centímetro quadrado

nm - nanômetros

NADH - nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida

O₂^{•−} - 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