



PAULO CESAR LOCK SILVEIRA

**INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DO LASER DE BAIXA  
POTÊNCIA NA RECUPERAÇÃO DE LESÕES EPIDÉRMICAS E  
MUSCULARES EM ROEDORES**

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dra. Alexandra Latini  
Coorientador: Prof. Dr. Marcelo Farina

Florianópolis  
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Silveira, Paulo Cesar Lock

Investigação do efeito do laser de baixa potência na recuperação de lesões epidérmicas e musculares em roedores / Paulo Cesar Lock Silveira ; orientadora, Alexandra Latini ; co-orientador, Marcelo Farina. - Florianópolis, SC, 2013.

110 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

Inclui referências

1. Bioquímica. 2. Laser de baixa potência. 3. lesão dérmica e lesão muscular, . 4. estresse oxidativo, . 5. inflamação e mitocôndria. I. Latini , Alexandra . II. Farina, Marcelo . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. IV. Título.

**“Investigação do efeito do Laser de Baixa Potência na recuperação de lesões epidérmicas e musculares em roedores”**

por

**PAULO CESAR LOCK SILVEIRA**

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (Port. 13/PPGBQA/2013) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica - UFSC, composta pelos Professores Doutores:

Banca Examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
**Prof(a) Dr(a) Alexandra Susana Latini** (Orientadora/BQA/CCB/UFSC)


  
\_\_\_\_\_  
**Prof(a) Dr(a) Marcelo Farina** (Coorientador/BQA/CCB/UFSC)

  
\_\_\_\_\_  
**Prof(a) Dr(a) Gustavo da Costa Ferreira** (PPGCS/UNESC)

  
\_\_\_\_\_  
**Prof(a) Dr(a) Patricia Fernanda Schuck** (PPGCS/UNESC)

  
\_\_\_\_\_  
**Prof(a) Dr(a) Ricardo Aurino Pinho** (PPGCS/UNESC)

  
\_\_\_\_\_  
**Prof(a) Dr(a) Aderbal Silva Aguiar Junior** (PPGBQA/CCB/UFSC)

  
\_\_\_\_\_  
**Prof(a) Dr(a) Andreza Fabro de Bem** (BQA/CCB/UFSC)

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk**  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

Florianópolis, 22 de março de 2013



Dedico esse trabalho à minha mãe  
por toda dedicação e carinho .



## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a meus pais e irmãos por terem dado incentivo em continuar a carreira acadêmica, principalmente minha mãe que passou por cima de muitos problemas sempre com pensamento positivo e nos mostrando o caminho certo a seguir.

À minha parceira, amiga, namorada Paula por ser uma pessoa única, daquelas que a gente conhece poucas na vida. Sempre do meu lado ajudando de todas as formas, sempre pronta para o que der e vier. Agradeço a Deus por tê-la colocado na minha vida.

À professora Alexandra por todo conhecimento que aprendi, por apoiar as minhas ideias e por dar oportunidade de ampliar o conhecimento com viagens ou visitas em outros laboratórios. Acima de tudo uma pessoa com coração bom, sempre pronta para ajudar e preocupada com o futuro de seus alunos. Agradeço por tudo nesses 4 anos.

Aos meus amigos de laboratório Aline, Débora, Vivi, Karina, Fritz, Roberta, Lucila, Jade, Marcos, Lara, Alessandra, Giordano e Adalberto que sempre foram acolhedores, parceiros de experimentos e sempre dividimos os momentos tristes e felizes da vida.

Aos amigos Gianni, Wagner e Karen que além de amigos de laboratório se tornaram amigos na vida pessoal, parceiros de longas conversas, festas, viagens e sempre ajudando nos momentos difíceis.

E também queria agradecer à banca por ler e avaliar meu trabalho. Alguns participaram mais outro menos, mas todos ajudaram de alguma forma.

E por fim agradecer a CAPES, CNPq, FAPESC, UFSC e o Laboratório de Bioenerg.





## RESUMO

Estudos nos últimos anos tem demonstrado que a terapia com laser de baixa potência (LBP) modula vários processos bioquímicos, principalmente aqueles relacionados ao aumento da respiração mitocondrial e síntese de ATP, com consequente redução de lesões musculares e dérmicas, bem como acelerando o processo de cicatrização. O presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a influência da terapia com LBP sobre o processo de cicatrização de feridas dérmicas e também em um modelo de lesão muscular traumática. Além disso, foram avaliados os efeitos da irradiação com LBP sobre atividade da cadeia respiratória em mitocôndrias isoladas de músculo esquelético e em parâmetros relacionados com a respiração celular em células musculares da linhagem L6. Primeiramente nossos resultados demonstram que o LBP Hélio Neônio (HeNe) e Arsênito de Gálio (AsGa) com comprimentos de onda de 632 e 904 nm, respectivamente, e doses de 1 e 3 J/cm<sup>2</sup> induziram um maior fechamento da ferida estimulou a produção de colágeno, aumentando o conteúdo de hidroxiprolina e diminuiu os danos oxidativos a lipídeos e proteínas e as atividades das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) em um modelo de lesão epidérmica, quando comparado com o grupo lesão sem laser. No segundo experimento, demonstramos que o laser AsGa com doses de 3 J/cm<sup>2</sup> com início de irradiação 2 horas após a lesão muscular traumática induziu uma diminuição em todos os parâmetros de estresse oxidativo analisados, tais como os conteúdos de oxidação de lipídeos e proteínas, atividades das enzimas antioxidantes glutatona peroxidase (GPX), SOD e CAT e na concentração de nitritos no plasma e no músculo induziu uma diminuição na expressão gênica de IL-6, VEGF e BDNF como também um aumento na IL-10 no tecido muscular traumatizado e irradiado até 5 dias após a lesão. Os resultados relacionados a parâmetros comportamentais de déficit motor (campo aberto) também comprovaram que os animais com lesão muscular e tratados com a dose de 3 J/cm<sup>2</sup> tiveram um aumento na distância percorrida e no número de levantamentos comparados com o grupo lesão muscular, demonstrando uma melhora no déficit motor induzido pela lesão muscular. Os resultados com mitocôndrias musculares saudáveis demonstraram que a irradiação com LBP HeNe com doses de 30 e 60 J/cm<sup>2</sup> induziu um aumento significativo nas atividades do complexo I e IV 5 minutos após a irradiação. Além disso, o LBP com doses de 10, 30 e 60 J/cm<sup>2</sup> também aumentou a atividade do complexo IV 1 hora após a irradiação. Estudos *in vitro* com células saudáveis L6

demonstraram que a irradiação com LBP HeNe e dose de  $10 \text{ J/cm}^2$  teve uma contribuição maior da ATP sintase ao consumo de oxigênio basal e uma concentração maior de FCCP foi usada para induzir a capacidade máxima respiratória. Neste contexto, o presente estudo evidencia que o LBP pode induzir um aumento na velocidade de cicatrização de feridas e acelerar o processo inflamatório agudo da lesão muscular traumática, provavelmente devido a sua capacidade de aumentar o estado energético da mitocôndria e diminuir parâmetros de inflamação e de estresse oxidativo.

**Palavras-chave:** Laser de baixa potência, lesão dérmica, lesão muscular, estresse oxidativo, inflamação e mitocôndria.

## ABSTRACT

Many studies performed in the past 40 years have proposed that low-power laser (LPB) therapy reduces dermal and muscle injuries and accelerates the healing process, by modulating several biochemical processes, including those associated with increased mitochondrial respiration and ATP synthesis. The present study aimed to evaluate the influence of LPB therapy on dermal wound healing and on the recovering from muscle injury. In addition, the effects of LPB irradiation on mitochondrial respiratory chain activity and oxygen consumption in skeletal muscle and muscle L6 cell line, were also evaluated. Irradiation with LPB Helium Neon (HeNe) and Galeo arsenide (GaAs) at wavelengths of 632 and 904 nm, and doses of 1 and 3 J/cm<sup>2</sup>, respectively, accelerated the wound repair, stimulated the collagen production, by increasing the hydroxyproline content and also by decreasing the concentration of oxidized lipids and proteins. The activities of the antioxidants enzymes, including superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) were also decreased after the LPB treatment. The second set of experiments demonstrated that the application of the AsGa laser with 3 J/cm<sup>2</sup>, 2 hours after the traumatic-induced muscle lesion decreased the oxidative stress parameters, including the activity of antioxidant enzymes, oxidative damage markers and nitrite levels in plasma and muscle tissue. In addition, the irradiation decreased the gene expression of IL-6, VEGF e BDNF, and increased the IL-10 content on injured muscle after 5 days of irradiation. Rat spontaneous locomotor activity, measured in the open field arena, was reduced in trauma-receiving animals. The LPB irradiation (3 J/cm<sup>2</sup>) reverted this effect by increasing the distance traveled and the number of withdrawals of the animals. The third group of experiments showed that healthy muscle mitochondria irradiated with LPB HeNe, with doses of 30 and 60 J/cm<sup>2</sup>, induced a significant increment in the activity of complexes I and IV 5 minutes after the irradiation. Additionally, LPB, with doses of 10, 30 60 J/cm<sup>2</sup>, also increased complex IV activity one hour after irradiation. In agreement, studies performed in irradiated (LPB HeNe) healthy L6 cells, with dose and 10 J/cm<sup>2</sup>, provoked increased of ATP synthase-linked oxygen consumption and required higher concentration of FCCP for inducing the maximal mitochondrial respiratory capacity. In this context, the present study demonstrates that LPB induces wound healing process and accelerates the inflammatory phase during acute traumatic muscle injury, probably by increasing the energy state of mitochondria.

**Keyword:** Low power laser, dermal lesion, muscle injury, oxidative stress, inflammation and mitochondria.

## LISTA DE ABREVIATURAS

**LBP:** Laser de baixa potência  
**ATP:** Trifosfato de adenosina  
**HeNe:** Hélio Neônio  
**AsGa:** Arseneto de Gálio  
**TBA-RS:** Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico  
**SOD:** Superóxido dismutase  
**GPx:** Glutathione peroxidase  
**CAT:** Catalase  
**IL-6:** Interleucina 6  
**IL-10:** Interleucina 10  
**VEGF:** Fator de crescimento do endotélio vascular  
**BDNF:** Fator neurotrófico derivado do cérebro  
**L6:** Linhagem celular de músculo esquelético de ratos  
**NADH:** Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina  
**COX-2:** Ciclo-oxigenase-2  
**ERO:** Espécies reativas de oxigênio  
**NF- $\kappa$ B:** Fator nuclear kappa B  
**IFN- $\gamma$ :** Interferon gama  
**PDGF:** Fator de crescimento derivado de plaquetas  
**TGF- $\beta$ :** Fator de crescimento de transformação Beta  
**EGF:** Fator de crescimento epidérmico  
**TGF- $\alpha$ :** Fator de crescimento de transformação alfa  
**FADH<sub>2</sub>:** Dinucleotídeo de flavina e adenina.  
**JNK:** Proteína cinase c-Jun  
**FCCP:** Carbonil cianeto 4-(trifluorometoxi) fenilhidrazona  
**ADP:** Difosfato de Adenosina  
**RNA:** Ácido ribonucleico  
**SPSS:** Pacote estatístico para ciências sociais  
**AOPP:** Produtos Proteicos de Oxidação Avançada  
**TNF- $\alpha$ :** Fator de necrose tumoral alfa  
**ZC:** Zona central  
**ZR:** Zona de regeneração



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do comprimento de onda e a profundidade de absorção (Rinaldi e cols., 2008). .....	23
Figura 2. Citocromo c oxidase como principal foto acceptor (Adaptado de Karu, 1999). .....	25
Figura 3. Representação esquemática da especificidade celular imunológica correlacionada temporalmente com as fases da cicatrização (Fonte adaptada: Park e Barbul, 2004). .....	29
Figura 4. Ilustração esquemática da cicatrização no músculo esquelético após 2, 3, 5, 7, 14 e 21 dias de uma lesão muscular. ....	31
Figura 5. Modelo de lesão epitelial (Silveira e cols., 2007) .....	38
Figura 6. Modelo experimental de irradiações nos grupos irradiados + lesão muscular (GL+Laser). .....	40
Figura 7. Equipamento empregado para indução de trauma muscular (Rizzi e cols., 2006). .....	41
Figura 8. Modelo de irradiação pontual ao redor da área lesionada no músculo gastrocnêmio. ....	42
Figura 9. Modelo de irradiação com laser de baixa potência Hélio Neônio (HeNe) de células cultivadas em placa .....	44
Figura 10. Modelo de irradiação com laser de baixa potência Hélio Neônio (HeNe) de suspensões mitocondriais em placa .....	45
Figura 11. Gráfico representativo das curvas que mostram o consumo de oxigênio por um sistema celular em um experimento de respirometria clássica. ....	49
Figura 12. Efeito da irradiação do LBP no processo de cicatrização por mensuração da regressão do tamanho da ferida 5 dias após a ulceração. ....	53
Figura 13. : Efeito da irradiação do LBP no conteúdo de hidroxiprolina 5 dias após a ulceração. ....	54
Figura 14. Efeito da irradiação do LBP no conteúdo de TBA-RS (A) e carbonilação de proteínas (B) 5 dias após a ulceração .....	55
Figura 15. : Efeito da irradiação do LBP sobre a atividade da SOD (A) e CAT (B) 5 dias após a ulceração. ....	56

Figura 16. Efeito induzido pela lesão muscular traumática sobre o conteúdo de TBA-RS .....	58
Figura 17. Efeitos do LBP AsGa na dose de $3 \text{ J/cm}^2$ e com início de irradiação 2 horas após induzir a lesão traumática muscular sobre a concentração de nitritos no plasma (A) e no músculo (B) .....	63
Figura 18. Efeitos do laser de baixa potência AsGa com dose de $3 \text{ J/cm}^2$ com início da irradiação 2 horas após a lesão sobre a expressão genica da IL-6 (A), IL-10 (B), fator crescimento endotélio vascular (C) e fator neurotrófico derivado do cérebro (D) em músculo esquelético traumatizado.....	64
Figura 19. Efeito do laser de baixa potência AsGa com dose de $3 \text{ J/cm}^2$ com início da irradiação 2, 12 e 24 horas e dose de $5 \text{ J/cm}^2$ com início da irradiação 2 horas após a lesão sobre a distância percorrida (A) e no número de levantamentos (B) no campo aberto.....	66
Figura 20. : Efeito do laser de baixa potência Hélio Neônio (HeNe) (10, 30 e $60 \text{ J/cm}^2$ ) sobre as atividades do complexo I da cadeia respiratória (A e C) e complexo IV (B e D) em mitocôndrias 5 minutos e 1 hora após a irradiação .....	67
Figura 21. Efeito do laser de baixa potência Hélio Neônio sobre parâmetros de respiração celular em células musculares L6.....	68



## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 Sequências dos "primers" empregado nas determinações..... 51
- Tabela 2. Efeito do laser de baixa potência AsGa na dose de 3 J/cm<sup>2</sup> com início da irradiação 2, 12, 24 horas após a lesão muscular sobre o conteúdo de TBA-RS, carbonilação de proteínas, atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e catalase (CAT) em homogenato de músculo esquelético. .... 60
- Tabela 3. Efeito do laser de baixa potência AsGa na dose de 5 J/cm<sup>2</sup> com início da irradiação 2, 12, 24 horas após a lesão muscular sobre o conteúdo de TBA-RS, carbonilação de proteínas, atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), glutathione p ..... 62



## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	21
1.1	Laser de Baixa Potência .....	21
1.2	Mecanismos de Ação do LBP .....	24
1.3	Lesões Epiteliais .....	27
1.4	Lesão Muscular .....	30
1.5	Lesão Muscular Aguda.....	32
1.6	Lesão Muscular e Estresse Oxidativo.....	33
2	HIPÓTESE.....	35
2.1	Objetivo Geral .....	35
2.2	Objetivos Específicos .....	35
3	MATERIAIS E MÉTODOS .....	37
3.1	Modelo Experimental de Lesão Epidérmica.....	37
3.2	Modelo Experimental de Lesão Muscular.....	39
3.3	Modelo de Irradiação de Células e Mitocôndrias .....	43
3.4	Análises Bioquímicas .....	45
3.5	Indicador da Formação de Oxido Nítrico (NO):.....	45
3.6	Medida de Peroxidação Lipídica .....	45
3.7	Carbonilação de Proteínas .....	46
3.8	Determinação do Conteúdo de Produtos Proteicos de Oxidação Avançada (AOPP):.....	46
3.9	Determinação de Ditirosina: .....	46
3.10	Atividade da Enzima Superóxido Dismutase (SOD).....	46
3.11	Atividade da Enzima Catalase (CAT) .....	47
3.12	Atividade da Glutathiona Peroxidase (GPX).....	47
3.13	Hidroxi prolina .....	47
3.14	Atividades dos Complexos I e IV.....	47

3.15	Oximetria de Alta Resolução .....	48
3.16	Determinação de Proteínas .....	49
3.17	Determinação da Expressão Gênica de IL-6, IL-10, BDNF e VEGF por Reação em Cadeia da Polimerase via Transcriptase Reversa em Tempo Real (RT-PCR):.....	49
3.18	Campo aberto .....	51
3.19	Tratamento Estatístico:.....	51
4	RESULTADOS .....	53
5	DISCUSSÃO .....	69
6	CONCLUSÕES .....	77
7	PERSPECTIVAS.....	79
8	REFERÊNCIAS .....	81
9	ANEXOS .....	103
9.1	Artigo Científico .....	103
9.2	Efeitos do LBP em células do sistema nervoso central (C6). 110	

## 1 INTRODUÇÃO

O laser de baixa potência (LBP) é utilizado por dentistas e na acupuntura há quarenta anos, por acelerar a cicatrização e reduzir a dor e inflamação. O primeiro estudo sobre o uso do laser em tecido mole foi realizado por Mester e cols (1971). O LBP é uma forma terapêutica relativamente nova na área da fisioterapia, embora de ampla utilização. Este meio terapêutico vem sendo utilizado atualmente em muitos estudos laboratoriais e clínicos nos quais se tem investigado os efeitos na modulação das funções celulares, na redução da dor e inflamação e sua influência no processo de cicatrização (Peplow e cols., 2011).

A terapia com laser vem sendo utilizada cada vez mais pelos fisioterapeutas, dentistas e médicos. Dentre as quais encontra-se a utilização do LBP no tratamento de lesões dérmicas como feridas e úlceras, situações pós-cirúrgicas, contusões musculares, artrite crônica, dermatose, situações de isquemia, dor crônica, entre outras (Lins e cols., 2010).

O uso do LBP em lesões musculares na prática clínica teve seu início mais recente em relação ao uso em lesões dérmicas, mas os resultados vêm mostrando efeitos satisfatórios na aceleração da cicatrização desses tipos de lesões. Entretanto, os mecanismos moleculares e celulares responsáveis pela transdução de sinais induzidos pela emissão de fótons nas células e seu efeito biológico nos tecidos irradiados ainda não estão completamente esclarecidos (Karu e cols., 1998; Tunér e Hode, 2010).

### 1.1 Laser de Baixa Potência

Einstein, em 1917, expôs os princípios físicos da emissão estimulada, sobre os quais está apoiado o fenômeno laser. Em 1960, Theodore H. Maiman construiu o primeiro emissor de laser a rubi. Por volta de 1961, foi realizada a primeira cirurgia a laser, e em 1962 foi desenvolvido o primeiro laser semicondutor. Em 1965, Sinclair e Knoll adaptaram essa radiação à prática terapêutica e nesse mesmo ano o laser foi utilizado pela primeira vez na odontologia por Stern e Sognaes Sognaes (Catão, 2004).

O laser é um dispositivo que funciona baseado num fenômeno: inversão de população, ou seja, absorção de energia para que a maior parte dos átomos se excitem (elétrons “saltem” para camadas mais distantes do núcleo atômico). Após a inversão de população, deve haver

um regresso ao estado fundamental com liberação de fótons gêmeos (luz coerente). Processo similar ocorre em outras fontes primárias de luz, como uma lâmpada elétrica, que, por efeito Joule, tem sua energia transformada em calor. A energia térmica promove a inversão de população, mas quando os elétrons voltam para suas configurações estáveis, os fótons são liberados sem relação de fase (em várias direções com diferentes frequências). A esse processo denominamos emissão espontânea (Mendonça, 1998).

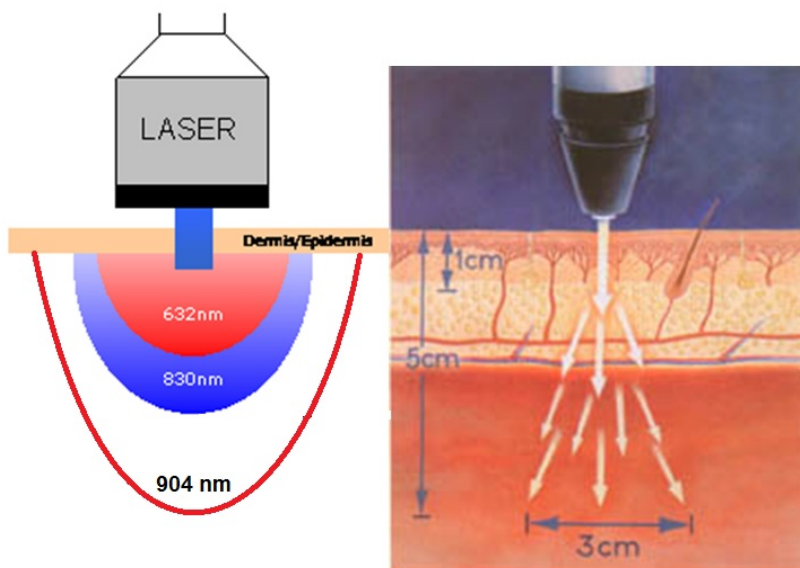
Todo equipamento laser possui três elementos essenciais: (1) o meio laser, que pode ser de dióxido de carbono, de argônio, de hélio-neônio, de YAG, de excímeros, de corantes, de rubi e de diodos semicondutores, como o de arseneto de gálio e alumínio (AsGaAl), entre outros; (2) a fonte de excitação, que pode ser uma lâmpada de flash ou um arco elétrico, que elevará as moléculas ou átomos do meio de irradiação laser do estado de repouso até um estado de excitação, cujo retorno ao estado de repouso gera a emissão espontânea de um fóton; e, por fim, (3) dois espelhos, situados nas extremidades de uma câmara ressonante, que refletem a luz emitida de volta às moléculas ou átomos do meio laser (Cavalcanti e cols., 2011). Dessa maneira, o funcionamento desses três elementos gera uma emissão de luz que, ao incidir sobre outras moléculas ou átomos do meio, acaba por elevar ao estado de excitação novos elétrons que estavam em órbitas menores, os quais, por sua vez, ao retornarem ao estado de repouso, liberam novos fótons, ou seja, novas ondas de luz, que incidirão sobre outros átomos em repouso, formando uma reação em cadeia (Renisch, 1996).

Laser é um acrônimo da língua inglesa: light amplification by stimulated emission of radiation (amplificação de luz por emissão estimulada de radiação), que expressa exatamente como a luz é produzida. É uma radiação eletromagnética com características próprias que a diferem de uma luz comum: possui um único comprimento de onda, com suas ondas propagando-se coerentemente no espaço e no tempo, carregando de forma colimada e direcional altas concentrações de energia (Cavalcanti e cols., 2011).

É um dispositivo constituído por substâncias de origem sólida, líquida ou gasosa que produzem um feixe de luz, frequentemente denominado de “raio laser”. Tal dispositivo pode ser classificado em duas categorias: lasers de alta potência ou cirúrgicos, com efeitos térmicos apresentando propriedades de corte, vaporização e hemostasia, e lasers de baixa potência ou terapêuticos, apresentando propriedades analgésicas, anti-inflamatórias e de bioestimulação (Vladimirov e cols., 2003).

A interação da radiação laser com os tecidos corporais ocorre mediante os fenômenos de reflexão e refração do laser, e a transmissão desse processo depende principalmente dos fenômenos de absorção e dispersão. A absorção e a transmissão da radiação laser dependem de dois fatores fundamentais: o comprimento de onda e a natureza absorvente (Agne e cols., 2004).

Na categoria dos LBP estão incluídos o laser de Hélio-Neônio (HeNe), cujo comprimento de onda é 632,8 nm, ou seja, na faixa de luz visível (luz vermelha) com profundidade de absorção de até 1 cm, o laser de Arseneto de Gáleo (AsGa), cujo comprimento de onda é 904 nm que se situa fora do espectro de luz visível (luz infravermelha) com profundidade de absorção de 5 cm e o Arseneto de Gáleo Alumínio (Ga-As-Al) com comprimento de onda entre 780-830 nm com profundidade de absorção entre 2 e 3 cm (Figura 1).



**Figura 1. Representação esquemática do comprimento de onda e a profundidade de absorção (Rinaldi e cols., 2008).**

A laserterapia de baixa potência é uma denominação genérica que define a aplicação terapêutica de lasers e diodos superluminosos monocromáticos de intensidade relativamente baixa, para tratamento de afecções e lesões, geralmente consideradas demasiadamente baixas para

que não efetuem qualquer aquecimento detectável dos tecidos irradiados (Kitchen e Bazin, 1998; Dall Agnol e cols., 2009; Medeiros e cols., 2010).

LBP, quando usado em tecidos e células não se baseia no aquecimento, isto é, a energia dos fótons absorvidos não é transformada em calor, mas sim em efeitos fotoquímicos, fotofísicos e/ou fotobiológicos (Karu, 1999). Quando a luz do laser interage com as células em uma dose apropriada, certas funções celulares podem ser estimuladas, tais como estimulação de linfócitos, ativação de mastócitos, aumento da produção de ATP mitocondrial e a proliferação de vários tipos de células, promovendo desta forma efeitos anti-inflamatórios (Tafur e Mills, 2008; Nogueira e cols., 2011).

Em nível celular, o LBP induz alterações bioquímicas, bioelétricas e bioenergéticas, levando a um aumento da proliferação celular, metabolismo e maturação, aumentando a quantidade de granulação tecidual e redução de mediadores inflamatórios induzindo a aceleração cicatricial. A absorção molecular da luz do laser permite um aumento no metabolismo celular caracterizado pela estimulação de fotorreceptores ou aceptores de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial, alterações nas concentrações de ATP celular, liberação de fatores de crescimento e síntese de colágeno (Eells e cols., 2004).

## 1.2 Mecanismos de Ação do LBP

Alguns estudos têm sugerido que a mitocôndria é o principal alvo do LBP em tecido epitelial (Eels, 2004; Silveira e cols., 2007; Gupta e cols., 2011). Nos últimos anos, alguns trabalhos citam que a terapia com LBP também auxilia no processo de regeneração muscular (Shefer e cols., 2001; Silveira e cols., 2009; Baptista e cols., 2011; Silva e cols., 2011). A proteína citocromo *c* oxidase (polipeptídeo do complexo IV da cadeia respiratória) é um cromóforo que tem propriedades de absorver a luz irradiada de um determinado comprimento de onda (Karu e cols., 2004; Karu e cols., 2008; Santana-Blank e cols., 2010). Vários estudos têm demonstrado um aumento na atividade enzimática desta proteína após irradiação com LBP, bem como um aumento na síntese de ATP após irradiação de mitocôndrias isoladas (Yu e cols., 1997; Santana-Blank e cols., 2010; Karu, 2010; Chen e cols., 2011) Evidências adicionais do papel da enzima citocromo *c* oxidase como cromóforo na irradiação com LBP têm sido estudadas pelos laboratórios de Karu na



Russia e de Eells e Wong-Riley nos Estados Unidos (Karu, 1999; Karu e cols., 2004; Eells e cols., 2004; Wong-Riley e cols., 2005; Karu, 2010).

## Laser de Baixa Potência

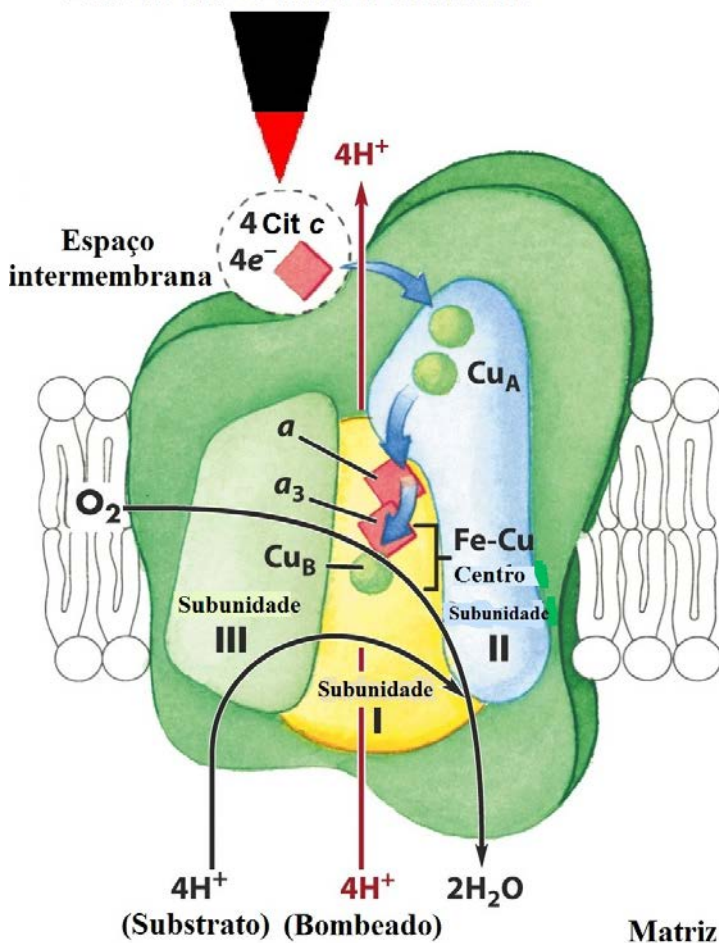


Figura 2. Citocromo c oxidase como principal foto receptor (Adaptado de Karu, 1999).

Os componentes de cobre do complexo IV da cadeia respiratória, CuA e CuB, são considerados como fotoceptores, podendo ser

oxidados ou reduzidos e assim aumentar a taxa de transferência de elétrons da citocromo *c* oxidase (Karu, 1999) (Figura 2). A excitação da molécula fotoceptora parece estimular o metabolismo celular através de cascatas de reações de sinalização celular ou sinalização mitocondrial retrógrada. A sinalização retrógrada seria oposta ao caminho comum levando informações do núcleo e do citoplasma para a mitocôndria. Neste caso, a sinalização retrógrada envia informações de volta ao núcleo sobre mudanças no estado funcional da mitocôndria (Karu, 2008). Uma destas cascatas envolve a dissociação do óxido nítrico do centro catalítico da citocromo *c* oxidase onde age como um inibidor. Quando a atividade da enzima é reduzida pela irradiação com LBP, o óxido nítrico dissocia-se do centro catalítico, e esse evento poderia transitoriamente diminuir essa inibição (Karu, 2010).

Outra via de sinalização ativada pelo laser a partir da mitocôndria está relacionada ao aumento nas concentrações de ATP no tecido irradiado. O aumento da produção de ATP em mitocôndrias isoladas de músculos esqueléticos após irradiação com diferentes comprimentos de onda foi demonstrado por vários pesquisadores (Yu e cols., 1997; Tafur e cols., 2008; Gao e Xing, 2009). O ATP, a moeda energética celular, é essencial para a homeostasia celular, e sabe-se que pequenas mudanças nas concentrações de ATP podem resultar em alterações significativas no metabolismo celular (Baratto e cols., 2010).

A aplicação do laser no tecido lesado também parece modular o processo inflamatório. A redução na densidade das células inflamatórias como neutrófilos e macrófagos nos tecidos epitelial e muscular lesionados foi demonstrada após irradiação com laser de baixa potência em ratos Wistar (Junior, 2009; Piva e cols., 2011; Mesquita-Ferrari e cols., 2011). Recentes estudos também mostram que a expressão do gene que codifica a enzima que participa na síntese de eicosanóides, incluindo as prostaglandinas mediadoras da dor, a ciclooxigenase 2 (COX-2), diminui após a irradiação do músculo esquelético (Albertini e cols., 2008; de Lima e cols., 2011).

Ainda, há evidências demonstrando que a laserterapia reduz a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) que ocorre durante a fase aguda de lesão epitelial e muscular. Isso se deve principalmente por acelerar o processo inflamatório e assim diminuir a exposição celular a ERO. Outra característica é a diminuição da ativação do fator de transcrição fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) e citocinas pró-inflamatórias como interleucina 1 Beta (IL-1 $\beta$ ), interleucina 6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interferon gama (IFN- $\gamma$ ) como também aumento na interleucina 10 (IL-10) que é anti-inflamatória (Pires e cols., 2012;

Basso e cols., 2012). Por outro lado, os efeitos anti-inflamatórios exercidos pelo laser parecem ocorrer através de aceleração de microcirculação resultando em mudanças na pressão hidrostática capilar com reabsorção do edema e eliminação do acúmulo de metabólitos intermediários da inflamação (da Silva e cols., 2010).

### 1.3 Lesões Epiteliais

Os processos ulcerativos cutâneos causam um alto índice de morbidade proporcionando um alto custo ao paciente e seus familiares (Say e cols., 2003). Esse quadro contribui para a diminuição da qualidade de vida desses pacientes, gerando implicações econômicas tanto para o indivíduo, com curativos, cuidados de enfermagem, almofadas e colchões especiais, como para a instituição que o assiste (Serarslan e cols., 2007).

Clark (2005) classificou esse processo em três fases divididas em: fase inflamatória, fase de proliferação ou de granulação e fase de remodelação ou de maturação. Na fase inflamatória após a ocorrência do ferimento, inicia-se o extravasamento sanguíneo que preenche a área lesada com plasma e elementos celulares, principalmente plaquetas. A agregação plaquetária e a coagulação sanguínea geram um tampão, rico em fibrina, que além de restabelecer a hemostasia e formar uma barreira contra a invasão de microrganismos, organiza uma matriz provisória necessária para a migração celular. Essa matriz servirá também, como reservatório de citocinas e fatores de crescimento que serão liberados durante as fases seguintes do processo cicatricial (Werner e cols., 2003; Eming e cols., 2007).

As plaquetas, essenciais à formação desse tampão hemostático, também secretam múltiplos mediadores, incluindo fatores de crescimento liberados na área lesada. As plaquetas também ativadas pela trombina, ainda sofrem a degranulação e liberam vários fatores de crescimento, como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento de transformação  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento de transformação- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) e o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), além de glicoproteínas de adesão como a fibronectina e trombospondina, que são importantes constituintes da matriz extracelular (Dvorak e cols., 2002; Park e cols., 2004).

Desta forma, a resposta inflamatória se inicia com vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, promovendo a quimiotaxia de neutrófilos para a ferida. Neutrófilos são as primeiras células a chegar à

ferida, com maior concentração 24 horas após a lesão. São atraídos por substâncias quimiotáticas liberadas pelas plaquetas. Os neutrófilos aderem à parede do endotélio mediante ligação com as selectinas (receptores de membrana). Neutrófilos produzem radicais livres que auxiliam na limpeza da área lesada e são gradativamente substituídos por macrófagos (Silva e cols., 2010).

Os macrófagos migram para a ferida de 48 a 96 horas após a lesão, antes dos fibroblastos migrarem e iniciarem a replicação. Esta migração celular tem papel fundamental no término do desbridamento iniciado pelos neutrófilos e sua maior contribuição é a secreção de citocinas e fatores de crescimento, além de contribuir para angiogênese, fibroplasia e síntese de matriz extracelular, fundamentais para a transição para a fase proliferativa (Broughton e cols., 2006) É durante a fase inflamatória que ocorre a maior produção de ERO pela bomba respiratória estimulada pela migração de neutrófilos e macrófagos. Fibroblastos também secretam ERO quando são estimulados por citocinas pró-inflamatórias e TNF- $\alpha$  e fatores de crescimento como EGF e PDGF (Kanta e cols., 2011).

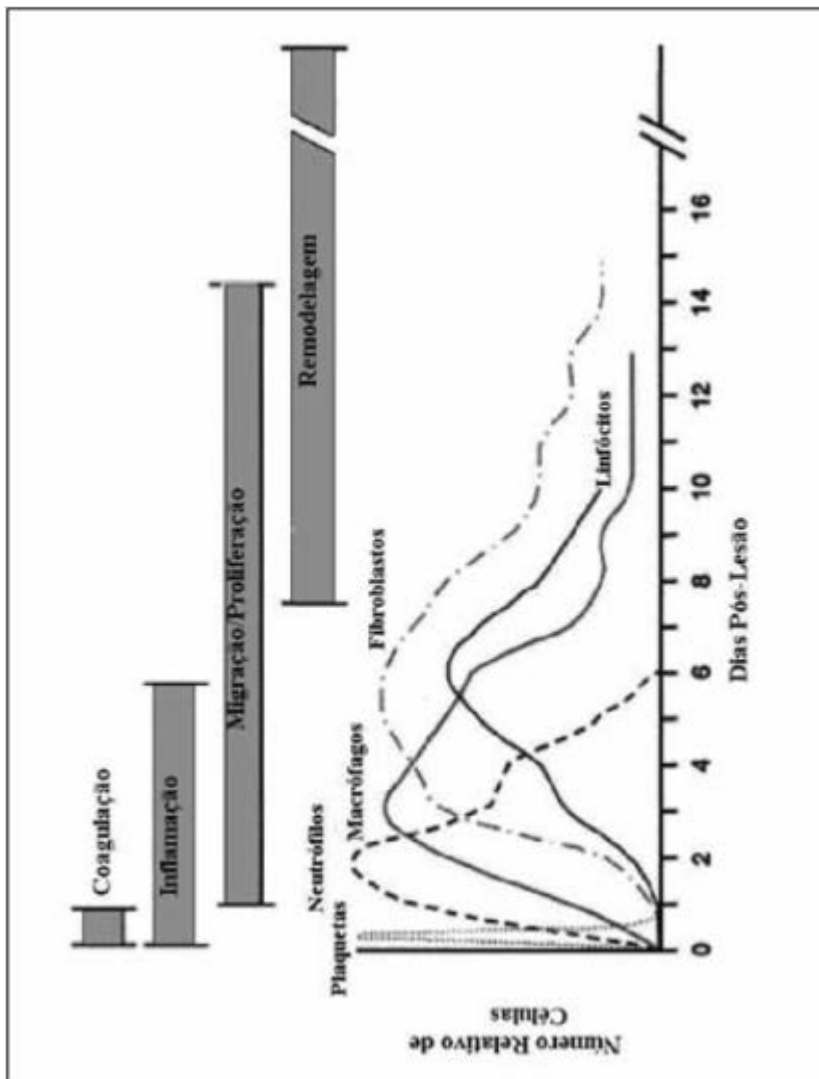


Figura 3. Representação esquemática da especificidade celular imunológica correlacionada temporalmente com as fases da cicatrização (Fonte adaptada: Park e Barbul, 2004).

A fase proliferativa é constituída por quatro etapas fundamentais: epitelização, angiogênese, formação de tecido de granulação e deposição de colágeno. A fase proliferativa tem início ao redor do 4º dia após a lesão e se estende aproximadamente até o término da segunda semana. A epitelização ocorre precocemente, caso a membrana basal esteja intacta, as células epiteliais migram em direção superior, e as camadas da epiderme são restauradas em três dias. Se a membrana basal for lesada, as células epiteliais das bordas da ferida começam a proliferar na tentativa de restabelecer a barreira protetora (Lawrence e cols., 1994).

A angiogênese é estimulada pelo TNF- $\alpha$  e é caracterizada pela migração de células endoteliais e formação de capilares, essenciais para a cicatrização adequada. A parte final da fase proliferativa é a formação de tecido de granulação. Os fibroblastos dos tecidos vizinhos migram para a ferida, porém precisam ser ativados para sair de seu estado de quiescência (Li e cols., 2005). O fator de crescimento mais importante na proliferação e ativação dos fibroblastos é o PDGF12. Em seguida é liberado o TGF- $\beta$ , que estimula os fibroblastos a produzirem colágeno do tipo I e a transformar-se em miofibroblastos, que promovem a contração da ferida (Longaker e cols., 2001).

Na fase de maturação ou remodelamento, a característica mais importante é a deposição de colágeno de maneira organizada, por isso é a mais importante clinicamente. O colágeno produzido inicialmente tem espessura menor do que o colágeno presente na pele normal, e tem orientação paralela à pele. Com o tempo este colágeno do tipo III é reabsorvido e um colágeno mais espesso é produzido e organizado ao longo das linhas de tensão. Estas mudanças se refletem em aumento da força tênsil da ferida. A reorganização da nova matriz é um processo importante da cicatrização (Martin e cols., 1997).

Fibroblastos e leucócitos secretam colagenases que promovem a lise da matriz antiga. A cicatrização tem sucesso quando há equilíbrio entre a síntese da nova matriz e a lise da matriz antiga. Após um ano da lesão a força tênsil jamais retornará a 100%, atingindo em torno de 80% após três meses (Lorena e cols., 2002). A Figura 3 mostra a especificidade celular de cada fase de cicatrização.

## **1.4 Lesão Muscular**

Lesões musculares resultam de uma variedade de mecanismos, incluindo causas diretas e indiretas. Causas diretas incluem processos traumáticos como lacerações, contusões e tensões (Hughes e cols., 1995;

Kasemkijwattana e cols., 1998 e 2000; Fukushima e cols., 2001). Causas indiretas são todas aquelas que resultam de alguma condição médica como isquemia ou disfunção neurológica (Day e cols., 2002; Paoni e cols., 2002).

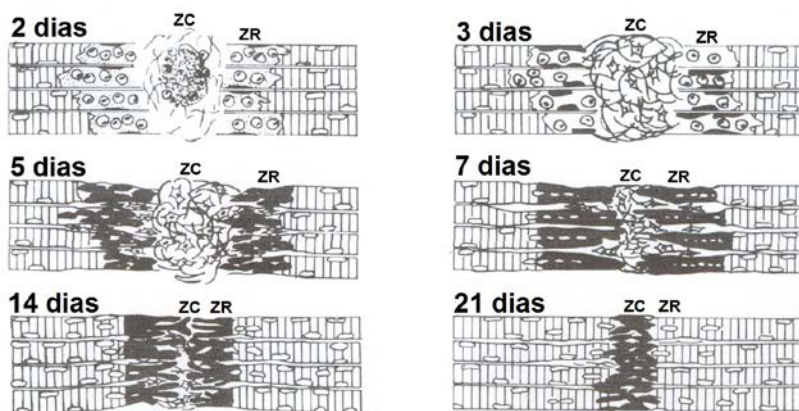
Conforme Jarvinen e cols (2005), a cicatrização do músculo esquelético danificado segue um padrão constante independente da causa, sendo as principais: contusão, tensão e laceração. Três fases têm sido identificadas neste processo (Figura 4)

1 - Fase de lesão, caracterizada por uma ruptura do tecido resultando em necrose das miofibrilas, formação de hematoma entre a ruptura provocada no músculo, e reação celular inflamatória.

2 - Fase de reparo consiste em fagocitose do tecido necrosado, regeneração das miofibrilas e produção concomitante de tecido conjuntivo cicatrizado, como também crescimento capilar dentro da área lesionada.

3 - Fase de remodelamento período durante o qual acontece a maturação das miofibras regeneradas, contração e reorganização do tecido cicatrizado e recuperação da capacidade funcional do músculo.

As últimas duas fases, de reparo e remodelação, ocorrem usualmente associadas ou sobrepostas.



**Figura 4. Ilustração esquemática da cicatrização no músculo esquelético após 2, 3, 5, 7, 14 e 21 dias de uma lesão muscular.**

**Resumidamente, no segundo dia (2 dias) após a lesão muscular, as partes necrosadas na transecção das miofibrilas são removidas por macrófagos. De forma concomitante, inicia na zona central (ZC) a formação de tecido**

conjuntivo, processo realizado por fibroblastos. No terceiro dia (3 dias), as células satélites se tornam ativas dentro dos cilindros da lâmina basal na zona de regeneração (ZR). No quinto dia (5 dias), os mioblastos são fundidos em miotubos na ZR, e o tecido conjuntivo na ZC se torna denso. No sétimo dia (7 dias), a regeneração das células musculares é estendida para fora do cilindro da lâmina basal e para dentro da ZC e inicia a penetração através da cicatrização. No dia 14 (14 dias), a cicatrização da ZC foi condensada, reduzindo o tamanho e a regeneração das miofibras fecha a abertura da ZC. Por fim, no dia 21 (21 dias) os entrelaçados de miofibrilas são fundidos com pouca intervenção de tecido conjuntivo (Adaptado de Jarvinen, 2005).

## 1.5 Lesão Muscular Aguda

O trauma muscular provoca a ruptura da integridade do sarcômero, sarcolema e lâmina basal. Esta lesão provoca uma massiva entrada de cálcio extracelular nas células musculares e ativa uma série de cascatas bioquímicas, incluindo a ativação de proteases que digerem as miofibras rompidas e necróticas (Mbebi e cols., 1999; Huard e cols., 2003). Considerando que o músculo esquelético é um tecido altamente vascularizado, o trauma muscular provocará também lesão capilar, resultando em um hematoma no local lesado. Uma alta expressão de moléculas e citocinas inflamatórias influenciam um aumento na permeabilidade vascular local e modulam o fluxo sanguíneo a fim de acelerar uma resposta inflamatória com consequente formação de edema (Beaton e cols., 2002).

Entre os primeiros dias após a lesão muscular, pequenos vasos sanguíneos, neutrófilos, macrófagos ativados e linfócitos T infiltram o hematoma entre as miofibras rompidas (Frenette e cols., 2000; MacIntyre e cols., 2000). Inicialmente, os neutrófilos invadem o músculo em aproximadamente uma hora após a lesão, e esta infiltração de células mononucleares pode permanecer elevada por até cinco dias. Observações morfológicas indicam que esta migração de neutrófilos pode resultar em fagocitose ou em liberação de proteases, e estes mecanismos ajudariam a degradar células mortas produzidas durante o trauma muscular. De forma conjunta, a ativação de neutrófilos pode estar acompanhada de aumento nas concentrações de moléculas citolíticas e citotóxicas que podem danificar o músculo ou ainda outras áreas saudáveis (Tidball, 2005).

O músculo lesionado também é infiltrado por outra população de células mononucleares, neste caso por macrófagos, que degradarão as



fibras musculares danificadas. Esses macrófagos alcançam a máxima taxa de infiltração no segundo dia após a lesão, momento no qual também acontece lesão no sarcolema de numerosas células (Wiendl e cols., 2005; Lu e cols., 2011). Posteriormente, uma população celular sem características fagocíticas invade o músculo e alcança o pico de concentração em quatro dias após a lesão. Porém, a taxa de infiltração permanece elevada por vários dias. Essa população se encontra distribuída nas regiões mais próximas às fibras regeneradas, sugerindo a sua participação na regeneração muscular (Tidball e Wehling-Henricks, 2007).

## **1.6 Lesão Muscular e Estresse Oxidativo**

A fosforilação oxidativa em células integras é um processo que requer a ação de cinco complexos enzimáticos organizados na cadeia de transporte de elétrons. Os elétrons oriundos do dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADH) e do dinucleotídeo de flavina e adenina (FADH<sub>2</sub>), provenientes do ciclo de Krebs e de outras reações catalisadas por desidrogenases, são transferidos à cadeia de transporte de elétrons e têm o oxigênio molecular como aceptor final. Este processo é acoplado à translocação de prótons através da membrana mitocondrial interna e à síntese endergônica de ATP, através de quatro complexos enzimáticos empregando como força motriz a energia armazenada como gradiente eletroquímico de prótons (Di Donato, 2000). A lesão muscular aguda também induz algumas alterações na função mitocondrial e prejudicando a utilização de oxigênio pelas fibras musculares. Isto gera uma redução na geração de ATP, podendo comprometer a atividade metabólica celular e induzir a uma disfunção bioquímica do músculo (Supinski e Callahan, 2007).

Estudos conduzidos nos últimos quinze anos demonstram que as ERO como o ânion superóxido, radical hidroxila e peróxido de hidrogênio têm uma participação significativa na resposta inflamatória aguda, devido ao tecido muscular lesado possuir inúmeros locais de geração dessas ERO (Bar-Shai e cols., 2008). Após a lesão muscular inicial, ocorre indução de estresse oxidativo, fenômeno este que pode ser definido como um desequilíbrio entre a geração de ERO e os mecanismos de defesa e reparo contra esses compostos oxidantes (Halliwell, 1996).

As fontes primárias de ERO incluem a mitocôndria, o aumento da atividade das enzimas NADPH oxidase, xantina oxidase e ainda o metabolismo de prostanóides (Powers e cols., 2011). As ERO são

agentes oxidantes com alta reatividade, com capacidade de induzir modificações em biomoléculas que resultarão em peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e DNA. A lesão celular ativa as vias da ciclo-oxigenases e lipo-oxigenases que interagem com íons de metais de transição, o qual aumentando a oxidação de proteínas e lipídeos no tecido lesionado (Syed, 2011).

No local da lesão existe também um aumento na concentração de citocinas pró-inflamatórias, as quais são responsáveis por aumentar a expressão de moléculas de adesão requeridas para a infiltração tecidual de neutrófilos e macrófagos (Tidball e Villalta, 2010). Entre as citocinas que se tem extensivamente estudado e que são marcadoras de processos inflamatórios são TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6. Similarmente a outras citocinas pró-inflamatórias, TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  ativam o NF- $\kappa$ B e a proteína cinase c-Jun (JNK). Em ambos os casos, a produção de citocinas pró-inflamatórias é magnificada com o objetivo de aumentar a resposta inflamatória e conseqüentemente, agravar a degeneração ou adiar a regeneração muscular (Gupta e cols., 2002).

## **2 HIPÓTESE**

O Laser de Baixa Potência exerce efeitos bioestimulatórios na respiração mitocondrial com conseqüente diminuição do estresse oxidativo e resolução do processo inflamatório agudo de lesões dérmicas e musculares, facilitando a recuperação tecidual.

### **2.1 Objetivo Geral**

Investigar as vias bioquímicas envolvidas no efeito terapêutico do laser de baixa potência no processo inflamatório de lesões epidérmicas e musculares em roedores.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- a) Quantificar parâmetros de fibrinogênese e fibrose e estresse oxidativo em animais com lesões epidérmicas que receberam irradiação com LBP HeNe e AsGa;
- b) Mensurar parâmetros de respiração celular e metabolismo energético em células musculares saudáveis da linhagem L6 e em mitocôndrias isoladas de músculo esquelético;
- c) Mensurar parâmetros de inflamação, incluindo citocinas pró e anti-inflamatórias, expressão de genes relacionados a proliferação e diferenciação celular incluindo VEGF e BDNF e parâmetros de estresse oxidativo em animais com lesão traumática muscular que receberam irradiação com LBP AsGa.
- d) Avaliar parâmetros comportamentais de déficit motor em animais com lesão traumática muscular que receberam irradiação com LBP AsGa.



### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Modelo Experimental de Lesão Epidérmica

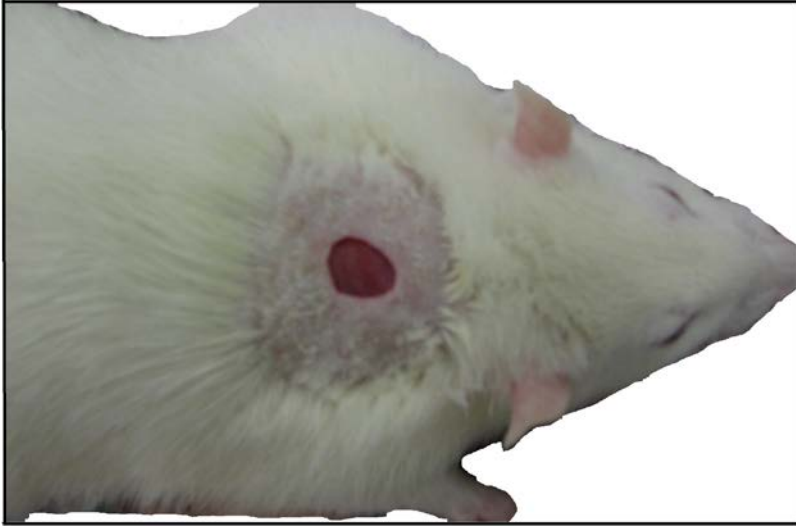
##### Animais

Ratos Wistar machos (250-300 g) obtidos do biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense, Santa Catarina, Brasil, foram acondicionados em gaiolas coletivas em grupos de cinco (42x32x17cm) e dieta com água e ração comercial “ad libitum” e mantidos em um ciclo de 12 horas de claro/12 horas de escuro. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as orientações do COBEA e em conformidade com a lei 1153/2008. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade conforme parecer 630/09.

O modelo de lesão epitelial foi induzido como descrito por Carvalho e cols. (2006). Os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de cloridrato de cetamina (80 mg/kg) e cloridrato de xilazina (20 mg/kg). A região dorsal de cada animal foi tricotomizada, limpada e desinfetada com álcool 70%. A região medial-dorsal, entre a linha infrascapular e a cauda, foi removida com uma incisão cirúrgica de forma circular com diâmetro de aproximadamente 1 cm. As feridas foram uniformes em diâmetro, profundidade e localização (Figura 5).

#### **Os animais foram divididos randomicamente em 5 grupos (n=6):**

1. Grupo Lesão (GL): animal com lesão epitelial sem tratamento local ou sistêmico
2. GL + HeNe 1 J/cm<sup>2</sup>: 2 segundos de irradiação por ponto
3. GL + HeNe 3 J/cm<sup>2</sup>: 6 segundos de irradiação por ponto
4. GL + AsGa 1 J/cm<sup>2</sup>: 3 segundos de irradiação por ponto
5. GL + AsGa 3 J/cm<sup>2</sup>: 9 segundos de irradiação por ponto



**Figura 5. Modelo de lesão epitelial (Silveira e cols., 2007)**

### **Protocolo de Irradiação**

Os LBP utilizados neste estudo foram o AsGa com emissão pulsada (comprimento de onda 904 nm; potência de pico 70W; frequência 9.500 Hz; tempo de pulso 60 ns; tamanho do feixe de 0,10 cm<sup>2</sup>; densidade de força 0,4/cm<sup>2</sup>) e o laser HeNe com emissão contínua (comprimento de onda 632 nm; potência de pico 30 mW; tamanho do feixe de 0,10 cm<sup>2</sup>), sendo os dois lasers da empresa Laserpulse-Ibramed (São Paulo, Brasil). A irradiação foi realizada em cinco regiões distintas ao redor da ferida, com a caneta do laser perpendicular à pele numa distância de 1 cm por ponto, como previamente descrito por Morrone e cols (1998). Os animais foram irradiados 2,12, 24, 48, 72, 96 e 120 horas após a lesão. A eficácia do protocolo de irradiação foi avaliada após um período de cicatrização de 5 dias.

### **Protocolo de Eutanásia**

Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de cloridrato de cetamina (80 mg/kg) e cloridrato de xilazina (20mg/kg) e duas horas após a última aplicação do laser os animais foram submetidos a eutanásia por decapitação com guilhotina. A borda externa da ferida foi cirurgicamente removida e imediatamente processada e armazenada em freezer -70 °C para posterior análise.

### 3.2 Modelo Experimental de Lesão Muscular

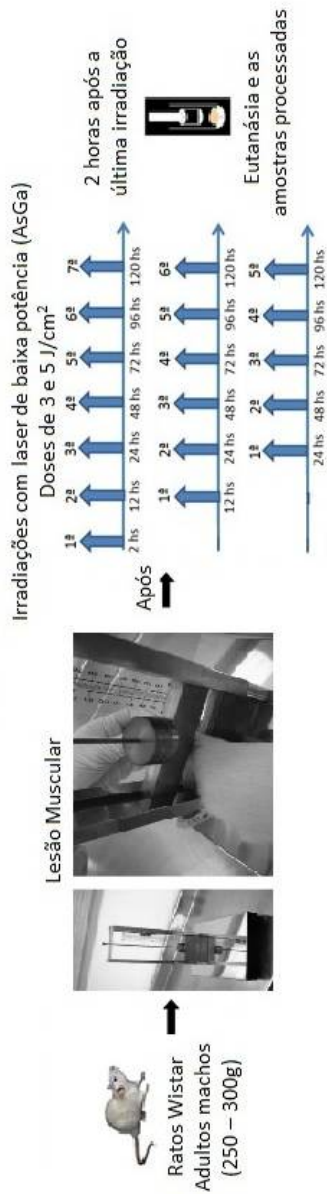
#### Animais

Ratos Wistar machos (250-300 g) obtidos do biotério da Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, Brasil, foram acondicionados em gaiolas coletivas em grupos de cinco (42x32x17cm) e dieta com água e ração comercial “ad libitum” e mantidos em um ciclo de 12 horas de claro/12 horas de escuro. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as orientações do COBEA e em conformidade com a lei 1153/2008. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade de Santa Catarina, Brasil, conforme parecer 351.

#### Os animais foram divididos randomicamente em 4 grupos (n=6):

- I. Grupo Controle (GC): músculo sem lesão muscular;
- II. Grupo Lesão Muscular (GL): músculo com lesão muscular;
- III. Grupo Controle + Laser (GC + Laser): músculo irradiado com laser AsGa, nas doses 3 e 5 J/cm<sup>2</sup>;
- IV. Grupo Lesão + Laser (GL + Laser): músculo com lesão muscular irradiado com laser AsGa, nas doses 3 e 5 J/cm<sup>2</sup>.

Para o desenvolvimento dos objetivos específicos propostos foram usadas as doses de 3 e 5 J/cm<sup>2</sup> de laser AsGa de baixa potência que foi aplicado durante 5 dias após a indução de lesão muscular com início 2, 12 e 24 horas (Figura 6).



**Figura 6. Modelo experimental de irradiações nos grupos irradiados + lesão muscular (GL+Laser).**



### Modelo de Lesão Muscular

O modelo de trauma muscular foi desenvolvido de acordo com Rizzi e cols (2006). Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (20 mg/kg). Posteriormente, a lesão no gastrocnêmio foi realizada por um único impacto por trauma direto em prensa desenvolvida pelo Centro Industrial de Equipamentos de Ensino e Pesquisa (CIDEP/RS, Brasil). A lesão foi produzida por deslocamento de uma massa metálica (0,459 Kg) que através de uma guia com 18 cm de altura. O impacto produz uma energia cinética de 0,811 J, conforme especificações do equipamento (Figura 7). Os animais controles foram anestesiados para assegurar a padronização, porém expostos ao equipamento sem receber trauma muscular.

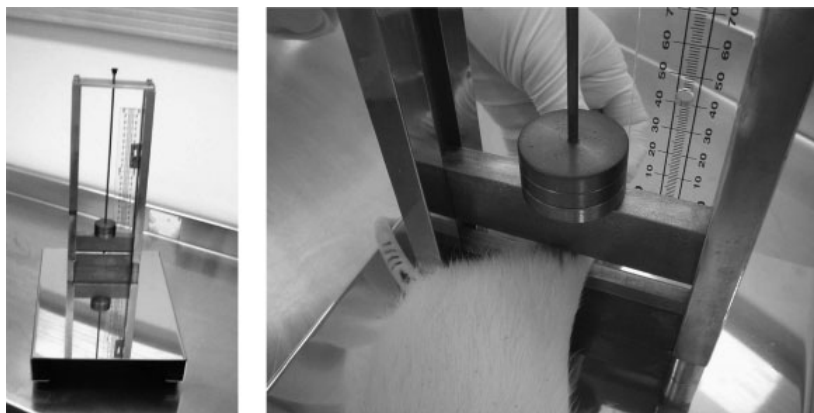


Figura 7. Equipamento empregado para indução de trauma muscular (Rizzi e cols., 2006).

### Protocolo de Irradiação

O LBP utilizado no estudo foi o AsGa com emissão pulsada (comprimento de onda 904 nm; potência de pico 70 W, frequência 9.500 Hz; tempo de pulso 60 ns; tamanho do ponto de irradiação  $0,1 \text{ cm}^2$ , densidade de força  $0,4 \text{ W/cm}^2$ ) da empresa Laserpulse-Ibramed (Brasil). A irradiação com o laser foi realizada em cinco regiões distintas ao redor da área danificada, com a caneta do laser sendo mantida perpendicularmente em relação à pele. A distância dos pontos foi de  $1 \text{ cm}^2$ , como descrito previamente por Marrone e cols (Figura 8) (1998).



**Figura 8. Modelo de irradiação pontual ao redor da área lesionada no músculo gastrocnêmio.**

### **Protocolo para Indução da Eutanásia**

Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (20mg/kg) e duas horas após a última sessão de irradiação os animais foram submetidos a eutanásia por decapitação com guilhotina. A região da lesão no músculo gastrocnêmio (região lesionada) foi cirurgicamente removida. As amostras foram imediatamente processadas, aliqüotadas e armazenadas em  $-70^{\circ}\text{C}$  para posterior análise.

### **Preparação das Amostras de Pele e Músculo**

As amostras foram homogeneizadas em tampão fosfato de sódio com KCl 140mM, através de homogeneizador mecânico numa proporção 1:10. O homogeneizado foi centrifugado  $1.000 \times g$  a  $4^{\circ}\text{C}$ , e o sobrenadante foi separado e mantido em  $-80^{\circ}\text{C}$  para posteriores ensaios. O período máximo entre a preparação do homogeneizado e análises bioquímicas foi sempre menor que sete dias.

### **3.3 Modelo de Irradiação de Células e Mitocôndrias Musculares**

#### **Manutenção e tratamento da linhagem celular**

A linhagem de células musculares (L6) foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (Associação Técnico Científica Paul Ehrlich, Inmetro, Brazil). As células foram semeadas em frascos e cultivadas em meio Eagle's com modificação de Dubelcco (DMEM) contendo 2,5 mg/mL de Fungizone® e 100 U/L de gentamicina, suplementadas com 10 % (V/V) de soro fetal bovino (SFB) para crescimento e depois a diferenciação foi realizada com meio DMEM 2%, durante 5-7 dias. Foram mantidas a 37° C com um mínimo de 95 % de umidade relativa e em uma atmosfera de ar com 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, as células foram tratadas com 0,05% de tripsina / ácido etileno-diaminotetracético (EDTA) e semeadas em placas de 6 poços (10 x 10<sup>7</sup> células/poço). Após confluência, o meio foi trocado por DMEM livre de SFB e as células foram irradiadas (Funchal e cols., 2006).

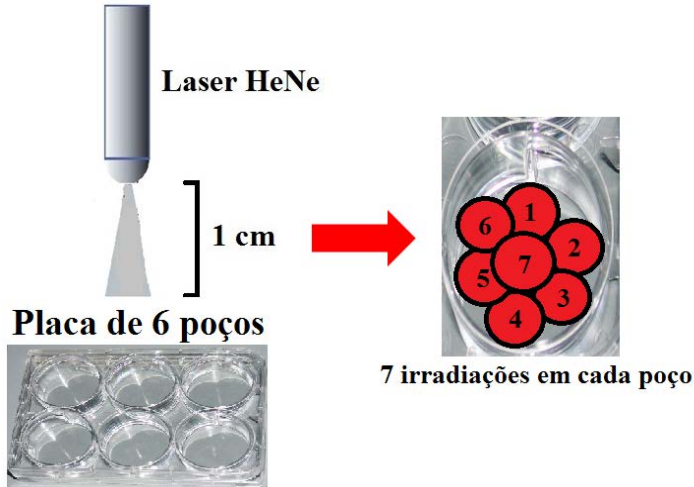
#### **Preparação mitocondrial**

O músculo foi homogeneizado em 20 volumes de tampão fosfato de potássio 5 mM, pH 7,4, contendo sacarose 300 mM, MOPS 5 mM, EGTA 1 mM e albumina sérica bovina 0,1%. Posteriormente, o homogeneizado foi centrifugado a 1.000 x g durante 10 minutos a 4°C, e o sobrenadante foi novamente centrifugado a 15.000 x g durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi suspenso no mesmo tampão usado no processo de homogeneização numa concentração proteica de aproximadamente 20 mg/mL. Esta preparação mitocondrial foi empregada para o tratamento com LBP e para a determinação das atividades dos complexos da cadeia respiratória (Latini e cols., 2005).

#### **Tratamento de células com LBP**

O laser HeNe com comprimento de onda de 632nm com emissão contínua (comprimento de onda 632 nm; potencia de pico 30 mW; tamanho do feixe de 0,10 cm<sup>2</sup>) foi aplicado em células L6 (10 x 10<sup>7</sup> células/poço, placa de 6 poços) após 24 horas da retirada do soro do meio DMEM, com as seguintes doses: 5 e 10 J/cm<sup>2</sup>. Os tempos de irradiações foram de 10 e 20 segundos, respectivamente, e cada poço recebeu 7 irradiações conforme a Figura 9. As células empregadas como controles não foram irradiadas. Para minimizar o contato com a luz, a coluna de poços dos grupos irradiados estava distante dos controles.

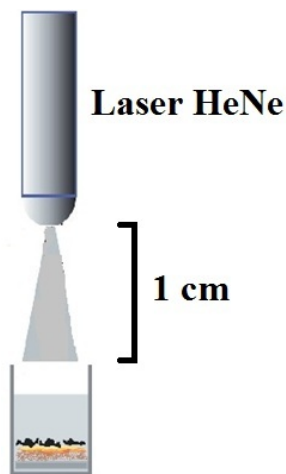
Após a irradiação, as células foram mantidas em DMEM livre de soro por 24 horas. Posteriormente, as células foram levantadas e acondicionadas de acordo com as mensurações realizadas.



**Figura 9. Modelo de irradiação com laser de baixa potência Hélio Neônio (HeNe) de células cultivadas em placa**

### **Tratamento de mitocôndrias com LBP**

Foram adicionados 195  $\mu\text{L}$  de suspensão mitocôndrial com concentração proteica de 20  $\text{mg/mL}$  e 5  $\mu\text{L}$  de substrato (Piruvato: 10  $\text{mM}$  e Malato: 5 $\text{mM}$ ) em uma placa de cultura celular de 96 poços durante cinco minutos a 37°C. Depois a placa foi colocada em capela higienizada com fluxo laminar e foram irradiadas com laser HeNe com comprimento de onda de 632nm com emissão contínua (comprimento de onda 632 nm; potência de pico 30 mW; tamanho do feixe de 0,10  $\text{cm}^2$ ) com as seguintes doses: 10, 30 e 60  $\text{J/cm}^2$ . Os tempos de irradiações foram de 20, 60 e 120 segundos, respectivamente, e cada amostra recebeu uma única irradiação (Figura 10). As mitocôndrias consideradas como controles não foram irradiadas. Para minimizar o contato com a luz, a coluna de poços dos grupos irradiados estava distante dos controles. Imediatamente após o tratamento as mitocôndrias foram congeladas e 24 horas após foi realizado os ensaios bioquímicos.



**Figura 10. Modelo de irradiação com laser de baixa potência Hélio Neônio (HeNe) de suspensões mitocondriais em placa.**

### **3.4 Análises Bioquímicas**

### **3.5 Indicador da Formação de Oxido Nítrico (NO):**

A produção de NO foi avaliada espectrofotometricamente através do metabolito estável nitrito. Para mensurar o conteúdo de nitrito, as amostras foram incubadas com reagente Griess (1 % sulfanilamida e 0,1 % de N-1 (naphthyl) ethylenodiamina) em temperatura ambiente por 10 minutos e a absorbância foi medida a 540 nm. O conteúdo de nitritos foi calculado com base numa curva padrão de 0 a 100 nM realizada com o metabolito nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ). Os resultados foram calculados em  $\mu\text{mol}$  Nitrito/mg proteína (Chaea e cols., 2004).

### **3.6 Medida de Peroxidação Lipídica**

A oxidação de lipídeos foi determinada pela formação de substâncias reativas ao aquecimento do ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), as que foram medidas espectrofotometricamente a 532 nm, conforme

descrito por Draper e Hadley (1990). Os resultados foram calculados como nmol TBARS/mg de proteínas.

### **3.7 Carbonilação de Proteínas**

A oxidação de proteínas foi determinada mediante a quantificação de proteínas carboniladas através da reação de grupos carbonilas com a dinitrofenilhidrazina. Essa reação gera a formação de hidrazonas correspondentes. O conteúdo de carbonilas foi determinado espectrofotometricamente a 370nm como previamente descrito por Levine e cols (1990). Os resultados foram calculados como nmol/mg de proteína empregando o coeficiente de extinção molar de dinitrofenilhidrazonas de  $22.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

### **3.8 Determinação do Conteúdo de Produtos Proteicos de Oxidação Avançada (AOPP):**

O método para avaliar o conteúdo de AOPPs foi realizado de acordo com Witko-Sarsat e cols (1996). Foram utilizados 200 $\mu\text{L}$  de plasma e diluído em 1:5 de PBS, 10  $\mu\text{L}$  de 1,16 M KI foi adicionado em cada tubo. Logo após 20  $\mu\text{L}$  de ácido acético foram adicionados por 2 minutos. A absorbância da reação foi imediatamente lida em 340 nm contra o branco contendo 2000 $\mu\text{L}$  de PBS, 200 $\mu\text{L}$  de ácido acético e 100 $\mu\text{L}$  de KI. O conteúdo de AOPP foi calculado com base numa curva padrão de 0 a 100  $\mu\text{M}$  realizadas com equivalentes de cloramina T. Os resultados são expressos em nmol de equivalentes de cloramina T/mg proteína.

### **3.9 Determinação de Ditiosina:**

O conteúdo de ditiosina, outra medida de oxidação proteica, foi determinada fluorometricamente. Para determinar a fluorescência da ditiosina, 50  $\mu\text{l}$  de plasma foram adicionado em 950  $\mu\text{l}$  de tampão fosfato de sódio de 20 mmol/L com 6 mol/L uréia em pH 7,4. Após 30 minutos, a concentração foi mensurada usando um fluorômetro com comprimento de onda de excitação e emissão de 315 nm e 410 nm, respectivamente. Os resultados foram expressos como unidades de fluorescência/mg proteína (Kirschbaum, 2002).

### **3.10 Atividade da Enzima Superóxido Dismutase (SOD)**

A atividade da SOD foi determinada segundo Bannister e Calabrese (1987). A atividade enzimática foi estimada espectrofotometricamente (480nm) pela inibição da auto-oxidação da adrenalina. Os resultados foram calculados como unidades (U) / mg de proteínas. Cada U corresponde a 50% de inibição da oxidação da adrenalina.

### **3.11 Atividade da Enzima Catalase (CAT)**

A atividade da CAT foi determinada pela taxa de decaimento do peróxido de hidrogênio lido em espectrofotômetro a 240 nm, segundo Aebi (1984).

### **3.12 Atividade da Glutathiona Peroxidase (GPX)**

A determinação da atividade da GPx foi realizada a partir da taxa de decaimento do NADPH. A determinação foi realizada em espectrofotômetro a 340 nm, conforme Flohé e Günzler (1984). Os resultados foram calculados como U/ mg de proteína, sendo que 1U corresponde a 1µmol de peróxido transformado em água por minuto.

### **3.13 Hidroxiprolina**

O conteúdo de hidroxiprolina no tecido muscular foi usado como índice quantitativo de fibrogênese e fibrose. Foi determinado espectrofotometricamente como previamente descrito por Woessner (1961). Os resultados foram expressos em mg/g tecido. O conteúdo de hidroxiprolina foi calculado com base numa curva padrão de 0 a 100 nM realizada com prolina.

### **3.14 Atividades dos Complexos I e IV**

As atividades dos complexos I e IV foram analisadas espectrofotometricamente como descritos por Cassina e Radi (1996) e Rustin e cols (1994), respectivamente, com algumas modificações (Latini e cols., 2005). O complexo I foi mensurado pela redução do ferricianeto de potássio 10 mM a 420 nm, utilizando-se rotenona 4 mM para inibir a passagem dos elétrons para a coenzima Q e NADH 14 mmol como doador de elétrons. A mensuração da atividade do complexo IV envolveu a utilização de citocromo *c* 30 nmol/L reduzido,

e a leitura foi realizada pela queda da absorbância deste em 540 nm. Resultados foram expressos em nmol/min/mg proteína.

### 3.15 Oximetria de Alta Resolução

As células musculares (500.000/mL) foram suspensas em DMEN livre de soro fetal bovino a 37°C no respirômetro de alta sensibilidade da marca Oroboros (Suécia). Os seguintes parâmetros foram analisados (esquematisados na Figura 11).

1- Respiração basal: Consumo de oxigênio em condições basais sem acréscimo de inibidores, substratos ou desacopladores. As células permaneceram nestas condições por quinze minutos.

2- Estado IV de respiração mitocondrial: Este estado respiratório está representado pelo consumo de oxigênio ocasionado pela transferência de elétrons através da cadeia respiratória. Neste estado não há síntese de ATP e experimentalmente é estudado analisando o consumo de oxigênio (aproximadamente durante 4 minutos) após adicionar oligomicina no meio. A oligomicina é um inibidor da subunidade Fo da ATP sintase ou complexo V da cadeia respiratória. O efeito induzido por esta inibição é caracterizado por uma marcada redução no consumo de oxigênio (Nelson e Cox, 2004).

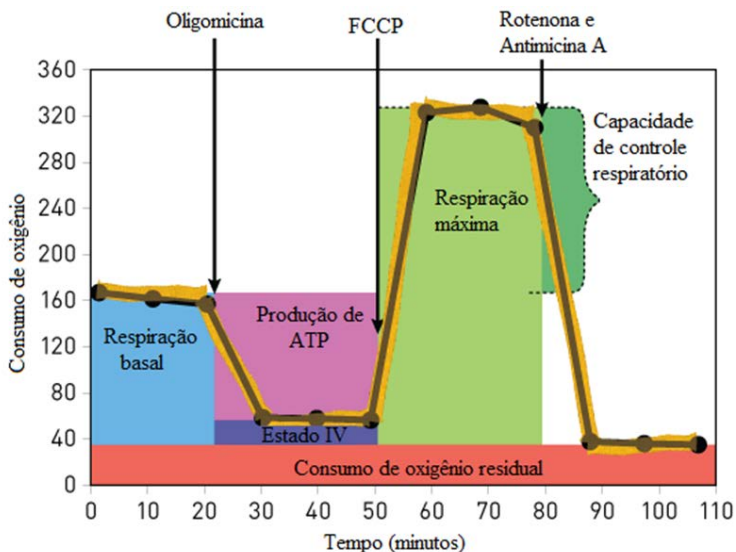
3- Respiração máxima (Estimulado por FCCP): Este parâmetro representa o consumo de oxigênio observado após titular o sistema experimental com o desacoplador mitocondrial FCCP (carbonilcianeto-4-trifluorometoxi fenil-hidroxona). Ionóforos como o FCCP permitem que íons inorgânicos passem facilmente através das membranas. Eles desacoplam a transferência de elétrons da fosforilação oxidativa por dissipar os prótons que formam o gradiente eletroquímico através da membrana mitocondrial (Nelson e Cox, 2004). Este parâmetro indica a capacidade máxima mitocondrial em transferir elétrons (Gnaiger, 2001).

4- Capacidade de controle respiratório (respiração máxima / estado IV): Índice utilizado para determinar a contribuição dos diferentes estados respiratórios, calculado utilizando a respiração máxima e o estado IV da respiração (Sjovall e cols., 2010).

5- Consumo de oxigênio residual: Indica o consumo de oxigênio não proveniente da respiração mitocondrial, representado pela redução incompleta do oxigênio em espécies reativas. A produção de espécies reativas de oxigênio é observada após adicionar rotenona, que inibe a transferência de elétrons do complexo I para a ubiquinona e antimicina A, inibidor do complexo III. Desta forma, com a cadeia transportadora



de elétrons inibida, o oxigênio que está sendo consumido não é devido à passagem de elétrons pela cadeia respiratória (Gnaiger, 2001).



**Figura 11.** Gráfico representativo das curvas que mostram o consumo de oxigênio por um sistema celular em um experimento de respirometria clássica.

Adaptado de <http://www.seahorsebio.com>.

### 3.16 Determinação de Proteínas

A quantidade total de proteínas para ponderar os resultados obtidos na atividade enzimática, danos oxidativos, cadeia respiratória e parâmetros inflamatórios foi determinada a partir da técnica descrita por Lowry e cols (1951).

### 3.17 Determinação da Expressão Gênica de IL-6, IL-10, BDNF e VEGF por Reação em Cadeia da Polimerase via Transcriptase Reversa em Tempo Real (RT-PCR):

#### Extração de RNA Total

As amostras de músculo foram lisadas utilizando Trizol. O RNA total foi extraído de amostras dos grupos controle e irradiados,

utilizando o protocolo indicado pelo fabricante do produto TRI Reagent (Sigma). A concentração e pureza de RNA total foram determinadas através de um espectrofotômetro a 260nm e a 280nm.

### **Síntese de DNA Complementar (cDNA) por Transcriptase Reversa**

Cerca de 2 µg de RNA total foram utilizados na síntese de cDNA, utilizando o kit “M-MLV Reverse Transcriptase” (Sigma). A reação foi realizada em microtubo de 0,2 mL contendo o tampão M-MLV Reverse Transcriptase, 0,1 M DTT, RNase OUT e a enzima M-MLV transcriptase reversa (e uma quantidade de água suficiente para completar 20 µL. Também foram preparados tubos “controle negativo”, contendo todos os reagentes, sem a enzima transcriptase reversa. Os tubos foram colocados para reação num Termociclador Eppendorf, de acordo com o seguinte protocolo: 25°C por 10 minutos (“primer annealing”), 37°C durante 50 minutos (síntese) e 4°C por 10 minutos (para inativação da enzima), seguindo as instruções do manual do produto e descrito previamente (Jiang e cols., 2006).

### **RT-PCR Quantitativa**

A reação foi realizada utilizando o kit “Power SYBR Green PCR Master Mix” (Applied Biosystems), contendo cerca de 10-100 ng de cDNA, volume final de 25 µL e na presença de 0,3 µM de “primers” dos tipos “forward” ou “reverse”, de acordo com a Tabela 1. Os “primers” mostrados na Tabela 1 foram obtidos de trabalhos publicados ou desenhados utilizando o programa “Primer Express” (Applied Biosystems). As seqüências dos genes foram pesquisadas no sítio do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) na base de dados “Gene” e os “primers” desenhados de acordo com os exons específicos para cada proteína. As reações foram realizadas num equipamento ABI PRISM série 7900HT (Applied Biosystems), instalado no Laboratório de Equipamentos Multiusuários do CCB, UFSC. A reação foi realizada com o seguinte protocolo: 50°C por 2 minutos (incubação), 95°C por 10 minutos (ativação da Taq polimerase), seguido de 40 ciclos de 95°C por 10 segundos e 60°C por 1 minuto, como descrito previamente (Jiang e cols., 2010). Os resultados foram analisados utilizando o software Sequence Detection Systems (SDS) versão 2.4. Os dados foram normalizados pela expressão de genes constitutivos empregados como padrões (“housekeeping genes”): Actina B (ACTB) ou gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). Para ter certeza de que não foram amplificados dímeros de primers, DNA contaminante e produtos de

PCR de primers mal alinhados na reação de qRT-PCR, foram adicionados mais alguns passos chamados de “melting curves”.

**Tabela 1 Sequências dos ”primers” empregado nas determinações**

	Sequência “Forward”	Sequencia “Reverse”
VEGF	ATCATGCGGATCAAAC CTCACC	GGTCTGCATTCACATCTGCTAT
BDNF	AAGGCTGCAGGGGCAT AGAC	TGAACCGCCAGCCAATTCTC
IL-6	AAGAGACTTCCAGCCA GTTGCC	ACTGGTCTGTTGTGGGTGGTA
IL-10	GCCAAGCCTTGTCAGA AATGA	TTTCTGGGCCATGGTTCTCT

### 3.18 Campo aberto

A atividade locomotora dos animais submetidos aos diferentes tratamentos foi mensurada no teste comportamental de campo aberto. Esta avaliação emprega um aparelho feito de acrílico com um piso branco de 60 cm de diâmetro por 50 cm de altura. Cada rato foi colocado no centro do campo aberto, e a distância e a quantidade de levantamentos foram registrados durante 5 minutos empregando a plataforma Any-maze seguindo as descrições de Aguiar e cols (2009).

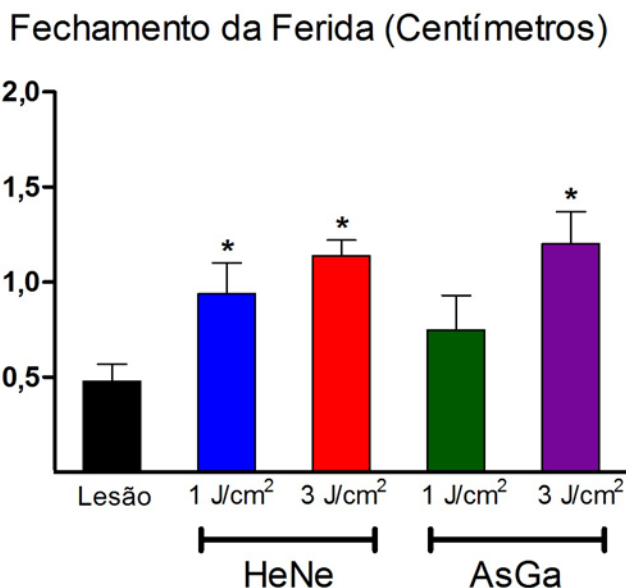
### 3.19 Tratamento Estatístico:

Os dados foram expressos em média e erro padrão da média e analisados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido pelo teste *post hoc* de Tukey. Os dados relacionados à concentração de FCCP empregado para mensurar a capacidade respiratória máxima foi analisado pelo método não paramétrico de Kruskal–Wallis, seguido pelo teste *post hoc* de Dunn. O nível de significância estabelecido para o teste estatístico é de  $P < 0,05$ . Foi

utilizado o SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versão 16.0 como pacote estatístico.

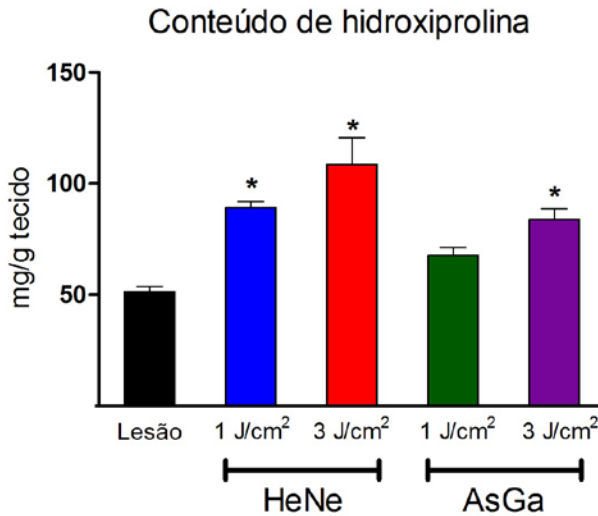
#### 4 RESULTADOS

A Figura 12 mostra o efeito da aplicação do LBP sobre o tamanho de ferida. Pode ser observado uma melhora significativa no processo de cicatrização da ferida medido através da regressão do tamanho da ferida nos animais irradiados com HeNe 1 e 3 J/cm<sup>2</sup> e AsGa 3 J/cm<sup>2</sup> [ $F_{(4;25)} = 10,14$ ;  $P < 0,05$ ].



**Figura 12.** Efeito da irradiação do LBP no processo de cicatrização por mensuração da regressão do tamanho da ferida 5 dias após a ulceração. A aplicação do LBP foi realizada 2, 12, 24, 48, 72, 96, e 120 horas após a ulceração. As barras representam a média±erro padrão da média para seis animais. \* $P < 0,05$  vs. lesão (ANOVA de 1 via seguido de teste *post hoc* de Tukey).

Pode ser observado na Figura 13 um aumento significativo no índice de fibrinogênese e fibrose, representado pela concentração de hidroxiprolina em animais com lesão dérmica que receberam tratamento com LBP HeNe 1 e 3 J/cm<sup>2</sup> e AsGa 3 J/cm<sup>2</sup> [ $F_{(4;25)} = 14,83$ ;  $P < 0,05$ ].



**Figura 13. :** Efeito da irradiação do LBP no conteúdo de hidroxiprolina 5 dias após a ulceração. A aplicação do LBP foi realizada 2, 12, 24, 48, 72, 96, e 120 horas após a ulceração. As barras representam a média  $\pm$  erro padrão da média para seis animais. \* $P < 0,05$  vs. lesão (ANOVA de 1 via seguido de teste *post hoc* de Tukey).

As Figuras 14 e 15 mostram o efeito da aplicação de LBP sobre parâmetros de estresse oxidativo em animais submetidos à lesão dérmica. A Figura 14A mostra uma diminuição significativa no conteúdo de TBA-RS nos animais tratados com HeNe 1 J/cm<sup>2</sup> e 3 J/cm<sup>2</sup> e AsGa 3 J/cm<sup>2</sup> [ $F_{(4;25)} = 6,31$ ;  $P < 0,05$ ]. A Figura 14B mostra que a carbonilação de proteínas foi significativamente reduzida após o tratamento com HeNe 1 e 3 J/cm<sup>2</sup>, e AsGa 3 J/cm<sup>2</sup> [ $F_{(4;25)} = 11,22$ ;  $P < 0,05$ ]. Figuras 15A e 15B, mostram que o tratamento com LBP significativamente reduziu a atividade da SOD [ $F_{(4;25)} = 9,69$ ;  $P < 0,05$ ] e CAT [ $F_{(4;25)} = 7,46$ ;  $P < 0,05$ ] nos animais tratados com HeNe 1 e 3 J/cm<sup>2</sup> e AsGa 3 J/cm<sup>2</sup>.

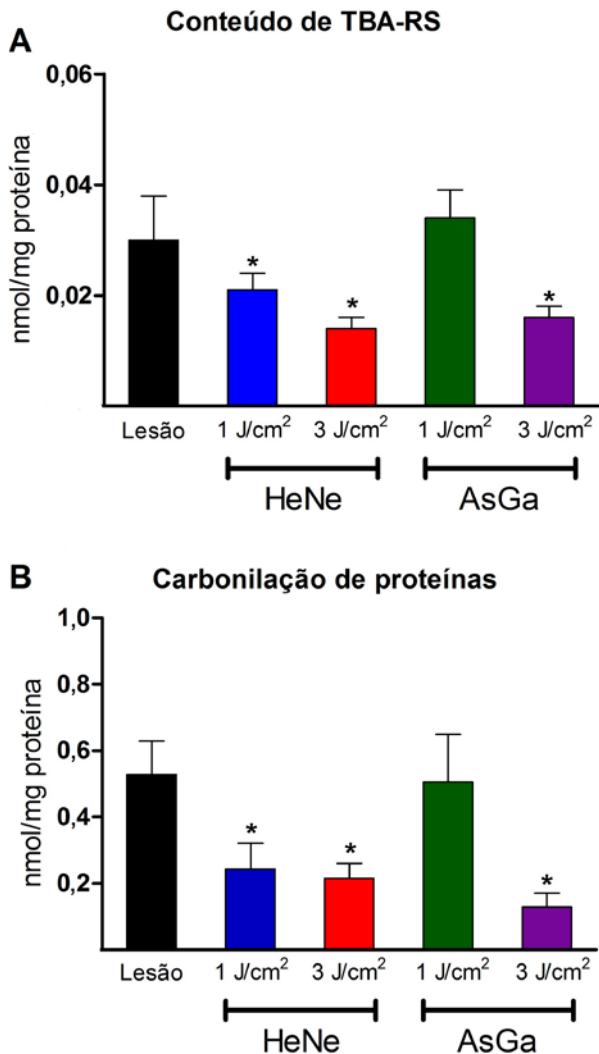
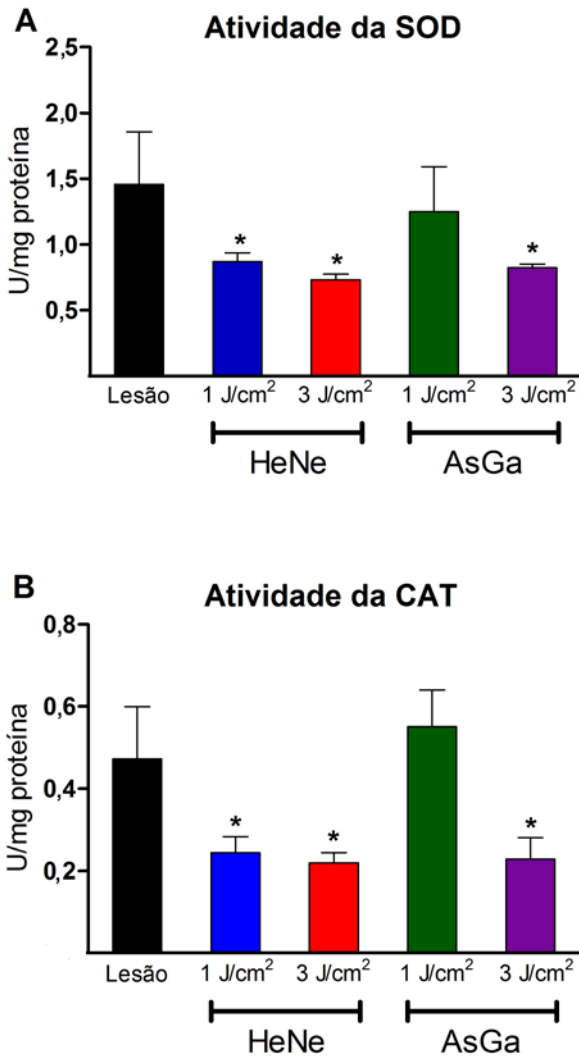


Figura 14. Efeito da irradiação do LBP no conteúdo de TBA-RS (A) e carbonilação de proteínas (B) 5 dias após a ulceração. A aplicação do LBP foi realizada 2, 12, 24, 48, 72, 96, e 120 horas após a ulceração. As barras representam a média±erro padrão da média para seis animais. \* $P < 0.05$  vs. lesão (ANOVA de 1 via seguido de teste *post hoc* de Tukey).



**Figura 15. :** Efeito da irradiação do LBP sobre a atividade da SOD (A) e CAT (B) 5 dias após a ulceração. A aplicação do LBP foi realizada 2, 12, 24, 48, 72, 96, e 120 horas após a ulceração. As barras representam a média±erro padrão da média para seis animais. \* $P < 0.05$  vs. lesão (ANOVA de 1 via seguido de teste *post hoc* de Tukey).



### **Efeitos da Lesão Muscular Traumática sobre Parâmetros de Estresse Oxidativo 2, 12 e 24 horas após a Lesão.**

A Figura 16 mostra que após a indução da lesão muscular o conteúdo de TBA-RS [ $F_{(3;16)}= 6,82; P < 0,01$ ] (Figura 16A) e a carbonilação de proteínas [ $F_{(3;18)}= 5,81; P < 0,01$ ] (Figura 16B) tiveram um aumento significativo em relação ao controle, independente do início do tratamento. Também pode ser observado nas Figuras 16C–E um aumento na atividade das enzimas antioxidantes SOD [ $F_{(3;20)}= 5,88; P < 0,01$ ], GPx [ $F_{(3;18)}= 8,34; P < 0,01$ ] e CAT [ $F_{(3;18)}= 7,54; P < 0,01$ ].

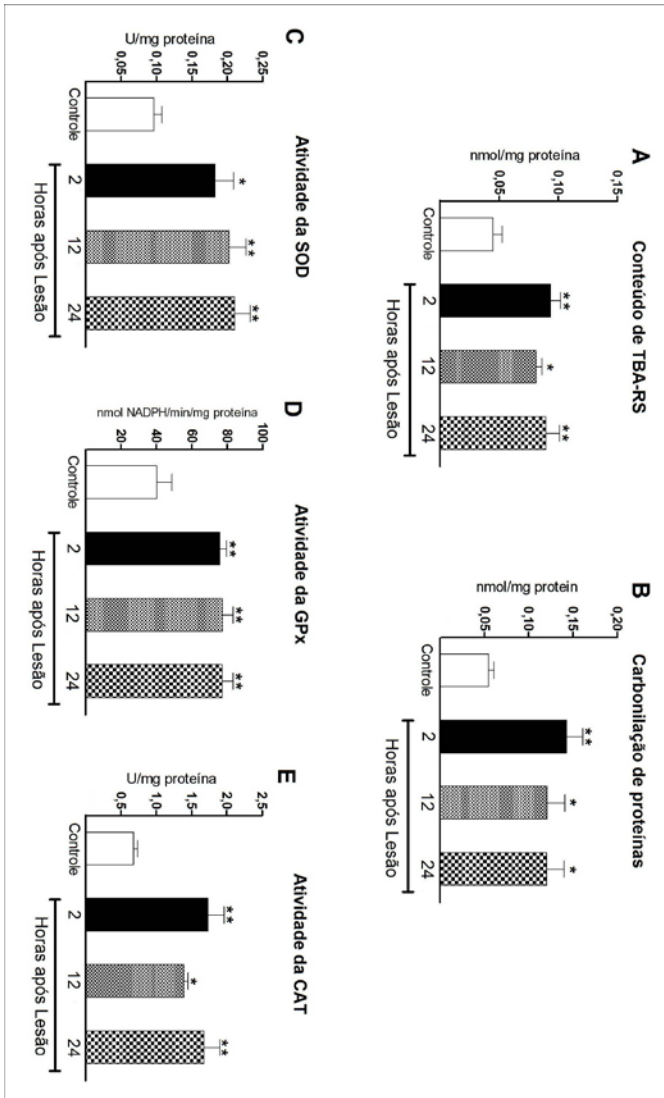


Figura 16. Efeito induzido pela lesão muscular traumática sobre o conteúdo de TBA-RS (A), carbonilação de proteínas (B), atividade das enzimas antioxidantes SOD (C), GPx (D) e CAT (E) 2, 12 e 24 horas após a lesão. As barras representam a média  $\pm$  erro padrão da média para seis animais. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. Controle (ANOVA de 1 via seguido de teste *post hoc* de Tukey).

### **Efeitos da Irradiação com LBP AsGa nas Doses de 3 e 5 J/cm<sup>2</sup> sobre Parâmetros de Estresse Oxidativo 5 dias após a Indução de Lesão Muscular Traumática.**

A irradiação (3 J/cm<sup>2</sup>) iniciou 2 h, 12 h e 24 h após induzir o trauma muscular, e o tratamento foi mantido por cinco dias consecutivos. Em todos os casos foram realizadas aplicações de LBP a cada 24 h. A Tabela 2 mostra o efeito do LBP AsGa 2 h após a lesão sobre o conteúdo de TBA-RS, carbonilação de proteínas e a atividade de enzimas antioxidantes no músculo esquelético de animais que receberam trauma por compressão. Pode ser observado que os animais traumatizados tiveram um aumento significativo no conteúdo de TBA-RS [ $F_{(3;20)}= 8,37$ ;  $P < 0,05$ ] e na carbonilação de proteínas [ $F_{(3;19)}= 12,75$ ;  $P < 0,05$ ], o mesmo comportamento aconteceu na atividade das enzimas antioxidantes SOD [ $F_{(3;20)}= 5,42$ ;  $P < 0,05$ ], GPx [ $F_{(3;20)}= 5,43$ ;  $P < 0,05$ ] e na CAT [ $F_{(3;20)}= 8,45$ ;  $P < 0,05$ ] sendo estas alterações prevenidas pelo uso do LBP.

A Tabela 2 mostra o efeito do LBP AsGa 12 h após a lesão sobre o conteúdo de TBA-RS, carbonilação de proteínas e a atividade de enzimas antioxidantes no músculo esquelético de animais que receberam trauma por compressão. Pode ser observado que os animais traumatizados tiveram um aumento significativo no conteúdo de TBARS [ $F_{(3;20)}= 10,67$ ;  $P < 0,05$ ], carbonilação proteica [ $F_{(3;19)}= 3,54$ ;  $P < 0,05$ ] e na atividade da GPX [ $F_{(3;20)}= 3,04$ ;  $P < 0,05$ ] e CAT [ $F_{(3;18)}= 12,8$ ;  $P < 0,05$ ], sendo estas alterações prevenidas pelo uso do LBP menos na atividade da GPX.

A Tabela 2 mostra o efeito do LBP AsGa 24 h após a lesão sobre o conteúdo de TBA-RS, carbonilação de proteínas e a atividade de enzimas antioxidantes no músculo esquelético de animais que receberam trauma por compressão. Pode ser observado que os animais traumatizados tiveram um aumento significativo no conteúdo de TBARS [ $F_{(3;19)}= 11,25$ ;  $P < 0,05$ ], na atividade da SOD [ $F_{(3;20)}= 6,99$ ;  $P < 0,05$ ] e CAT [ $F_{(3;18)}= 10,04$ ;  $P < 0,05$ ], sendo estas alterações prevenidas pelo uso do LBP no conteúdo de TBARS e na atividade da CAT.

**Tabela 2.** Efeito do laser de baixa potência AsGa na dose de 3 J/cm<sup>2</sup> com início da irradiação 2, 12, 24 horas após a lesão muscular sobre o conteúdo de TBA-RS, carbonilação de proteínas, atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e catalase (CAT) em homogenato de músculo esquelético.

Início da radiação	Parâmetros				
	TBA-RS	Carbonilação	SOD	GPX	CAT
<b>2 horas após lesão</b>					
Grupo Controle (GC)	0,05±0,003	0,21±0,01	0,09±0,01	2,07±0,20	2,19±0,19
Grupo Lesão (EL)	0,08±0,006*	0,34±0,02*	0,18±0,02*	3,00±0,31*	3,55±0,44*
GC + AsGa (3 J/cm <sup>2</sup> )	0,06±0,003	0,28±0,01	0,14±0,01	2,21±0,17	2,77±0,30
EL + AsGa (3 J/cm <sup>2</sup> )	0,05±0,003#	0,23±0,01#	0,08±0,01#	1,72±0,20#	1,39±0,25#
<b>12 horas após a lesão</b>					
Grupo Controle (GC)	0,02±0,002	0,15±0,007	0,23±0,02	2,38±0,32	2,02±0,12
Grupo Lesão (EL)	0,06±0,001*	0,28±0,03*	0,27±0,02	3,91±0,56*	3,00±0,34*
GC + AsGa (3 J/cm <sup>2</sup> )	0,02±0,002	0,21±0,05	0,30±0,04	1,81±0,37	3,16±0,39
EL + AsGa (3 J/cm <sup>2</sup> )	0,01±0,001#	0,14±0,01#	0,34±0,03	3,25±0,33	0,92±0,20#
<b>24 horas após a lesão</b>					
Grupo Controle (GC)	0,12±0,01	0,17±0,01	7,2±0,45	2,77±0,27	
Grupo Lesão (EL)	0,20±0,03*	0,24±0,01*	6,82±0,44	4,40±0,49*	
GC + AsGa (3 J/cm <sup>2</sup> )	0,09±0,006#	0,17±0,006#	6,84±0,51	3,35±0,36	
EL + AsGa (3 J/cm <sup>2</sup> )	0,09±0,004#	0,19±0,01	7,55±0,43	1,78±0,21#	

As barras representam a média±erro padrão da média para seis animais. \*P<0.05 vs. Controle #P<0.05 vs. Grupo lesão (ANOVA de 1 via seguido de tese post hoc de Turkey).

A irradiação ( $5 \text{ J/cm}^2$ ) iniciou 2 h, 12 h e 24 h após induzir o trauma muscular, e o tratamento foi mantido por cinco dias consecutivos. Em todos os casos foram realizadas aplicações de LBP a cada 24 h. A Tabela 3 mostra o efeito do LBP AsGa 2 h após a lesão sobre o conteúdo de TBA-RS, carbonilação de proteínas e a atividade de enzimas antioxidantes no músculo esquelético de animais que receberam trauma por compressão. Pode ser observado que os animais traumatizados tiveram um aumento significativo no conteúdo de TBA-RS [ $F_{(3;18)}= 8,24; P < 0,05$ ] e carbonilação protéica [ $F_{(3;20)}= 11,22; P < 0,05$ ], o mesmo comportamento aconteceu na atividade das enzimas antioxidantes SOD [ $F_{(3;19)}= 9,01; P < 0,05$ ], GPx [ $F_{(3;20)}= 6,94; P < 0,05$ ] e na CAT [ $F_{(3;18)}= 7,16; P < 0,05$ ], sendo estas alterações prevenidas pelo uso do LBP.

A Tabela 3 mostra o efeito do LBP AsGa 12 h após a lesão sobre o conteúdo de TBA-RS, carbonilação de proteínas e a atividade de enzimas antioxidantes no músculo esquelético de animais que receberam trauma por compressão. Pode ser observado que os animais traumatizados tiveram um aumento significativo na carbonilação proteica [ $F_{(3;20)}= 4,71; P < 0,05$ ], atividade da SOD [ $F_{(3;20)}= 3,21; P < 0,05$ ], GPx [ $F_{(3;19)}= 8,24; P < 0,05$ ], e CAT [ $F_{(3;18)}= 6,35; P < 0,05$ ], sendo estas alterações prevenidas pelo uso do LBP menos na atividade da SOD.

A Tabela 3 mostra o efeito do LBP AsGa 24 h após a lesão sobre o conteúdo de TBA-RS, carbonilação de proteínas e a atividade de enzimas antioxidantes no músculo esquelético de animais que receberam trauma por compressão. Pode ser observado que os animais traumatizados tiveram um aumento significativo no conteúdo de TBARS, carbonilação proteica e na atividade da SOD, GPx e CAT, e apenas a carbonilação proteica foi prevenida pelo uso do LBP. [ $F_{(3;18)}= 7,64; P < 0,05$ ].

Considerando que ambas as doses do laser AsGa 3 e  $5 \text{ J/cm}^2$  demonstraram uma melhor resposta nos parâmetros avaliados, os experimentos seguintes foram realizados utilizando exclusivamente a dose de  $3 \text{ J/cm}^2$  com início das irradiações 2 horas após a lesão.

**Tabela 3. Efeito do laser de baixa potência AsGa na dose de 5 J/cm<sup>2</sup> com início da irradiação 2, 12, 24 horas após a lesão muscular sobre o conteúdo de TBA-RS, carbonilação de proteínas, atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e catalase (CAT) em homogenato de músculo esquelético.**

Início da radiação	Parâmetros				
	TBA-RS	Carbonilação	SOD	GPX	CAT
<b>2 horas após a lesão</b>					
Grupo Controle (GC)	0,11±0,01	0,19±0,02	0,09±0,01	3,76±0,25	3,66±0,23
Grupo Lesão (GL)	0,21±0,02*	0,39±0,06*	0,24±0,03*	5,34±0,32*	5,67±0,55*
GC + AsGa (5 J/cm <sup>2</sup> )	0,14±0,04	0,29±0,02	0,17±0,03	4,84±0,42	4,88±0,22
GL + AsGa (5 J/cm <sup>2</sup> )	0,07±0,01#	0,21±0,04#	0,13±0,02#	3,30±0,20#	3,97±0,54#
<b>12 horas após a lesão</b>					
Grupo Controle (GC)	0,03±0,006	0,04±0,004	0,11±0,014	4,25±0,11	2,17±0,11
Grupo Lesão (GL)	0,035±0,003	0,09±0,006*	0,19±0,018*	5,95±0,52*	3,64±0,41*
GC + AsGa (5 J/cm <sup>2</sup> )	0,02±0,004	0,06±0,004#	0,14±0,02	4,13±0,32#	2,95±0,46
GL + AsGa (5 J/cm <sup>2</sup> )	0,02±0,003	0,06±0,008#	0,13±0,003	4,20±0,40#	1,62±0,19#
<b>24 horas após a lesão</b>					
Grupo Controle (GC)	0,79±0,02	0,06±0,008	0,07±0,011	6,92±0,64	3,79±0,15
Grupo Lesão (GL)	1,10±0,20*	0,13±0,03*	0,15±0,005*	9,98±1,83*	7,30±0,56*
GC + AsGa (5 J/cm <sup>2</sup> )	0,69±0,08	0,07±0,005#	0,08±0,007	7,81±1,05	6,23±0,65*
GL + AsGa (5 J/cm <sup>2</sup> )	1,00±0,07	0,06±0,009#	0,09±0,008	9,30±0,82	5,34±0,55

As barras representam a média±erro padrão da média para seis animais. \*P<0.05 vs. Controle #P<0.05 vs. Grupo lesão (ANOVA de 1 via seguido de teste post hoc de Turkey)

## Influência da LBP sobre a Concentração de Nitritos, Produtos Proteicos de Oxidação Avançada (AOPPs) e Ditirosina no Plasma ou que Receberam Trauma.

As Figuras 17A e B mostram o efeito do LBP sobre a concentração de nitrito em plasma e músculo esquelético de animais que receberam trauma muscular. Na Figura 17C e D mostram o efeito do LBP sobre a concentração de AOPP e ditirosina em plasma de animais que receberam trauma muscular. Pode ser observado nas Figuras um aumento significativo na concentração de nitrito no plasma [ $F_{(3;18)}=9,21$ ;  $P < 0,05$ ] e no músculo [ $F_{(3;19)}=4,88$ ;  $P < 0,05$ ] de animais que receberam trauma muscular. O mesmo aconteceu na concentração AOPP [ $F_{(3;16)}=48,45$ ;  $P < 0,05$ ] e ditirosina [ $F_{(3;17)}=27,11$ ;  $P < 0,05$ ] no plasma. Por outro lado, os animais do grupo irradiado com lesão teve uma diminuição significativa em relação aos animais do grupo lesão muscular em todos os parâmetros mensurados (Figura 17A-D).

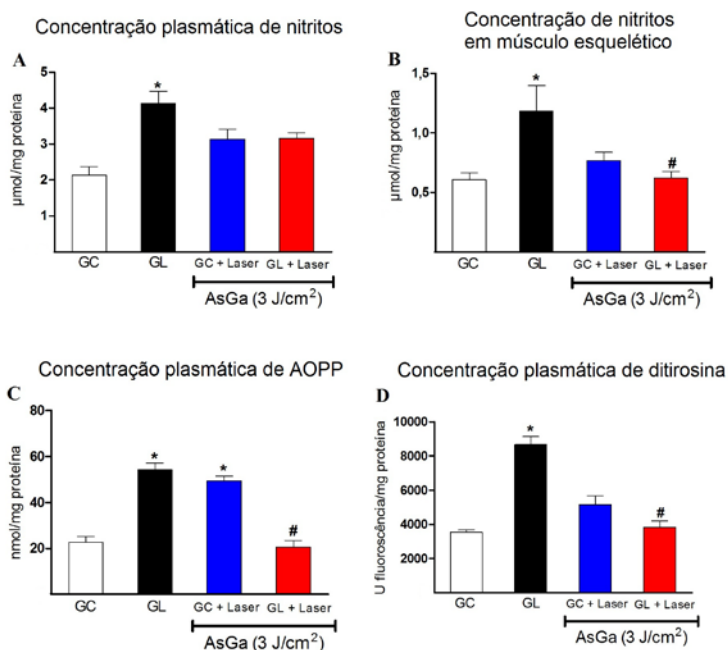


Figura 17. Efeitos do LBP AsGa na dose de  $3 \text{ J/cm}^2$  e com início de irradiação 2 horas após induzir a lesão traumática muscular sobre a concentração de nitritos no plasma (A) e no músculo (B)

Como também, o conteúdo de AOPPs (C) e ditirosina (D) no plasma após 5 dias de lesão. As barras representam a média±erro padrão da média para seis animais. \* $P < 0,05$  vs. Controle # $P < 0,05$  vs. Grupo lesão (ANOVA de 1 via seguido de teste *post hoc* de Tukey).

### Efeito do LBP sobre Marcadores de Processo Inflamatório em Músculo Esquelético de Animais com Trauma Muscular

A Figura 18 mostra que o trauma muscular provocou um aumento significativo na expressão do gene que codifica para a citocina pró-inflamatória IL-6 [ $F_{(3;8)} = 35,01$ ;  $P < 0,05$ ], para o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) [ $F_{(3;9)} = 19,31$ ;  $P < 0,05$ ] e para o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) [ $F_{(3;8)} = 14,80$ ;  $P < 0,05$ ]. Esse efeito foi prevenido pelo tratamento com LBP AsGa (3 J/cm<sup>2</sup>) iniciando a aplicação 2 h após a lesão. Em relação à expressão da citocina anti-inflamatória IL-10 [ $F_{(3;6)} = 7,10$ ;  $P < 0,05$ ] o grupo de animais irradiado e com lesão demonstrou um aumento significativo em relação ao grupo lesão muscular.

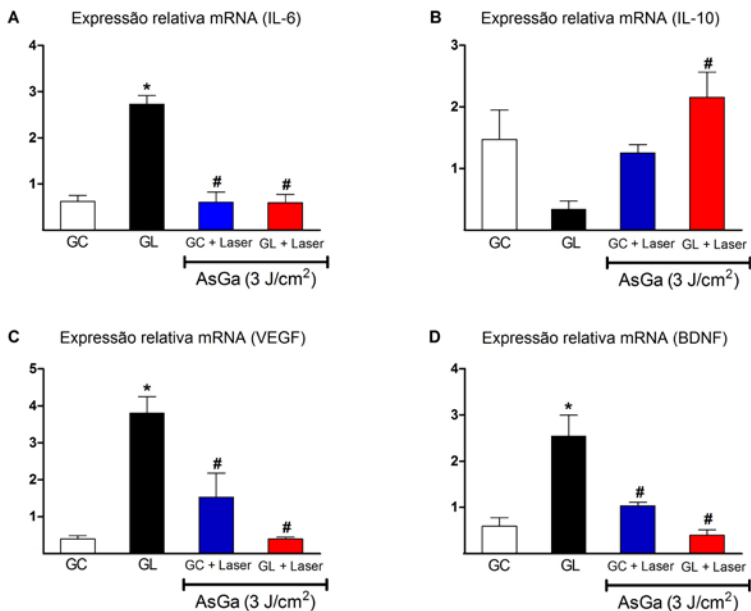


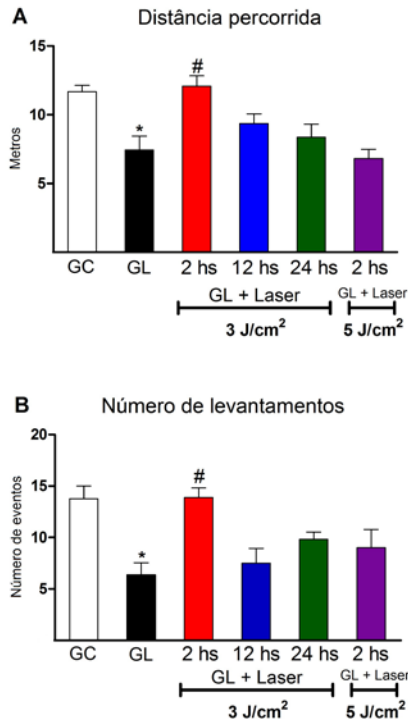
Figura 18. Efeitos do laser de baixa potência AsGa com dose de 3 J/cm<sup>2</sup> com início da irradiação 2 horas após a lesão sobre a expressão genica da IL-6 (A), IL-10 (B), fator crescimento endotélio vascular (C) e fator



neurotrófico derivado do cérebro (D) em músculo esquelético traumatizado. As barras representam a média $\pm$ erro padrão da média para seis animais. \* $P < 0.05$  vs. Controle # $P < 0.05$  vs. Grupo lesão (ANOVA de 1 via seguido de teste *post hoc* de Tukey).

### Efeitos do LBP sobre a Atividade Motora de Animais com Trauma Muscular

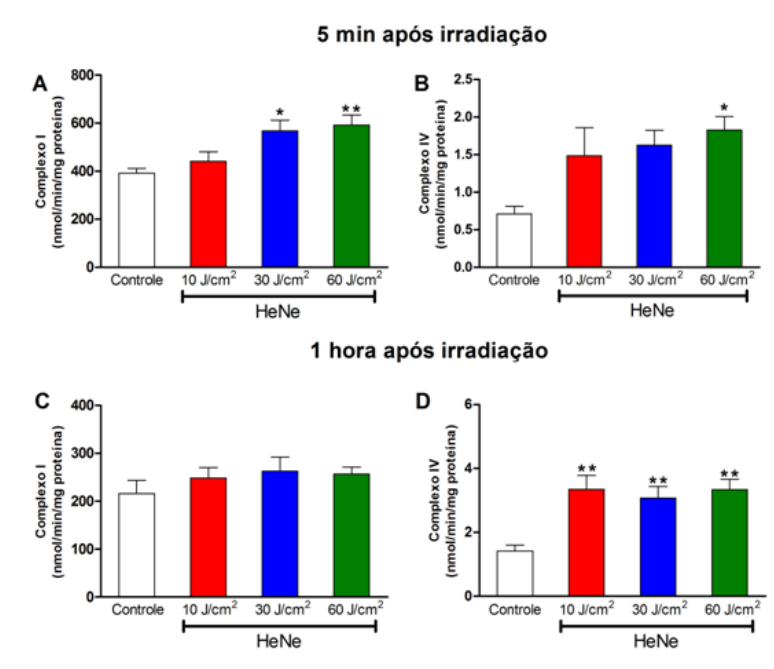
Para avaliar se a irradiação com AsGa com dose de  $3 \text{ J/cm}^2$  e com início da irradiação após 2 horas da indução de lesão muscular melhorou a funcionalidade da região traumatizada, foi avaliado a atividade locomotora do animal e o número de levantamentos no aparelho de teste comportamental de campo aberto. A Figura 19A mostra uma redução significativa na distância percorrida pelos animais do grupo lesão muscular em relação ao grupo controle, e que somente os animais do grupo irradiado  $3 \text{ J/cm}^2$  com início da irradiação após 2 horas teve um aumento significativo em relação ao grupo lesão muscular [ $F_{(2;20)} = 11,42$ ;  $P < 0,05$ ]. Na Figura 19B podemos observar que os animais do grupo lesão muscular teve uma diminuição significativa no número de levantamentos em relação ao grupo controle, e somente os animais do grupo irradiado  $3 \text{ J/cm}^2$  com início da irradiação após 2 horas da indução da lesão reverteu esse comportamento [ $F_{(2;21)} = 14,19$ ;  $P < 0,05$ ].



**Figura 19.** Efeito do laser de baixa potência AsGa com dose de 3 J/cm<sup>2</sup> com início da irradiação 2, 12 e 24 horas e dose de 5 J/cm<sup>2</sup> com início da irradiação 2 horas após a lesão sobre a distância percorrida (A) e no número de levantamentos (B) no campo aberto. As barras representam a média±erro padrão da média para seis animais. \* $P < 0.05$  vs. Controle, # $P < 0.05$  vs. Grupo lesão (ANOVA de 1 via seguido de teste *post hoc* de Tukey).

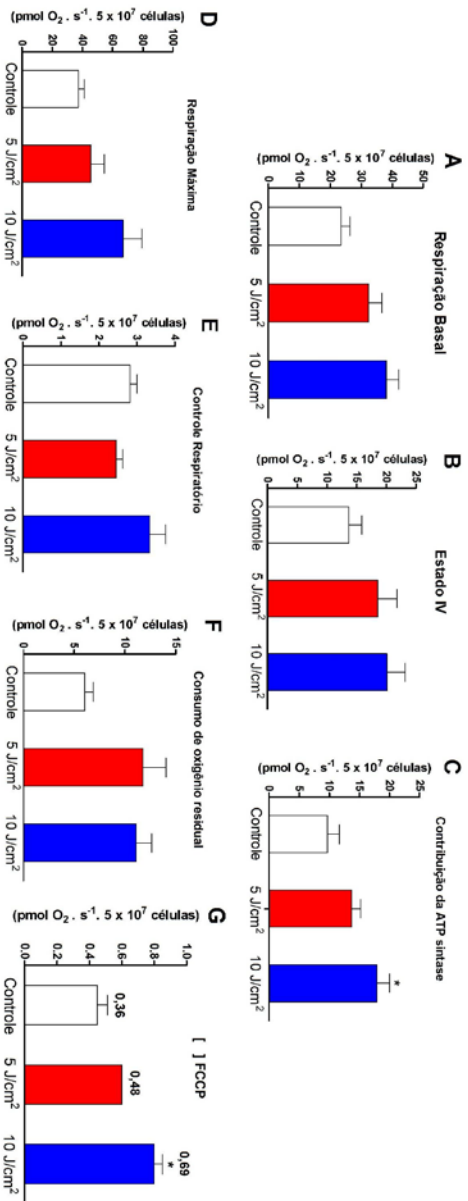
A Figura 20A mostra que 5 minutos após a irradiação com o LBP com doses de 30 e 60 J/cm<sup>2</sup> a atividade do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial aumentou significativamente [ $F_{(3,18)} = 6,42$ ;  $P < 0,01$ ]. De forma similar, a Figura 20B mostra que a atividade do complexo IV da cadeia respiratória mitocondrial aumentou significativamente 5 minutos após a irradiação com LBP a dose de 60 J/cm<sup>2</sup> [ $F_{(3,16)} = 4,33$ ;  $P < 0,05$ ]. Pode ser observado na Figura 20D que 1 hora após a irradiação com LBP com doses de 10, 30 e 60 J/cm<sup>2</sup> a

atividade do complexo IV da cadeia respiratória mitocondrial aumentou significativamente [ $F_{(3,16)} = 7,53$ ;  $P < 0,01$ ].



**Figura 20. :** Efeito do laser de baixa potência Hélio Neônio (HeNe) (10, 30 e 60 J/cm<sup>2</sup>) sobre as atividades do complexo I da cadeia respiratória (A e C) e complexo IV (B e D) em mitocôndrias 5 minutos e 1 hora após a irradiação. As barras representam a média±erro padrão da de seis animais. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  vs. controle (ANOVA de 1 via seguido de teste *post hoc* de Tukey).

A Figura 21C mostra que as células musculares irradiadas com laser HeNe e dose de 10 J/cm<sup>2</sup> tiveram uma contribuição maior da ATP sintase no consumo de oxigênio basal em comparação com as células controle [ $F_{(2,8)} = 4,46$ ;  $P < 0,05$ ]. A Figura 21G mostra que a concentração de FCCP empregado para mensurar a capacidade máxima respiratória nas células musculares irradiadas com HeNe com dose de 10 J/cm<sup>2</sup> foi significativamente maior em comparação com o grupo controle [ $K_{(2,11)} = 9,60$ ;  $P < 0,05$ ].



**Figura 21.** Efeito do laser de baixa potência Hélio Neônio sobre parâmetros de respiração celular em células musculares L6.

As medidas de consumo de oxigênio, respiração basal (C), respiração máxima (D), índice de controle respiratório (E), geração de espécies reativas extramitocondriais (F) e concentração de FCCP (G) foram medidas em respirômetro de alta resolução Oroboros em meio DMEM livre de rotor fetal bovino a 37°C. As barras representam a média±erro padrão da média para 4 – 6 experimentos. \*P<0,05 vs. Controle (ANOVA e Kruskal-Wallis de 1 via seguido de teste *post hoc* de Tukey e Donn's).

## 5 DISCUSSÃO

O LBP tem ampliado a sua utilização na prática clínica na última década. Seu êxito deve-se às particularidades de respostas que induz nos tecidos, como redução de edema, diminuição do processo inflamatório, aumento da síntese de colágeno e da epitelização. Inúmeros estudos foram realizados em diversas células que fazem parte do processo cicatricial, em uma tentativa de elucidar os mecanismos biológicos pelas quais a irradiação do LBP pode estimular o processo regenerativo (Karu, 1999, 2004, 2010; Eels e cols., 2004; Wong-Riley e cols., 2005; Chen e cols., 2011).

Devido a poucas afirmações na literatura sobre os reais efeitos da terapia com LBP na resposta benéfica tecidual e também por falta de estudos que demonstrem esses efeitos, esse trabalho teve como objetivo investigar os eventos moleculares desencadeados pela irradiação com LBP na recuperação de lesões epidérmicas e musculares em roedores.

Neste contexto, a primeira parte do nosso estudo teve como objetivo avaliar o processo de cicatrização de feridas epiteliais após ulceração e tratamento com diferentes tipos e doses de LBP, mensurando a regressão do tamanho da ferida, síntese de colágeno e parâmetros de estresse oxidativo. Os resultados mostraram uma melhora no processo de cicatrização através da redução do tamanho da ferida, aumento na fibrogênese e redução de estresse oxidativo após 5 dias de irradiação.

A resposta inflamatória é representada por ativação de neutrófilos e macrófagos e acúmulo de outras células de defesa no tecido lesado (Li e cols., 1999). Os neutrófilos e monócitos representam um papel chave na fase inflamatória do reparo de ferida por secretar citocinas e fatores de crescimento (Henry e cols., 2003; Pereira e cols., 2008). Entretanto, esses eventos também aumentam a produção de oxidantes que levam a danos oxidativos a lipídeos, proteínas e DNA, bem como a necrose celular, comprometendo a recuperação do tecido (Pattwell e Jackson, 2004). A diminuição no tamanho da ferida e conseqüentemente a cicatrização sugerem um efeito positivo no tratamento com LPB (HeNe e AsGa) com diferentes comprimentos de onda e doses.

Neste cenário, os efeitos benéficos do LBP podem ser relacionados a aceleração da fase inflamatória e melhora nos parâmetros de estresse oxidativo. Na fase inflamatória aguda, as células mortas são removidas pela infiltração de neutrófilos e seguido por uma resposta regenerativa, no qual, ocorre a proliferação de células satélites substituindo as células previamente danificadas e fagocitadas (Sommer e

cols., 2001). Prévios estudos do nosso grupo demonstraram que a fase inflamatória é acelerada pela LBP devido ao aumento na produção de ATP mitocondrial. Os efeitos fotoestimuladores do LBP sobre uma variedade de enzimas mitocondriais (complexos de proteínas na cadeia de transporte de elétrons) foi investigado por diferentes pesquisadores (Vekshin e cols., 1982; Passarela e cols., 1984; Karu, 1999).

Os eventos primários nas células expostas à irradiação infravermelha ocorrem na mitocôndria (Karu, 1987, 1999), onde um dos três principais fotorreceptores moleculares, o citocromo *c*, está localizado. Cooper e cols (1997) e Beauvoit e cols (1994) postulam que até 50% da luz infravermelha é absorvida por cromóforos na mitocôndria, incluindo o citocromo *c*. Byrnes e cols (2004) sugerem que durante os primeiros dias de cicatrização, o processo de reparo é direcionado para impedir e prevenir subsequente perda de sangue, com formação de um tampão de fibrina que auxilia a matriz celular para subsequentes eventos, iniciando com adesão de plaquetas ao colágeno no espaço perivascular. Este contato ativa as plaquetas, induzindo a liberação de fatores plaquetareos que aceleram a migração e proliferação de fibroblastos que são as principais células no processo de regeneração tecidual (Poli e Parola, 1997).

Nesse estudo, foi observado um aumento na síntese de colágeno nos animais irradiados, reforçando a ideia que o LBP acelera a migração e proliferação de fibroblastos. A fase de fibrose do processo de cicatrização é caracterizada pela síntese de colágeno, proteína composta por glicina, prolina e hidroxiprolina (Fukushima e cols., 2001). Neste contexto, nosso resultado do conteúdo de hidroxiprolina está de acordo com publicações anteriores (Reddy e cols, 1998; Stadler e cols., 2001; Al-Watban e cols, 2003), em que a terapia com LBP melhorou o processo de cicatrização aumentando a produção de colágeno.

Estudos recentes indicam que as ERO como o superóxido, radical hidroxila, óxido nítrico e peroxinitrito desempenham um papel importante no processo de cicatrização (Gillitzer e Goebeler, 2001; Pereira e cols., 2008). A produção de ERO é um processo essencial para proteger a célula contra invasão de agentes infecciosos. Entretanto, quando se torna excessiva a produção de ERO, essa condição pode levar a danos a biomoléculas e prejudicar o processo de recuperação no tecido lesado (Halliwell e Gutteridge, 2007; Kerkweg e cols., 2007).

Por outro lado, alguns estudos reportaram que LBP é capaz de reduzir os níveis de ERO derivados da mitocôndria em células epiteliais e acelerar a cadeia respiratória em neutrófilos de ratos (Ruszczak e cols., 2000; Albertini e cols., 2007). Adicionalmente, foi sugerido que

processos de fotobioestimulação modulam o estado redox celular (Liu e cols., 2009).

Nossos resultados mostram que as atividades das enzimas antioxidantes SOD e CAT foram reduzidas após aplicação do LBP na derme lesionada. É possível que essa modulação bioquímica ocorra devido a uma diminuição na resposta inflamatória e consequentemente uma diminuição das ERO. A SOD desempenha um papel importante na defesa contra estresse oxidativo por converter o ânion superóxido na forma menos bioativa o peróxido de hidrogênio (Halliwell e Gutteridge, 2007). A SOD é uma enzima que pode ser induzida e sua atividade depende das concentrações de ânion superóxido. Como o LBP diminuiu a peroxidação lipídica e a carbonilação proteica devido a seus efeitos antioxidantes, a diminuição na atividade da SOD observada nos grupos com LBP pode ser indicativo da redução do estresse oxidativo no tecido (Shukla, 1997). A CAT é uma enzima de defesa amplamente distribuída que catalisa a transferência de peróxido de hidrogênio a água e oxigênio (Halliwell e Gutteridge, 2007). A atividade da CAT teve uma redução significativa no tratamento com LBP podendo ser relacionado com a redução na geração de ERO.

Recentemente, muita ênfase vem sendo dada sobre a aplicação do LBP com o objetivo de acelerar as reações celulares, deste modo contribuindo para uma resolução significativamente mais eficiente da ferida (Busnardo e cols., 2010; Hussein e cols., 2011). Sugerimos que a LBP apresenta efeitos benéficos no processo de cicatrização de ferida, provavelmente por acelerar a fase inflamatória e induzir a síntese de colágeno, particularmente com o laser HeNe com as 1 e 3 J/cm<sup>2</sup> e AsGa com dose de 3 J/cm<sup>2</sup>.

No próximo grupo de experimentos usamos um modelo de lesão muscular traumática em ratos para avaliar a influência do LBP sobre parâmetros de estresse oxidativo e mediadores inflamatórios na área lesada. Primeiramente, avaliamos se o modelo de lesão induz alterações em parâmetros de estresse oxidativo 2, 12 e 24 horas após a lesão e, como podemos observar na Figura 16 todos os parâmetros analisados tiveram um aumento significativo nesses períodos. Esse modelo reproduz a maioria das lesões musculares traumáticas descritas, em que é gerada uma resposta inflamatória caracterizada por modificações na estrutura muscular, aumentando o edema intercelular e um infiltrado inflamatório com alta concentração de macrófagos e neutrófilos até 5 dias após a lesão, induzindo estresse oxidativo (Huard e cols., 2003; Powers e cols., 2011).

LBP tem demonstrado ser efetivo na redução da resposta inflamatória, promoção de reparo tecidual, diminuição de dor e redução de fadiga em vários estudos com modelos animais e estudos clínicos (Douris e cols., 2006; Leal Junior e cols., 2010; Servetto e cols., 2010; Chen e cols., 2011). A irradiação com o laser AsGa (904 nm) com picos altos de potência parece ter mais sucesso em lesões musculares do que densidades baixas de energia em comprimentos de onda infravermelhos (780 – 860 nm), para o qual as saídas são contínuas (Enwemeka e cols., 2001; Bjordal e cols., 2001 e 2003). Isso se reflete também nas recomendações de dosagem baseadas em evidências para distúrbios osteomusculares publicados pela Associação Mundial de Terapia a Laser (2006), nas quais densidades baixas de energia são recomendadas para o uso de laser com comprimento de onda de 904 nm.

Devido a isso, decidimos investigar os efeitos do LBP com início de tratamento 2, 12 e 24 horas após a indução de lesão muscular com duas doses 3 e 5 J/cm<sup>2</sup>, e com duração de 5 dias sobre parâmetros de estresse oxidativo. Como podemos observar os grupos que iniciaram o tratamento 2 horas após a lesão na dose de 3 e 5 J/cm<sup>2</sup> tiveram uma diminuição significativa em relação aos animais com lesão muscular em todos os parâmetros de estresse oxidativo analisados, mostrando que a redução do estresse oxidativo pode ser induzido precocemente. Isto provavelmente repercutirá melhor na recuperação do tecido lesado.

Decidimos utilizar a dose de 3 J/cm<sup>2</sup> com início das irradiações 2 horas após a lesão, nos experimentos seguintes. Desta forma, o próximo grupo de experimentos avaliou a influência do LBP a sobre a concentração de nitrito no tecido muscular lesado, e no plasma. Foram avaliados dois marcadores de oxidação proteica, os produtos proteicos de oxidação avançada (AOPPs) e ditirosina além do conteúdo de nitrito (Figura 7). (Karu e cols., 2005; Abdel e cols., 2007).

Como mostrado na Figura 17, podemos observar que a lesão muscular induziu um aumento nos marcadores de oxidação proteica (AOPP e ditirosina) e no conteúdo de NO no plasma e no tecido muscular lesado, e a irradiação com LBP teve uma redução significativa. Acreditamos que a LBP induziu uma diminuição na oxidação de proteínas no plasma devido a redução na produção de ERO e ERN no local da lesão, como mostra nos resultados com nitrito. Durante a inflamação, ocorre o aumento da expressão do óxido nítrico sintase 2 e geração de NO induzindo um estresse oxidativo local, podendo amplificar a lesão e modificar a estrutura e funcionalidade de proteínas e lipídeos na membrana celular. Essas alterações podem levar a mudanças em vias de sinalização que vão exacerbar a resposta inflamatória (Shi e



cols., 2006; Filippin e cols., 2011). O LBP induziu uma redução no estresse oxidativo e consequentemente diminuição de lesões teciduais adicionais causadas por essas espécies. Além disso, os resultados sugerem que o LBP tem um efeito biológico positivo modulando o estado redox e acelerando a recuperação do tecido lesado (Albertini e cols., 2007; Lindgard, 2007; Servetto e cols., 2010; Assis e cols., 2012; Qiu e cols., 2013;).

Para entender melhor esse efeito do LBP, a seguir foi avaliada a expressão gênica de citocinas pró e anti-inflamatórias, como IL-6 e IL-10, respectivamente e VEGF e BDNF, que são liberados após a lesão muscular. Como mostrado na Figura 18, a lesão traumática aumentou a expressão gênica dessas proteínas (IL-6, VEGF e BDNF) e o grupo que recebeu o LBP teve uma redução significativa. Em relação às citocinas o laser induziu uma diminuição (IL-6) e um aumento (IL-10) da expressão genica, vários estudos propõem que esse efeito pode ser devido a diminuição na produção de NO e de ERO (Gomes e cols., 2012; Servetto e cols., 2010; Wu e cols., 2013; Laraia e cols., 2012). Cinco dias após a lesão traumática, o tecido muscular ainda está numa fase inflamatória aguda com muito edema, como consequência do infiltrado de macrófagos e neutrófilos (Tidball e cols., 2005). Uma característica desta situação é o aumento da expressão de VEGF devido ao rompimento dos sarcômeros e da estrutura vascular nas fibras musculares que consequentemente vão induzir um extravasamento sanguíneo e hipóxia local (Tang e cols., 2004). A região promotora do gene VEGF contem um elemento de resposta a hipóxia (HRE) que, quando ativado, induz a fosforilação de HIF-1 $\alpha$ , e quando isso acontece a transcrição de VEGF é aumentada (Forsythe e cols., 1996). Alguns estudos (Cohen e cols., 1996; Hellwig-Burgel e cols., 1999; Kosmidou e cols., 2001; Schafer e cols., 2003; Clark e cols., 2007) sugerem que existem outros mecanismos de ativação de VEGF no músculo, tais como moléculas inflamatórias, geração de ERO, estado energético e atividade da adenosina monofosfato cinase.

Outra alteração na lesão muscular é o aumento na expressão de BDNF no momento em que ocorre a ativação e proliferação das células satélites, sugerindo que o BDNF desempenha um papel importante na mediação da resposta celular satélite, principalmente na resposta aguda (Griesbeck e cols. 1995; Omura e cols., 2005). Conforme Tidball (2005) o BDNF tem um papel similar a outras citocinas inflamatórias (IL-6 e TGF-  $\beta$ ) na regulação da regeneração muscular. Além disso, células imunes derivadas de BDNF são uma importante fonte de BDNF durante a lesão e reparo muscular. Resultados similares foram encontrados em

neuropatias periféricas humanas, que demonstraram a expressão de BDNF que foi proporcional a extensão da invasão de células T e macrófagos (Sobue e cols., 1998, Clow e Jasmin, 2010).

Como mostrado na Figura 18 o laser induziu uma diminuição na expressão gênica dessas proteínas (VEGF e BDNF) demonstrando um efeito anti-inflamatório que pode ser justificado, hipoteticamente, devido ao estímulo no metabolismo local e aceleração do processo inflamatório agudo.

Para confirmar tal hipótese decidimos analisar parâmetros comportamentais de atividade motora, como a distância percorrida e o número de levantamentos no teste de campo aberto. Podemos observar na Figura 19 que o grupo de animais tratado com LBP com dose de  $3 \text{ J/cm}^2$  iniciando a irradiação 2 horas após e irradiado por 5 dias, teve efeitos positivos nesses dois parâmetros. Demonstrando assim que a irradiação com LBP além de melhorar marcadores bioquímicos e moleculares também melhorou parâmetros comportamentais de função motora. Assim, podemos concluir que a dose de  $3 \text{ J/cm}^2$  com início de tratamento 2 horas após é a melhor dose nesse tipo de lesão.

Vários estudos *in vivo* sugerem que a aceleração do processo cicatricial favorecido pelo uso de LBP estaria relacionado ao aumento da atividade mitocondrial e do metabolismo local (Azevedo, e cols., 2006; Lubart e cols., 2006; Akyol and Gungormus, 2010). O objetivo deste terceiro grupo de experimentos foi investigar os efeitos bioestimulatórios em mitocôndrias musculares. Devido a isso, investigamos os efeitos da irradiação com o LBP HeNe em diferentes doses sobre a atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial. A Figura 20 mostra que houve um aumento na atividade do complexo I e IV 5 minutos após a irradiação, e também que a atividade do complexo IV aumentou após 1 hora. Isso está de acordo com alguns estudos (Yu e cols., 1997; Karu, 2010), que demonstram que a LBP acelera a transferência de elétrons na cadeia de respiratória, resultando num aumento do potencial elétrico da membrana mitocondrial, favorecendo dessa forma a síntese de ATP, alcalização do citoplasma e finalmente ativação de síntese de ácidos nucleicos para posterior proliferação celular (Karu, 2010).

O complexo I é o passo limitante na fosforilação oxidativa (Chinopoulos and Adam-Vizi, 2001). Além disso, alguma modificação ou estimulação deste complexo pode ter um direto impacto sobre o estado geral de energia da célula, como previamente descrito pelo nosso grupo (Glaser e cols., 2010; Moreira e cols., 2010; Figueiredo e col., 2011; Remor e cols., 2011). Isso pode estar relacionado à presença de

fotorreceptores principalmente no complexo I e IV da cadeia respiratória, como previamente proposto por Karu em células HeLa (Karu e cols., 2008). A fotoativação de componentes mitocondriais que são sensíveis à luz visível do laser pode causar uma curta ativação na cadeia respiratória e oxidação/redução do NADH e da citocromo *c* oxidase, levando a mudanças benéficas celulares no estado redox, de ambos citoplasma e mitocôndria, o qual podem incluir aumento na velocidade do ciclo de Krebs e produção adicional de ATP (Lubart e cols., 2005).

Trabalhos pioneiros de Karu e cols (Karu e cols., 2004, 2008) sugerem que moléculas podem agir como cromóforos endógenos podendo incluir porfirinas, flavinas, citocromos mitocondriais e o sistema NADPH oxidase da membrana plasmática, o qual, contem flavoproteínas e citocromo b (Lubart e cols., 2005). Em relação à citocromo *c* oxidase, foi demonstrado que a irradiação de células HeLa com LBP causa uma redução ou oxidação de seus fofosceptores Cu<sub>a</sub> e Cu<sub>b</sub> (Karu e cols., 2004).

Para demonstrar que o LBP induz uma estimulação mitocondrial e com isso um estado de alta energia, avaliamos seus efeitos no consumo de oxigênio de células musculares irradiadas. Os resultados mostram que as células irradiadas com 10 J/cm<sup>2</sup> necessitam uma concentração maior de FCCP no meio para atingir a respiração máxima, podendo ser relacionado a uma capacidade respiratória maior ou uma quantidade maior de mitocôndrias. O LBP com a mesma dose também aumentou a contribuição da ATP sintase na respiração basal e isso pode ser relacionado com aumento da atividade do complexo V mitocondrial, com conseqüente aumento nas concentrações de ATP. Alguns estudos com mitocôndrias e células irradiadas com comprimento de onda de 632, 725 e 904 nm mostram que o potencial de membrana mitocondrial, síntese de ATP e consumo de oxigênio podem ser estimulados pela irradiação (Karu, 2008 e 2010).

Morimoto e cols. (1994) também demonstraram que o LBP induz uma maior absorção de O<sub>2</sub> e com isso aumentando a atividade do citocromo *c* oxidase, estimulando a transferência de elétrons e o bombeamento de prótons dessa enzima. Conforme Hu e cols. (2007) e Masha (2013); o conteúdo de proteínas mitocondriais, a síntese de RNA mitocondrial e replicação do DNA mitocondrial são aumentadas pela irradiação com o LBP HeNe.

De modo geral, é provável que o efeito bioestimulatório do LBP esta associado ao aumento na atividade dos complexos da cadeia respiratória e na indução da transcrição de genes que codificam a síntese

desses complexos. Assim, estimulando o metabolismo energético e a fosforilação oxidativa aumentando a produção de ATP que pode acionar outros processos metabólicos que estão envolvidos na aceleração da cicatrização de lesões epiteliais e musculares.

## 6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados nesta tese de doutorado, podemos concluir que o laser HeNe aumenta a função mitocondrial, produção de colágeno e diminui parâmetros de estresse oxidativo, contribuindo positivamente na aceleração do processo cicatricial de lesões dérmicas. Do mesmo modo, o laser AsGa demonstrou propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias repercutindo assim na diminuição do *déficit* motor induzido pela lesão muscular traumática. Esses efeitos benéficos do LBP estão relacionados com um aumento na capacidade respiratória celular.



## **7 PERSPECTIVAS**

Alguns aspectos relacionados a este trabalho ainda precisam ser melhor elucidados.

Desta forma, algumas perspectivas são propostas ao final desta tese:

Investigar os efeitos do LBP em proteínas da cascata de sinalização da fase inflamatória aguda e crônica de lesões epiteliais e musculares para avaliar melhor os efeitos bioestimulatórios da irradiação.

Investigar os efeitos do LBP sobre fatores de transcrição específicos do músculo como MyoD, myogenin, Myf4 e Myf5 que são responsáveis pela regeneração muscular.

Realização de estudos com imunohistoquímica e citometria de fluxo para avaliar os efeitos da irradiação com LBP em macrófagos M1 e M2 na lesão muscular.





## 8 REFERÊNCIAS

ABDEL SE, ABDEL-MEGUID I, KORRAA S. Markers of oxidative stress and aging in Duchene muscular dystrophy patients and the possible ameliorating effect of He-Ne laser. *Acta Myol* 2007; 26: 14–21.

AEBI H. Catalase in vitro. *Meth Enzymol*. 1984; 105: 121-126.

AGNE T; JONES E. Eletrotermoterapia: teoria e prática. Ed. Orium, Rio Grande do Sul, 1ª edição, 2004.

AGUIAR AS JR, ARAÚJO AL, DA-CUNHA TR, SPECK AE, IGNÁCIO ZM, DE-MELLO N, PREDIGER RD. Physical exercise improves motor and short-term social memory deficits in reserpinized rats. *Brain Res Bull*. 2009; 79(6): 452-7.

AKYOL U, GÜNGÖRMÜŞ M. The effect of low-level laser therapy on healing of skin incisions made using a diode laser in diabetic rats. *Photomed Laser Surg*. 2010; 28(1): 51-5.

ALBERTINI R, VILLAVERDE AB, AIMBIRE F. Anti-inflammatory effects of low-level laser therapy (LLLT) with two different red wavelengths (660 nm and 684 nm) in carrageenan-induced rat paw edema. *J Photochem Photobiol B: Biol*. 2007; 89: 50–55.

ALBERTINI R, VILLAVERDE AB, AIMBIRE F, BJORDAL J, BRUGNERA A, MITTMANN J, SILVA JA, COSTA M. Cytokine mRNA expression is decreased in the subplantar muscle of rat paw subjected to carrageenan-induced inflammation after low-level laser therapy. *Photomed Laser Surg*. 2008; 26(1): 19-24.

ALBERTINI R, VILLAVERDE AB, AIMBIRE F. Anti-inflammatory effects of low-level laser therapy (LLLT) with two different red wavelengths (660 nm and 684 nm) in carrageenan-induced rat paw edema. *J Photochem Photobiol B: Biol*. 2007; 89: 50–55.

AL-WATBAN F, ANDRES B. Polychromatic LED therapy in burn healing of non-diabetic and diabetic rats. *J Clin Laser Med Surg*. 2003; 21: 249–258.

ASSIS L, MORETTI AI, ABRAHÃO TB, CURY V, SOUZA HP, HAMBLIN MR, PARIZOTTO NA. Low-level laser therapy (808 nm) reduces inflammatory response and oxidative stress in rat tibialis anterior muscle after cryolesion. *Lasers Surg Med.* 2012; 44(9): 726-35.

AZEVEDO LH, DE PAULA EDUARDO F, MOREIRA MS. Influence of different power densities of LILT on cultured human fibroblast growth : a pilot study. *Lasers Med Sci.* 2006; 21(2): 86-9.

BANNISTER JV, CALABRESE L. Assays for SOD. *Meth Biochem Anal.* 1987; 32: 279-312.

BAPTISTA J, MARTINS MD, PAVESI VC, BUSSADORI SK, FERNANDES KP, PINTO JÚNIOR DDOS S, FERRARI RA. Influence of laser photobiomodulation on collagen IV during skeletal muscle tissue remodeling after injury in rats. *Photomed Laser Surg.* 2011; 29(1): 11-7.

BARATTO L, CALZÀ L, CAPRA R, GALLAMINI M, GIARDINO L, GIULIANI A, LORENZINI L, TRAVERSO S. Ultra-low-level laser therapy. *Lasers Med Sci.* 2011; 26(1): 103-12.

BAR-SHAI M, CARMELI E, LJUBUNCIC P, REZNICK AZ. Exercise and immobilization in aging animals: the involvement of oxidative stress and NF-kappaB activation. *Free Radic Biol Med.* 2008; 44(2): 202-14.

BASSO FG, OLIVEIRA CF, KURACHI C, HEBLING J, COSTA CA. Biostimulatory effect of low-level laser therapy on keratinocytes in vitro. *Lasers Med Sci.* 2012, *in press.*

BEATON LJ, TARNOPOLSKY MA, PHILLIPS SM. Variability in estimating eccentric contraction-induced muscle damage and inflammation in humans. *Can J Appl Physiol.* 2002; 27(5): 516-26.

BEAUVOIT B, KITAI T, CHANCE B. Contribution of the mitochondrial compartment to the optical properties of the rat liver: a theoretical and practical approach. *Biophys J.* 1994; 67: 2501–2510.

BJORDAL J, COUPPÉ C, LJUNGGREEN A. Low level laser therapy for tendinopathy. Evidence of a dose-response pattern. *Phys Ther Rev*. 2001; 6: 91–99.

BROUGHTON G, 2ND, JANIS JE, ATTINGER CE. The basic science of wound healing. *Plast Reconstr Surg* 2006; 117(7): 12-34.

BUSNARDO VL, BIONDO-SIMÕES MLP. Effects of low-level helium-neon laser on induced wound healing in rats. *Rev Bras Fisioter*. 2010; 14: 45-51.

BYRNES KR, BARNA L, CHENAULT VM e cols. Photobiomodulation improves cutaneous wound healing in an animal model of type II diabetes. *Photomed Laser Surg*. 2004; 22: 281–290.

CARREL A. The treatment of wounds. *JAMA*. 1910; 55: 2148.

Carvalho PTC, Mazzer N, Reis FA. Analysis of the influence of low-power HeNe laser on the healing of skin wounds in diabetic and non-diabetic rats. *Acta Cir Bras*. 2006; 21:177–183.

Cassina A, Radi R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxyntirite on mitochondrial electron transport. *Arch Biochem Biophys*. 1996; 328: 309-316.

CHAEA SY. Protection of insulin secreting cells from nitric oxide induced cellular damage by crosslinked hemoglobin. *Biomaterials*. 2004; 25: 843–50.

CHEN AC, ARANY PR, HUANG YY, TOMKINSON EM, SHARMA SK, KHARKWAL GB, SALEEM T, MOONEY D, YULL FE, BLACKWELL TS, HAMBLIN MR. Low-level laser therapy activates NF-kB via generation of reactive oxygen species in mouse embryonic fibroblasts. *PloS ONE*. 2011; 6(7): 22453.

CATÃO MH. Os benefícios do laser de baixa intensidade na clínica odontológica na estomatologia. *Rev Bras Patol Oral*. 2004; 3: 214-8.

CAVALCANTI TM, ALMEIDA-BARROS RQ, CATÃO MH, FEITOSA AP, LINS RD. Knowledge of the physical properties and

interaction of laser with biological tissue in dentistry. *An Bras Dermatol.* 2011; 86: 955-60.

CHINOPOULOS C, ADAM-VIZI V. Mitochondria deficient in complex I activity are depolarized by hydrogen peroxide in nerve terminals: relevance to Parkinson's disease. *J Neurochem.* 2001; 76: 302-306.

CLARK AN, YOUKEY R, LIU X, JIA L, BLATT R, DAY YJ, SULLIVAN GW, LINDEN J, TUCKER AL. A1 adenosine receptor activation promotes angiogenesis and release of VEGF from monocytes. *Circ Res.* 2007; 101: 1130–1138.

CLARK RAF. Wound repair. In: Kumar, Robbins, Cotran: *Pathologic Basis of Disease.* 2005; 112.

CLOW C, JASMIN BJ. Brain-derived neurotrophic factor regulates satellite cell differentiation and skeletal muscle regeneration. *Mol Biol Cell.* 2010; 121(13): 2182-90.

COHEN T, NAHARI D, CEREM LW, NEUFELD G, LEVI BZ. Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem.* 1996; 271: 736–741.

COOPER CE, COPE M, QUARESIMA V, FERRARI M, NEMOTO E, SPRINGETT R, MATCHER S, AMESS P, PENRICE J, TYSZCZUK L, WYATT J, DELPY DT. Measurement of cytochrome oxidase redox state by near infrared spectroscopy. *Adv Exp Med Biol.* 1997; 413: 63-73.

COOPER CE, SPRINGETT R. Measurement of cytochrome oxidase and mitochondrial energetics by near-infrared spectroscopy. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1997; 352: 669–676.

CROISIER JL, FORTHOMME B, NAMUROIS MH, VANDERTHOMMEN M, CRIELAARD JM. Hamstring muscle strain recurrence and strength performance disorders. *Am J Sports Med.* 2002; 30(2): 199-203,.

DA SILVA JP, DA SILVA MA, ALMEIDA AP, LOMBARDI JUNIOR I, MATOS AP. Laser therapy in the tissue repair process: a literature review. *Photomed Laser Surg.* 2010; 28(1): 17-21.

DA SILVA L, CARVALHO E, CRUZ MT. Role of neuropeptides in skin inflammation and its involvement in diabetic wound healing. *Expert Opin Biol Ther.* 2010; 10(10): 1427-39.

DALL AGNOL MA, NICOLAU RA, DE LIMA CJ, MUNIN E. Comparative analysis of coherent light action (laser) versus non-coherent light (light-emitting diode) for tissue repair in diabetic rats. *Lasers Med Sci.* 2009; 24: 909-16.

DAY JW, SAKAMOTO C, PARRY GJ, LEHMANN-HORN F, IAIZZO PA. Force assessment in periodic paralysis after electrical muscle stimulation. *Mayo Clin Proc.* 2002; 77(3): 232-40.

DE LIMA FM, VILLAVERDE AB, ALBERTINI R, CORRÊA JC, CARVALHO RL, MUNIN E, ARAÚJO T, SILVA JA, AIMBIRE F. Dual Effect of low-level laser therapy (LLLT) on the acute lung inflammation induced by intestinal ischemia and reperfusion: Action on anti- and pro-inflammatory cytokines. *Lasers Surg Med.* 2011; 43(5): 410-20.

DI DONATO S. Disorders related to mitochondrial membranes: pathology of the respiratory chain and neurodegeneration. *J Inherit Metab Dis.* 2000; 23: 247-263.

DOURIS P, SOUTHARD V, FERRIGI R, GRAUER J, KATZ D, NASCIMENTO C, PODBIELSKI P. Effect of phototherapy on delayed onset muscle soreness. *Photomed Laser Surg.* 2006; 24(3): 377-382.

DRAPER HH, HADLEY M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Meth Enzymol.* 1990; 186: 421-431.

DVORAK HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol.* 2002; 20: 4368-80.

EELLS JT, WONG-RILEY MT, VERHOEVE J, HENRY M, BUCHMAN EV, KANE MP, GOULD LJ, DAS R, JETT M,

HODGSON BD, MARGOLIS D, WHELAN HT. Mitochondrial signal transduction in accelerated wound and retinal healing by near-infrared light therapy. *Mitochondrion*. 2004; 4(5-6): 559-67.

EMING SA, KRIEG T, DAVIDSON JM. Gene therapy and wound healing. *Clin Dermatol*. 2007; 25: 79-92.

ENWEMEKA CS. Attenuation and penetration depth of red 632.8 nm and invisible infrared 904 nm light in soft tissues. *Laser Therapy*. 2001; 13: 95-101.

FIGUEIREDO CP, BICCA MA, LATINI A, PREDIGER RD, MEDEIROS R, CALIXTO JB. Folic acid plus alpha-tocopherol mitigates amyloid-beta-induced neurotoxicity through modulation of mitochondrial complexes activity. *J Alzheimers Dis*. 2011; 24: 61-75.

FILIPPIN LI, CUEVAS MJ, LIMA E, MARRONI NP, GONZALEZ-GALLEGO J, XAVIER RM. The role of nitric oxide during healing of trauma to the skeletal muscle. *Inflamm Res*. 2011; 60(4): 347-356.

FLOHÉ L, GÜNZLER WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*. 1984; 105: 114-21.

FORSYTHE J, JIANG B, IYER N, AGANI F, LEUNG S, KOOS R, SEMENZA G.. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 4604-4613.

FRENETTE J, CAI B, JG. Complement activation promotes muscle inflammation during modified muscle use. *Am J Pathol*. 2000; 156(6): 2103-10.

FUKUSHIMA K, BADLANI N, USAS A e cols. The use of antifibrosis agent to improve muscle recovery after laceration. *Am J Sports Med*. 2001; 29: 394.

FUKUSHIMA K, BADLANI N, USAS A, RIANO F, FU F, HUARD J. The use of an antifibrosis agent to improve muscle recovery after laceration. *Am J Sports Med*. 2001; 29(4): 394-402.

Funchal C, Latini A, Jacques-Silva MC, Dos Santos AQ, Buzin L, Gottfried C, Wajner M, Pessoa-Pureur R. Morphological alterations and induction of oxidative stress in glial cells caused by the branched-chain alpha keto acids accumulating in maple syrup urine disease. *Neurochem Int.* 2006; 49: 640-650.

GAO X, XING D. Molecular mechanisms of cell proliferation induced by low power laser irradiation. *J Biomed Sci.* 2009; 12(4): 16.

GARRETT WJ. Muscle strain injuries. *Am J Sports Med.* 1996; 24:2-8.  
GILLITZER R, GOEBELER M. Chemokines in cutaneous wound healing. *J Leukoc Biol.* 2001; 69: 513–521

GIULIANI A, LORENZINI L, GALLAMINI M, MASSELLA A, GIARDINO L, CALZA L. Low infra red laser light irradiation on cultured neural cells: effects on mitochondria and cell viability after oxidative stress. *BMC Complement Altern Med.* 2009; 9(8): 29-33.

GLASER V, NAZARI EM, MULLER YM, FEKSA L, WANNMACHER CM, ROCHA JB, DE BEM AF, FARINA M, LATINI A. Effects of inorganic selenium administration in methylmercury-induced neurotoxicity in mouse cerebral cortex. *Int J Dev Neurosci.* 2010; 28: 631-637.

GNAIGER E. Bioenergetics at low oxygen: dependence of respiration and phosphorylation on oxygen and adenosine diphosphate supply. *Respir Physiol.* 2001; 128: 277-297.

GOMES LE, DALMARCO EM, ANDRÉ ES. The brain-derived neurotrophic factor, nerve growth factor, neurotrophin-3, and induced nitric oxide synthase expressions after low-level laser therapy in an axonotmesis experimental model. *Photomed Laser Surg.* 2012; 30(11): 642-7

GRIESBECK O, PARSADANIAN AS, SENDTNER M, THOENEN H. Expression of neurotrophins in skeletal muscle: quantitative comparison and significance of motoneuron survival and maintenance of function. *J Neurosci Res.* 1995; 42(1): 21-33.

GUPTA S, PURCELL NH, LIN A, SEN S. Activation of nuclear factor-kappaB is necessary for myotrophin-induced cardiac hypertrophy. *J Cell Biol.* 2002; 159(6): 1019-28.

HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC. *Free Radical in Biology Medicine*, University Oxford, NY. 2007

HALLIWELL B. Free radicals, proteins and DNA: oxidative damage versus redox regulation. *Biochem Soc Trans.* 1996; 24(4): 1023-7.

HEGER M, HEEMSKERK AA, VAN DER ZWAN G. Absence of 633-nm laser irradiation-induced effects on glucose phosphorylation by hexokinase. *J Photochem Photobiol B.* 2010; 98: 216-222.

HELLWIG-BURGEL T, RUTKOWSKI K, METZEN E, FANDREY J, JELKMANN W. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor- alpha stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1. *Blood.* 1999; 94: 1561–1567.

HENRY G, WARREN L, GARNER MD. Inflammatory mediators in wound healing. *Surg Clin N Am.* 2003; 83: 483–507.

HU W-P, WANG JJ, YU C-L, LAN CE, CHEN ND, YU HS. He-Ne laser irradiation stimulates cell proliferation through photostimulatory effects in mitochondria. *J. Invest. Dermatol.* 2007; 127: 2048–2057.

HUARD J, CAO B, QU-PETERSEN Z. Muscle-derived stem cells: potential for muscle regeneration. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2003; 69(3): 230-7.

HUGHES BP. A method for the estimation of serum creatine kinase and its use in comparing creatine kinase and aldolase activity in normal and pathological condition. *Clin Chim Acta.* 1962; 7: 597-603.

HUGHES C, HASSELMAN CT, BEST TM, MARTINEZ S, GARRETT WE. Incomplete, intrasubstance strain injuries of the rectus femoris muscle. *Am J Sports Med.* 1995; 23(4): 500-6.

HUSSEIN AJ, ALFARS AA, FALIH MA, HASSAN AN. Effects of a low level laser on the acceleration of wound healing in rabbits. *N Am J Med Sci.* 2011; 3(4): 193-7.



JÄRVINEN TA, JÄRVINEN TL, KÄÄRIÄINEN M, KALIMO H, JÄRVINEN M. Muscle injuries: biology and treatment. *Am J Sports Med.* 2005; 33(5): 745-64.

JÄRVINEN TA, JÄRVINEN TL, KÄÄRIÄINEN M, KALIMO H, JÄRVINEN M. Muscle injuries: biology and treatment. *Am J Sports Med.* 2005; 33(5): 745-64.

JIANG L, SAETRE P, RADOMSKA KJ, JAZIN E, LINDHOLM CARLSTROM E. QKI-7 regulates expression of interferon-related genes in human astrocyte glioma cells. *PLoS ONE.* 2010; 5: 1307.

KANTA J. The role of hydrogen peroxide and other reactive oxygen species in wound healing. *Acta Medica (Hradec Kralove).* 2011; 54(3): 97-101.

KANTA J. The role of hydrogen peroxide and other reactive oxygen species in wound healing. *Acta Medica (Hradec Kralove).* 2011; 54(3): 97-101.

KARU T, PYATIBRAT L, AFANASYEVA N. Cellular effects of low power therapy can be mediated by nitric oxide. *Lasers Surg Med.* 2005; 36: 307–314.

KARU T. Mitochondrial mechanisms of photobiomodulation in context of new data about multiple roles of ATP. *Photomed Laser Surg.* 2010; 28(2): 159-60.

KARU T. Mitochondrial mechanisms of photobiomodulation in context of new data about multiple roles of ATP. *Photomed Laser Surg.* 2010; 28: 159-160.

KARU T. Photobiological fundamentals of low-power laser therapy. *IEEE J Quantum Electron.* 1987; 23: 1703–1717.

KARU T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *J. Photochem. Photobiol.* 1999; 49: 1-17.

KARU T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *J Photochem Photobiol B: Biol.* 1999; 49: 1–17.

KARU TI, AFANASEVA NI, KOLI'IAKOV SF, PIATIBRAT LV. Change in the absorption spectrum of a monolayer of live cells under low-intensity laser irradiation. *Dokl Akad Nauk.* 1998; 360: 267-270.

KARU TI, AFANAS'eva NI, KOLI'IAKOV SF, PIATIBRAT LV. Change in the absorption spectrum of a monolayer of live cells under low-intensity laser irradiation. *Dokl Akad Nauk.* 1998; 360(2): 267-70.

KARU TI, PYATIBRAT LV, KALENDO GS. Photobiological modulation of cell attachment via cytochrome c oxidase. *Photochem Photobiol. Sci.* 2004; 3(2): 211-6.

KARU TI, PYATIBRAT LV, KALENDO GS. Photobiological modulation of cell attachment via cytochrome c oxidase. *Photochem Photobiol Sci.* 2004; 3: 211-216.

KARU TI, PYATIBRAT LV, KOLYAKOV SF, AFANASYEVA NI. Absorption measurements of cell monolayers relevant to mechanisms of laser phototherapy: reduction or oxidation of cytochrome c oxidase under laser radiation at 632.8 nm. *Photomed Laser Surg.* 2008; 26(6): 593-9.

KARU TI, PYATIBRAT LV, KOLYAKOV SF, AFANASYEVA NI. Absorption measurements of cell monolayers relevant to mechanisms of laser phototherapy: reduction or oxidation of cytochrome c oxidase under laser radiation at 632.8 nm. *Photomed Laser Surg.* 2008; 26: 593-599.

KARU TI, PYATIBRAT LV, KOLYAKOV SF, AFANASYEVA NI. Absorption measurements of cell monolayers relevant to mechanisms of laser phototherapy: reduction or oxidation of cytochrome c oxidase under laser radiation at 632.8 nm. *Photomed Laser Surg.* 2008; 26: 593-599.

KASEMKIJWATTANA C, MENETREY J, BOSCH P, SOMOGYI G, MORELAND MS, FU FH, BURANAPANITKIT B, WATKINS SS,

HUARD J. Use of growth factors to improve muscle healing after strain injury. *Clin Orthop Relat Res.* 2000; 370: 272-85.

KASEMKIJWATTANA C, MENETREY J, SOMOGLY G, MORELAND MS, FU FH, BURANAPANITKIT B, WATKINS SC, HUARD J. Development of approaches to improve the healing following muscle contusion. *Cell Transplant.* 1998; 7(6): 585-98.

KERKWEIG U, PETRAT F, KORTH HG. Disruption of skeletal myocytes initiates superoxide release: contribution of NAD(P)H oxidase. *Shock.* 2007; 27: 552-558.

Kirschbaum B. Correlative studies of urine fluorescence and free radical indicators. *Clin Nephrol.* 2002; 58: 344-349.

KITCHEN S; BAZIN S. *Eletroterapia de Clayton*. Editora Manole, São Paulo, 10ª edição. 1998.

KOSMIDOU I, XAGORARI A, ROUSSOS C, PAPAPETROPOULOS A. Reactive oxygen species stimulate VEGF production from C(2)C(12) skeletal myotubes through a PI3K/Akt pathway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001; 280: 585-592.

LAPCHAK PA, DE TABOADA L. Transcranial near infrared laser treatment (NILT) increases cortical adenosine-5'-triphosphate (ATP) content following embolic strokes in rabbits. *Brain Res.* 2010; 1306: 100-105.

LARAIA EM, SILVA IS, PEREIRA DM, DOS REIS FA, ALBERTINI R, DE ALMEIDA P, LEAL JUNIOR EC, TARSO DE, CAMILLO KL, DE CARVALHO P. Effect of low-level laser therapy (660 nm) on acute inflammation induced by tenotomy of Achilles tendon in rats. *Photochem Photobiol.* 2012; 88(6): 1546-50.

Latini A, Rodriguez M, Borba Rosa R, Scussiato K, Leipnitz G, Reis AD, da Costa FG, Funchal C, Jacques-Silva MC, Buzin L, Giugliani R, Cassina A, Radi R, Wajner M. 3-Hydroxyglutaric acid moderately impairs energy metabolism in brain of young rats. *Neuroscience.* 2005; 135: 111-120.

LAWRENCE WT, DIEGELMANN RF. Growth factors in wound healing. *Clin Dermatol*. 1994; 12(1): 157-69.

LEAL JUNIOR EC, LOPES-MARTINS RA, FRIGO L, DE MARCHI T, ROSSI RP, DE GODOI V, TOMAZONI SS, SILVA DP, BASSO M, FILHO PL, DE VALLS CORSETTI F, IVERSEN VV, BJORDAL JM. Effects of low-level laser therapy (LLLT) in the development of exercise-induced skeletal muscle fatigue and changes in biochemical markers related to postexercise recovery. *J Orthop Sports Phys Ther*. 2010; 40(8): 524–532.

LEVINE RL, GARLAND D, OLIVER CN. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Meth Enzymol*. 1990; 186: 464-478.

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: 193–199.

LI W, DASGEB B, PHILLIPS T, LI Y, CHEN M, GARNER W, WOODLEY DT. Wound healing perspectives. *Dermatol Clin*. 2005; 23(2): 181-92.

LI W, DASGEB B, PHILLIPS T, LI Y, CHEN M, GARNER W, WOODLEY DT. Wound healing perspectives. *Dermatol Clin*. 2005; 23(2): 181-92.

LIANG HL, WHELAN HT, EELLS JT, WONG-RILEY MT. Near-infrared light via light-emitting diode treatment is therapeutic against rotenone- and 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced neurotoxicity. *Neuroscience*. 2008; 153: 963-974.

LIANG HL, WHELAN HT, EELLS JT, WONG-RILEY MT. Near-infrared light via light-emitting diode treatment is therapeutic against rotenone- and 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced neurotoxicity. *Neuroscience*. 2008; 153: 963-974.

LINDGARD A, HULTE N LM, SVENSSON L, SOUSSI B. Irradiation at 634nm releases nitric oxide from human monocytes. *Lasers Med Sci*. 2007; 22: 30–36.

LINS RD, DANTAS EM, LUCENA KC, CATÃO MH, GRANVILLE-GARCIA AF, CARVALHO NETO LG. Biostimulation effects of low-power laser in the repair process. *An Bras Dermatol.* 2010; 85(6): 849-55.

LIU X, ZHOU Y, LIU TC. Effects of low-level laser irradiation on rat skeletal muscle injury after eccentric exercise. *Photomed Laser Surg.* 2009; 27: 863-869.

LONGAKER MT, PELED ZM, CHANG J, KRUMMEL TM. Fetal wound healing: progress report and future directions. *Surgery.* 2001; 130(5): 785-7.

LORENA D, UCHIO K, COSTA AM, DESMOLIERE A. Normal scarring: importance of myofibroblasts. *Wound Repair Regen.* 2002; 10(2): 86-92.

LOWRY OH, ROSEBOUGH NG, FARR AL. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193: 265-275.

LU H, HUANG D, RANSOHOFF RM, ZHOU L. Acute skeletal muscle injury: CCL2 expression by both monocytes and injured muscle is required for repair. *FASEB J.* 2011; 25(10): 3344-55.

LUBART R, EICHLER M, LAVI R, FRIEDMAN H, SHAINBERG A. Low-energy laser irradiation promotes cellular redox activity. *Photomed Laser Surg.* 2005; 23: 3-9.

LUBART R, LAVI R, FRIEDMANN H, ROCHKIND S. Photochemistry and photobiology of light absorption by living cells. *Photomed Laser Surg.* 2006; 24: 179-185.

MACINTYRE DL, REID WD, LYSTER DM, MCKENZIE DC. Different effects of strenuous eccentric exercise on the accumulation of neutrophils in muscle in women and men. *Eur J Appl Physiol.* 2000; 81(1-2): 47-53.

MARTIN P. Wound healing - aiming for perfect skin regeneration. *Science.* 1997; 276(5309): 75-81.

MASHA RT, HOURELD NN, ABRAHAMSE H. Low-Intensity Laser Irradiation at 660 nm Stimulates Transcription of Genes Involved in the Electron Transport Chain. *Photomed Laser Surg.* 2013; 31(2): 47-53.

MBEBI C, HANTAÏ D, JANDROT-PERRUS M, DOYENNETTE MA, VERDIÈRE-SAHUQUÉ M. Protease nexin I expression is up-regulated in human skeletal muscle by injury-related factors. *J Cell Physiol.* 1999; 179(3): 305-14.

MEDEIROS JL, NICOLAU RA, NICOLA EM, DOS SANTOS JN, PINHEIRO AL. Healing of Surgical Wounds Made with lambda970-nm Diode Laser Associated or Not with Laser Phototherapy (lambda 655 nm) or Polarized Light (lambda 400-2000 nm). *Photomed Laser Surg.* 2010; 28: 489-96.

MENDONÇA PE. O Laser na biologia. *Rev Bras Ens Fis.* 1998; 20: 86-94.

MESQUITA-FERRARI RA, MARTINS MD, SILVA JA JR, DA SILVA TD, PIOVESAN RF, PAVESI VC, BUSSADORI SK, FERNANDES KP. Effects of low-level laser therapy on expression of TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$  in skeletal muscle during the repair process. *Lasers Med Sci.* 2011; 26(3): 335-40.

MESTER E, SPIRY T, SZENDE B, TOTA JG. Effect of laser rays on wound healing. *Am J Surg.* 1971; 122, 532-535.

MOREIRA EL, RIAL D, AGUIAR ASJR, FIGUEIREDO CP, SIQUEIRA JM, DALBO S, HORST H, DE OLIVEIRA J, MANCINI G, DOS SANTOS TS, VILLARINHO JG, PINHEIRO FV, MARINONETO J, FERREIRA J, DE BEM AF, LATINI A, PIZZOLATTI G, RIBEIRO-DO-VALLE RM, PREDIGER RD.. Proanthocyanidin-rich fraction from *Croton celtidifolius* Baill confers neuroprotection in the intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine rat model of Parkinson's disease. *J Neural Transm.* 2010; 117: 1337-1351.

MORIMOTO Y, ARAI T, KIKUCHI M, NAKAJAMA N, NAKAMURA H. Effect of low-intensity argon laser irradiation on mitochondrial respiration. *Lasers Surg. Med.* 1994; 15: 191-199.

MORRONE A, GUZZARDELA GA, ORIENTI L, GIAVARESI G, FINI M. Muscular trauma treated with a Ga-Al-As diode laser: in vivo experimental study. *Lasers Med. Sci.* 1998; 13: 293-298.

Morrone ET. Muscular trauma treated with a Ga-Al-As diode laser: in vivo experimental study. *Lasers Med Sci.* 1998; 13: 293-298.

MORRONE G, GUZZARDELLA GA, ORIENTI L. Muscular trauma treated with a Ga-Al-As diode laser: In vivo experimental study. *Lasers Med Sci.* 1998; 13: 293-298.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J Immunol Methods.* 1983; 65: 55-63.

MUSALMAH M, FAIRUZ AH, GAPOR MT e cols. Effect of vitamin E on plasma Malondialdehyde, antioxidant enzyme levels and the rates of wound closures during wound healing in normal and diabetic rats. *Asia Pacific J Clin Nurt.* 2002; 11: 448- 451

MUSALMAH M, FAIRUZ AH, GAPOR MT e cols. Effect of vitamin E on plasma malondialdehyde, antioxidant enzyme levels and the rates of wound closures during wound healing in normal and diabetic rats. *Asia Pacific J Clin Nurt.* 2002; 11: 448-451.

NELSON D, COX MM. *Lehninger Principles of Biochemistry.* 2004

NOGUEIRA GT, MESQUITA-FERRARI RA, SOUZA NH, ARTILHEIRO PP, ALBERTINI R, BUSSADORI SK, FERNANDES KP. Effect of low-level laser therapy on proliferation, differentiation, and adhesion of steroid-treated osteoblasts. *Lasers Med Sci.* 2011, in press.

OMURA T, SANO M, OMURA K, HASEGAWA T, DOI M, SAWADA T, NAGANO A. Different expressions of BDNF, NT3 and NT4 in muscle and nerve after various types of peripheral nerve injuries. *J Peripher Nerv Syst.* 2005; 10(3): 293-300

ORCHARD J, BEST TM. The management of muscle strain injuries: an early return versus the risk of recurrence. *Clin J Sport Med.* 2002; 12(1): 3-5.

ORTIZ M; SANDOVAL C. Laser de baixa intensidade: princípios e generalidades – Parte 1. Fisio Bras. 2001; 23: 87-92.

P. Rustin D, Chretien T, Bourgeron B, Gerard AR, Saudubray V. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. Clin Chem Acta. 1994; 228: 35–51.

PAONI NF, PEALE F, WANG F, ERRETT-BARONCINI C, STEINMETZ H, TOY K, BAI W, WILLIAMS PM, BUNTING S, GERRITSEN ME, POWELL-BRAXTON L. Time course of skeletal muscle repair and gene expression following acute hind limb ischemia in mice. Physiol Genomics. 2002; 11(3): 263-72.

PARK JE, BARBUL A. Understanding the role of immune regulation in wound healing. Am J Surg. 2004; 187: 11-6.

PASSARELLA S, CASAMASSIMA F, MOLINARI S e cols. Increase of proton electrochemical potential and ATP synthesis in rat liver mitochondria irradiated in vitro by He-Ne laser. FEBS Lett. 1984; 175: 95–99.

PASTORINO JG, HOEK JB.. Hexokinase II: the integration of energy metabolism and control of apoptosis. Curr Med Chem. 2003; 10: 1535-1551.

PASTORINO JG, HOEK JB.. Hexokinase II: the integration of energy metabolism and control of apoptosis. Curr Med Chem. 2003; 10: 1535-1551.

PATTWELL DM, JACKSON MJ. Contraction-induced oxidants as mediators of adaptation and damage in skeletal muscle. Exerc Sport Sci Rev. 2004; 32: 14–18.

PEPLOW PV, CHUNG TY, RYAN B, BAXTER GD. Laser photobiomodulation of gene expression and release of growth factors and cytokines from cells in culture: a review of human and animal studies. Photomed Laser Surg. 2011; 29(5): 285-304.

PEREIRA LM, HATANAKA E, MARTINS EF e cols. Effect of oleic and linoleic acids on the inflammatory phase of wound healing in rats. Cell Biochem Funct. 2008; 26: 197–204.



PIRES D, XAVIER M, ARAÚJO T, SILVA JA JR, AIMBIRE F, ALBERTINI R. Low-level laser therapy (LLLT; 780 nm) acts differently on mRNA expression of anti- and pro-inflammatory mediators in an experimental model of collagenase-induced tendinitis in rat. *Lasers Med Sci.* 2011; 26(1): 85-94.

POLI G, PAROLA M. Oxidative damage and fibrogenesis. *Free Radic Biol Med.* 1997; 22: 287.

POWERS SK, TALBERT EE, ADHIHETTY PJ. Reactive oxygen and nitrogen species as intracellular signals in skeletal muscle. *J Physiol.* 2011; 589: 2129-38.

PRADO RP, PINFILDI CE, LIEBANO RE, HOCHMAN BS, FERREIRA LM. Effect of application site of low-level laser therapy in random cutaneous flap viability in rats. *Photomed Laser Surg.* 2009; 27(3): 411-6.

QIU Z, LI J, ZHANG M, BI Z, LI Z. He-Ne laser pretreatment protects wheat seedlings against cadmium-induced oxidative stress. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2013; 88: 135-41.

RENISCH L. Laser physics and tissue interactions. *Otolaryngol Clin North Am.* 1996; 29: 893-914.

REDDY GK, STEHNO-BITTEL L, ENWEMEKA CS. Laser photostimulation of collagen production in healing rabbit Achilles tendons. *Lasers Surg Med.* 1998; 22: 281–287.

REMOR AP, DE MATOS FJ, GHISONI K, DA SILVA TL, EIDT G, BURIGO M, DE BEM AF, SILVEIRA PC, DE LEON A, SANCHEZ MC, HOHL A, GLASER V, GONCALVES CA, QUINCOZES-SANTOS A, BORBA R, LATINI A.. Differential effects of insulin on peripheral diabetes-related changes in mitochondrial bioenergetics: involvement of advanced glycosylated end products. *Biochim Biophys Acta.* 2011; 1812: 1460-1471.

RINALDI F. Laser: a review. *Clinics in Dermatology.* 2008; 26: 590–601

RIZZI CF, MAURIZ JL, FREITAS CORRÊA DS, MOREIRA AJ, ZETTLER CG, FILIPPIN LI, MARRONI NP, GONZÁLEZ-GALLEGO J. Effects of low-level laser therapy (LLLT) on the nuclear factor (NF)-kappaB signaling pathway in traumatized muscle. *Lasers Surg Med.* 2006; 38(7): 704-13.

ROCHA JÚNIOR AM, VIEIRA BJ, DE ANDRADE LC, AARESTRUP FM. Low-level laser therapy increases transforming growth factor-beta2 expression and induces apoptosis of epithelial cells during the tissue repair process. *Photomed Laser Surg.* 2009; 27(2): 303-7.

RUSZCZAK Z, SCHWARTZ R. Modern aspects of wound healing: an update. *Dermatol Surg.* 2000; 26: 219–229

RUSZCZAK Z, SCHWARTZ R. Modern aspects of wound healing: an update. *Dermatol Surg.* 2000; 26: 219–229.

SANTANA-BLANK L, RODRÍGUEZ-SANTANA E, SANTANA-RODRÍGUEZ K. Theoretic, experimental, clinical bases of the water oscillator hypothesis in near-infrared photobiomodulation. *Photomed Laser Surg.* 2010; 28(1): 41-52.

SAY RE, THOMSON R. The importance of patient preferences in treatment decisions--challenges for doctors. *BMJ.* 2003; 327(7414): 542-5.

SCHAFER G, CRAMER T, SUSKE G, KEMMNER W, WIEDENMANN B, HOCKER M. Oxidative stress regulates vascular endothelial growth factor-A gene transcription through Sp1- and Sp3-dependent activation of two proximal GC-rich promoter elements. *J Biol Chem.* 2003; 278: 8190–8198.

SERARSLAN G, ALTUG E, KONTAS T, ATIK E, AVCI G. Caffeic acid phenethyl ester accelerates cutaneous wound healing in a rat model and decreases oxidative stress. *Clin Exp Dermatol.* 2007; 32: 709–715.

SERVETTO N, CREMONEZZI D, SIMES JC, MOYA M, SORIANO F, PALMA JA, Campana VR. Evaluation of inflammatory biomarkers associated with oxidative stress and histological assessment of low-level

laser therapy in experimental myopathy. *Lasers Surg Med.* 2010; 42(6): 577–583

SHEFER G, ORON U, IRINTCHEV A, WERNIG A, HALEVY O. Skeletal muscle cell activation by low-energy laser irradiation: a role for the MAPK/ERK pathway. *J Cell Physiol.* 2001; 187(1): 73-80.

SHI X, GARRY DJ. Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. *Genes Dev.* 2006; 20(13): 1692–1708.

SHUKLA A, RASIK AM, PATNAIK GK. Depletion of reduced glutathione, ascorbic acid, vitamin E and antioxidant defence enzymes in a healing cutaneous wound. *Free Radic Res.* 1997; 26: 93–101.

SILVA LH, SILVA MT, GUTIERREZ RM, CONTE TC, TOLEDO CA, AOKI MS, LIEBANO RE, MIYABARA EH. GaAs 904-nm laser irradiation improves myofiber mass recovery during regeneration of skeletal muscle previously damaged by crotoxin. *Lasers Med Sci.* 2011, *in press.*

SILVEIRA PC, SILVA LA, FRAGA DB, FREITAS TP, STRECK EL, PINHO R. Evaluation of mitochondrial respiratory chain activity in muscle healing by low-level laser therapy. *J Photochem Photobiol B.* 2009; 95(2): 89-92.

SILVEIRA PC, SILVA LA, FREITAS TP, LATINI A, PINHO RA. Effects of low power laser irradiation (LPLI) at different wavelengths and doses on oxidative stress and fibrogenesis parameters in an animal model of wound healing. *Lasers Med Sci.* 2011; 26: 125-131.

Silveira PC, Streck EL, Pinho RA. Evaluation of mitochondrial respiratory chain activity in wound healing by low-level laser therapy. *J Photochem Photobiol B.* 2007; 86(3): 279-82.

SJOVALL F, MOROTA S, HANSSON MJ, FRIBERG H, GNAIGER E, ELMER E. Temporal increase of platelet mitochondrial respiration is negatively associated with clinical outcome in patients with sepsis. *Crit Care.* 2010; 14: 214.

SOBUE G, YAMAMOTO M, DOYU M, YASUDA T, MITSUMA T. Expression of mRNA for neurotrophins (NGF, BDNF, and NT-3) and

their receptors (p75<sup>NGFR</sup>, Trk, TrkB and TrkC) in human peripheral neuropathies. *Neurochem. Res.* 1998; 23(6): 821-829.

SOMMER AP, PINHEIRO ALB, MESTER AR e cols. Biostimulatory windows in low intensity laser activation: lasers, scanners and NASA's light-emitting diode array system. *J Clin Laser Med Surg.* 2001; 19: 29–34

STADLER I, LANZAFAME RJ, EVANS R e cols. 830-nm irradiation increases the wound tensile strength in a diabetic murine model. *Lasers Surg Med.* 2001; 28: 220–226

SUPINSKI GS, CALLAHAN LA. Free radical-mediated skeletal muscle dysfunction in inflammatory conditions. *J Appl Physiol.* 2007; 102(5): 2056-63.

SYED I, KYATHANAHALLI CN, JAYARAM B, GOVIND S, RHODES CJ, KOWLURU RA, KOWLURU A. Increased phagocyte-like NADPH oxidase and ROS generation in type 2 diabetic ZDF rat and human islets: role of Rac1-JNK1/2 signaling pathway in mitochondrial dysregulation in the diabetic islet. *Diabetes.* 2011; 60(11): 2843-52.

TAFUR J, MILLS PJ. Low-intensity light therapy: exploring the role of redox mechanisms. *Photomed Laser Surg.* 2008; 26(4): 323-8.

TAM G. Low power laser therapy and analgesic action. *J Clin Laser Med Surg.* 1999; 6: 345-356.

TANG K, BREEN EC, GERBER HP, FERRARA NM, AND WAGNER PD. Capillary regression in vascular endothelial growth factor-deficient skeletal muscle. *Physiol Genomics.* 2004; 18: 63–69.

TIDBALL JG, VILLALTA SA. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2010; 298(5): 1173-87.

TIDBALL JG, WEHLING-HENRICKS M. Macrophages promote muscle membrane repair and muscle fibre growth and regeneration during modified muscle loading in mice in vivo. *J Physiol.* 2007; 578: 327-36.

TIDBALL JG. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005; 288(2): 345-53.

TUNÉR J, HODE L. Low-level laser therapy for hand arthritis-fact or fiction? *Clin Rheumatol*. 2010; 29(9): 1075-6.

VEKSHIN NL, MIRONOV GP. Flavin-dependent oxygen uptake in mitochondria under illumination. *Biofizika*. 1982; 27: 537–539.

VERRALL GM, SLAVOTINEK JP, BARNES PG, FON GT, SPRIGGINS AJ. Clinical risk factors for hamstring muscle strain injury: a prospective study with correlation of injury by magnetic resonance imaging. *Br J Sports Med*. 2001; 35(6): 435-9.

VLADIMIROV YA, OSIPOV AN, KLEBANOV GI. Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation. *Biochemistry (Mosc)*. 2004; 69: 81-9.

WALLIMANN T, WYSS M, BRDICZKA D, NICOLAY K, EPPENBERGER HM. Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis. *Biochem J*. 1992; 281: 21-40.

WERNER S, GROSE R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev*. 2003; 83: 835-70.

WIENDL H, HOHLFELD R, KIESEIER BC. Muscle-derived positive and negative regulators of the immune response. *Curr Opin Rheumatol*. 2005; 17(6): 714-9.

WITKO-SARSAT V, FRIEDLANDER M, CAPELLÈRE-BLANDIN C, NGUYEN-KHOA T, NGUYEN AT, ZINGRAFF J, JUNGERS P, DESCAMPS-LATSCHA B. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int*. 1996; 49(5): 1304-13.

Woessner JF. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this amino acid. *Arch Biochem Biophys*. 1961; 93: 440–447.

WONG-RILEY MT, LIANG HL, EELLS JT, CHANCE B, HENRY MM, BUCHMANN E, KANE M, WHELAN HT. Photobiomodulation directly benefits primary neurons functionally inactivated by toxins: role of cytochrome c oxidase. *J Biol Chem.* 2005; 280(6): 4761-71.

WORLD ASSOCIATION OF LASER THERAPY (WALT). Consensus agreement on the design and conduct of clinical studies with low-level laser therapy and light therapy for musculoskeletal pain and disorders. *Photomed Laser Surg.* 2006; 24(6): 761-2.

WU JY, CHEN CH, WANG CZ, HO ML, YEH ML, WANG YH.. Low-power laser irradiation suppresses inflammatory response of human adipose-derived stem cells by modulating intracellular cyclic AMP level and NF- $\kappa$ B activity. *PLoS One.* 2013; 30(11): 642-7.

YU W, NAIM JO, MCGOWAN M, IPPOLITO K, LANZAFAME RJ. Photomodulation of oxidative metabolism and electron chain enzymes in rat liver mitochondria. *Photochem Photobiol.* 1997; 66: 866-871.

## 9 ANEXOS

### 9.1 Artigo Científico

Lasers Med Sci (2011) 26:125–131  
DOI 10.1007/s10103-010-0839-0

REVIEW ARTICLE

## Effects of low-power laser irradiation (LPLI) at different wavelengths and doses on oxidative stress and fibrogenesis parameters in an animal model of wound healing

Paulo Cesar Lock Silveira · Luciano A. Silva ·  
Tiago P. Freitas · Alexandra Latini · Ricardo A. Pinho

Received: 22 February 2010 / Accepted: 12 September 2010 / Published online: 24 September 2010  
© Springer-Verlag London Ltd 2010

**Abstract** Gallium-arsenide (GaAs) and helium-neon (HeNe) lasers are the most commonly used low-energy lasers in physiotherapy for promoting wound healing and pain modulation. The aim of this study was investigate the effect of low-power laser irradiation (LPLI) at different wavelengths and doses on oxidative stress and fibrogenesis parameters in an animal model of wound healing. The animals were randomly divided into five groups ( $n=6$ ): Controls (skin injured animals without local or systemic treatment), skin injury treated with HeNe 1 J/cm<sup>2</sup> (two seg); skin injury treated with HeNe 3 J/cm<sup>2</sup> (six seg); skin injury treated with GaAs 1 J/cm<sup>2</sup> (three seg); skin injury treated with GaAs 3 J/cm<sup>2</sup> (nine seg). A single circular wound measuring 8 mm in diameter was surgically created on the back of the animal. The rats were irradiated at 2, 12, 24, 48, 72, 96, and 120 h after skin injury. The parameters, namely hydroxyproline content, activities of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), and lipid (TBARS) and protein oxidation (carbonyl groups) measurements were assessed. In addition, wound size

regression was also analyzed. The results showed an improvement in the wound healing reflected by the reduction in wound size and increased collagen synthesis. Moreover, a significant reduction in TBARS levels, carbonyl content, and SOD and CAT activities were observed after laser irradiation, particularly with the treatments HeNe laser 1 and 3 J/cm<sup>2</sup> dose and GaAs 3 J/cm<sup>2</sup> dose. The data strongly indicate that LPLI therapy is efficient in accelerating the skin wound healing process after wounding, probably by reducing the inflammatory phase and inducing collagen synthesis.

**Keywords** Low-power laser · Wound healing · Stress oxidative · Collagen synthesis

### Introduction

Low-power laser irradiation (LPLI) has been used in a variety of clinical applications where it is thought to promote certain processes without inducing any thermal effects [1]. Gallium-arsenide (GaAs) and helium-neon (HeNe) lasers are the most common low-energy lasers used in physiotherapy for promoting wound healing and pain modulation [2].

LPLI treatment has been shown to be effective in controlling pain, in inflammatory processes, as well as in stimulating collagen production, fibroblast proliferation, and local microvascularization [3–7]. Furthermore, it has been demonstrated that LPLI also stimulates cellular metabolism, enhances the regenerative potential, and counterbalance inflammation with analgesia and vasodilatation [8, 9].

The process of wound healing involves an acute inflammatory phase, elicited by the wounding, followed

P. C. L. Silveira · L. A. Silva · T. P. Freitas · R. A. Pinho  
Exercise Biochemistry and Physiology Laboratory,  
Postgraduate Program in Health Sciences, Health Sciences Unit,  
University of Southern Santa Catarina,  
Criciúma, SC, Brazil

P. C. L. Silveira · A. Latini  
Bioenergetics and Oxidative Stress Laboratory,  
Department of Biochemistry,  
Universidade Federal de Santa Catarina,  
Florianópolis, SC, Brazil

P. C. L. Silveira (✉)  
Exercise Biochemistry and Physiology Laboratory/UNESC,  
Av. Universitária, 1105 – Bairro Universitário,  
88806-000 Criciúma, SC, Brazil  
e-mail: silveira\_paulo2004@yahoo.com.br

by regeneration, migration, and proliferation of parenchyma and connective tissue cells, remodeling, collagenization, and finally acquisition of wound strength [10]. In this context, it is known that free radicals play a crucial role in wound healing, particularly in the inflammatory phase [7]. Reactive oxygen species (ROS) contribute to further tissue damage in the events following skin injury and are known to impair the healing process [11]. Increased ROS may therefore cause cell damage by peroxidation of membrane lipids, inactivation of sulfhydryl enzymes, cross-linking of proteins, and breakdown of DNA. To counter this potential damage, organisms have enzymatic and non-enzymatic antioxidant defenses [10]. However, an imbalance between oxidants and antioxidants may lead to a situation defined as oxidative stress during the wound healing process [12]. Increasing evidence in the literature has demonstrated a direct correlation between LPLI and activation of the cellular antioxidant system [7].

However, there is no consensus regarding the most appropriate laser wavelengths and doses to accelerate wound healing. The aim of this study was investigate the effect of low-power laser irradiation (LPLI) at different wavelengths and doses on oxidative stress and fibrogenesis parameters in an animal model of wound healing.

## Materials and methods

### Animals

Adult male Wistar rats (250–300 g) from the Central Animal House of the Universidade do Extremo Sul Catarinense, Santa Catarina, Brazil, were caged in groups of five, provided with commercial rat chow and water ad libitum, and maintained on a 12-h light/12-h dark cycle, at a temperature of  $22^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ . The animals were randomly divided into five groups ( $n=6$ ): Controls (skin injured animals without local or systemic treatment), skin injury treated with HeNe  $1\text{ J}/\text{cm}^2$  (two seg); skin injury treated with HeNe  $3\text{ J}/\text{cm}^2$  (six seg); skin injury treated with GaAs  $1\text{ J}/\text{cm}^2$  (three seg); skin injury treated with GaAs  $3\text{ J}/\text{cm}^2$  (nine seg). All studies were performed in accordance with the National Institutes of Health guidelines on animal care and with the approval of the Ethics Committee of the Universidade do Extremo Sul Catarinense, Santa Catarina, Brazil.

### Epithelial wounding model

The wounding model was induced as described by Carvalho [13]. Briefly, the animals were anesthetized with an intraperitoneal injection of ketamine (70 mg/kg) and xylazine (15 mg/kg). The dorsal region of each animal was

shaved and disinfected with alcohol 70%. In the mid-dorsal region, between the infrascapular line and the tail, a circular area of the skin approximately 8 mm in diameter was removed with a punch. The wounds were uniform in diameter, depth, and location. Control rats were also anesthetized to ensure standardization.

### Irradiation protocol

The low-energy lasers used in this study were gallium-arsenium (GaAs) lasers with pulsed emission (wavelengths 904 nm; peak power 70 W; frequency 9.500 Hz; pulse time 60 ns; spot size  $0.10\text{ cm}^2$ ; power density  $0.4\text{ W}/\text{cm}^2$ ) and helium-neon (HeNe) laser with continuous emission (wavelengths 660 nm; peak power 30 mW; spot size  $0.10\text{ cm}^2$ ) (Laserpulse-Ibramed). Laser irradiation was performed over five distinct regions around the damaged area, with the laser pen being kept perpendicular to the injury at a distance of 1 cm per point, as previously described by Morrone [14]. The animals were irradiated at 2, 12, 24, 48, 72, 96, and 120 h after wounding. The efficacy of the laser irradiation protocol was evaluated after a wound healing period of 5 days.

### Euthanasia protocol

Two hours after the last LPLI application the animals were killed by decapitation and the external border of the injured region was surgically removed and immediately processed and stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  for later analysis.

### Sample preparation

The tissue was homogenized in the buffer used for each technique. The homogenates were centrifuged at  $1,000\times g$  for 10 min at  $4^{\circ}\text{C}$  and the supernatants kept at  $-70^{\circ}\text{C}$  until analysis. The maximum period between homogenate preparation and the biochemical analysis was always less than 5 days.

### Biochemical assays

**Hydroxyproline levels** The hydroxyproline content in samples was determined by a colorimetric method as previously described by Woessner [15]. Initially, the sample (30 mg) was homogenized in buffer specific (1 ml), and 250 ml of homogenate was incubated with 500 ml of 0.05 M chloramine-T for 20 min at room temperature in test tubes. The mixture was then incubated with 500 ml of 3.17 M perchloric acid for 5 min at room temperature. Finally, the mixture was incubated with 500 ml of 20% dimethylbenzaldehyde for 20 min at  $60^{\circ}\text{C}$ . The color developed by the reaction was read spectrophotometrically at



557 nm, and the results were expressed as mg of hydroxyproline per gram of tissue.

**Lipid peroxidation and protein carbonylation assays** The levels of 2-thiobarbituric acid reactive species (TBARS) were measured using the method described by Draper and Hadley [16]. Briefly, tissue was mixed with 1 ml of 10% trichloroacetic acid and 1 ml of 0.67% thiobarbituric acid. Subsequently, the mixture was heated in a boiling water bath for 15 min. The amount of TBARS was determined by measuring the absorbance at 532 nm, and the results were given in nmol TBARS/mg protein. Protein carbonylation was determined according to the method described by Levine et al. [17]. The protein carbonyl content was measured by first forming labeled protein-hydrazone derivatives using 2,4-dinitrophenylhydrazide (DNPH). These derivatives were extracted with 10% (vol/vol) trichloroacetic acid, which was followed by treatment with a 1:1 (vol/vol) mixture of ethanol/ethylacetate and reextraction with 10% trichloroacetic acid. The resulting precipitate was dissolved in 6 M urea hydrochloride. The difference spectrum between a 2,4-dinitrophenylhydrazide protein blank was used to calculate nmol of 2,4-dinitrophenylhydrazide incorporated per mg of protein. The incorporation was measured as the absorbance at 370 nm using a spectrophotometer.

**Superoxide dismutase (SOD) activity assay** SOD activity was determined according to the method of Bannister and Calabrese [18]. Specific activity was expressed as units per mg protein. One unit is estimated by the 50% inhibition of adrenaline auto-oxidation read at 480 nm in a spectrophotometer.

**Catalase (CAT) activity assay** CAT activity was measured by the rate of decrease in hydrogen peroxide absorbance at 240 nm [19]. Enzyme activity was expressed as units per mg protein. One unit is defined as 1  $\mu$ mol of reduced hydrogen peroxide per minute.

**Protein determination** The amount of protein in the samples was determined using the Lowry technique [20].

#### Statistical analysis

Results are presented as mean  $\pm$  standard error of mean. Assays were performed in duplicate and the mean was used for statistical analysis. Data were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the post hoc Tukey test when *F* was significant. Only significant *F* values are given in the text. Differences between the groups were rated significant at  $p < 0.05$ . All analyses were carried

out in an IBM-compatible PC computer using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software.

## Results

### Wound size evolution

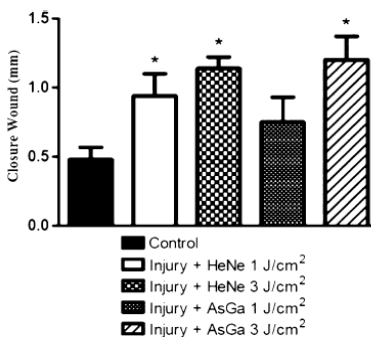
Figure 1 shows a significant improvement in the wound healing process (by measuring the regression of the wound size) in the groups irradiated with HeNe 1 and 3  $J/cm^2$  ( $0.94 \pm 0.16$  cm;  $1.14 \pm 0.08$  cm, respectively) and GaAs 3  $J/cm^2$  ( $1.20 \pm 0.17$  cm), when comparing to controls ( $0.48 \pm 0.09$  cm).

### Induction of fibrogenesis

Figure 2 shows a significant increase in hydroxyproline content in the groups treated with HeNe 1 and 3  $J/cm^2$  ( $89.15 \pm 2.78$ ,  $108.63 \pm 12.2$ ) and GaAs 3  $J/cm^2$  ( $83.94 \pm 4.69$ ) in relation to the control group ( $51.53 \pm 2.18$ ).

### Oxidative damage

Figure 3a shows a significant decrease in TBARS measurement in the groups treated with HeNe 3  $J/cm^2$  ( $0.014 \pm 0.002$ ) and GaAs 3  $J/cm^2$  ( $0.016 \pm 0.002$ ) compared to the control group ( $0.030 \pm 0.008$ ). In parallel, Fig. 3b shows that protein



**Fig. 1** Effect of low-level laser irradiation in the wound healing process (by measuring the regression of the wound size) 5 days after wounding. In low-level laser therapy group, wounds were treated 2, 12, 24, 48, 72, 96, and 120 h after wounding. Data are expressed as mean  $\pm$  standard error of mean for six animals. Different from control ( $*p < 0.05$ ) (least square difference (LSD) test)

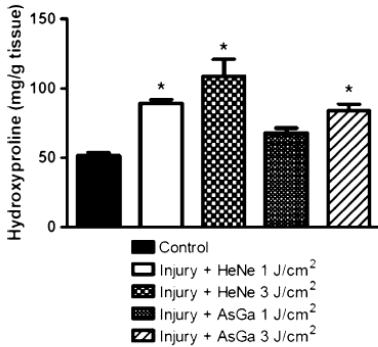


Fig. 2 Effect of low-level laser irradiation on hydroxyproline levels after wounding (5 days). Data are expressed as mean  $\pm$  standard error of mean for six animals. Different from control ( $*p < 0.05$ ) (least square difference (LSD) test)

carbonylation was significantly reduced after treating with HeNe 1 and 3 J/cm<sup>2</sup> ( $0.24 \pm 0.07$ ,  $0.21 \pm 0.04$ ), and AsGa 3 J/cm<sup>2</sup> ( $0.12 \pm 0.04$ ) (control group:  $0.52 \pm 0.10$ ).

#### Enzymatic antioxidant defenses

Figure 4a and b show that LPLI treatment (HeNe and GaAs) significantly reduced SOD ( $0.87 \pm 0.067$ ,  $0.73 \pm 0.044$ ,  $0.82 \pm 0.03$ ) and CAT ( $0.24 \pm 0.03$ ,  $0.22 \pm 0.02$ ,  $0.22 \pm 0.05$ ) in the groups treated with HeNe 1 and 3 J/cm<sup>2</sup> and GaAs 3 J/cm<sup>2</sup>, respectively, in relation to controls ( $1.45 \pm 0.40$ ,  $0.47 \pm 0.12$ ).

#### Discussion

In the present work, we evaluated the skin wound healing process after wounding and treatment with different LPLI types and doses by measuring the regression of the wound size, collagen synthesis, and oxidative stress parameters. The results showed an improvement in the wound healing process, since wound size was significantly reduced, fibrogenesis was induced and oxidative damage to biomolecules was reduced, after 5 days of irradiation.

The inflammatory response is represented by neutrophilia, neutrophil activation, and the accumulation of neutrophils and other defense cells in the injured tissue [21]. The neutrophils and monocytes play a key role in the inflammatory phase of wound repair by secreting cytokines and growth factors [22, 23]. However, these events also increase the production of

oxidants and may lead to oxidative damage of lipids and/or proteins and therefore, cell necrosis, compromising tissue recovery [24].

The reduction in the wound size and consequent healing suggest a positive effect of LPLI treatment (HeNe and GaAs lasers) at different wavelengths and doses (Fig. 1). In this scenario, the beneficial effect of LPLI might be related to an accelerated inflammatory phase and/or an improvement in the oxidative stress parameters.

In the early stages of inflammation, cell debris is removed by the infiltrating neutrophils and followed by a regenerative response in which satellite cells proliferate to replace the previously damaged and phagocytosed cells [25]. Previous studies from our group [7, 9] have demonstrated that the inflammatory phase is accelerated by LPLI due to an increase in mitochondrial ATP

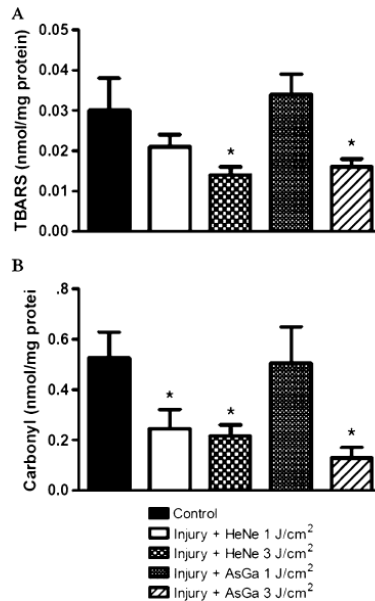
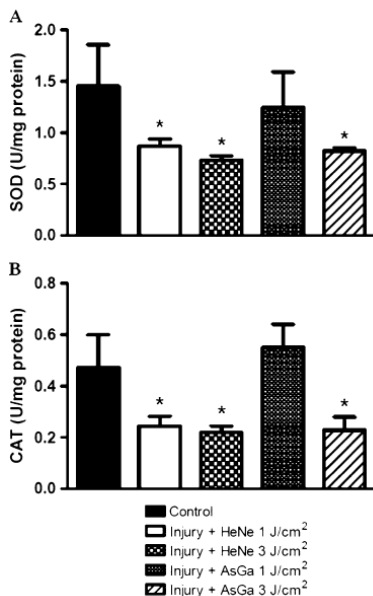


Fig. 3 Effect of low-level laser irradiation on thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) (a) and protein carbonyl (b) after wounding (5 days). Data are expressed as mean  $\pm$  standard error of mean for six animals. Different from control ( $*p < 0.05$ ). (least square difference (LSD) test)



**Fig. 4** Effect of low-level laser irradiation on superoxide dismutase (a) and catalase (b) activities after wounding (5 days). Data are expressed as mean  $\pm$  standard error of mean for six animals. Different from sham (\**p*, 0.05) (least square difference (LSD) test)

production. Increased activity in mitochondrial electron transport can be associated with a variety of mitochondrial enzyme activities. Photostimulatory effects on a variety of mitochondrial enzymes (protein complexes in the respiratory transport chain) have been proposed and investigated by different researchers [26–28].

The primary events in cells exposed to visible-to near-infrared radiation are believed to occur in mitochondria [26, 29], where one of the three major photoacceptor molecules, cytochrome *c*, is located. Britton Chance's group postulated that about 50% of near-infrared light is absorbed by mitochondria chromophores, including cytochrome *c* [30, 31]. Byrnes [32] suggests that during the first days of healing, the repair processes are directed towards preventing subsequent blood loss (homeostasis), with formation of a fibrin plug that supplies the preliminary matrix for subsequent events, beginning with the adhesion of

platelets to the collagen in the perivascular space. This contact activates the platelets, thereby releasing platelet factors that accelerate the migration and proliferation of the principal cell type in the healing process, fibroblasts [33]. In the present study, it was observed increased collagen synthesis in irradiated animals and this reinforced the idea that migration and proliferation of fibroblasts is accelerated by LPLI. Therefore, it could be assumed that HeNe and GaAs treatment accelerated granulation and the formation of fibroblastic tissue.

The fibrotic phase of wound healing is characterized by the synthesis of collagen, a protein mainly composed of glycine, proline, and hydroxyproline [34]. In this context, hydroxyproline content results are in agreement with previous publications [35–37], in which laser therapy improved the wound healing process by increasing production of collagen.

Studies recently conducted indicate that ROS and other reactive species including superoxide, hydroxyl radicals, nitric oxide, peroxynitrite, and the free radical-derived product hydrogen peroxide might play an important role in wound healing [22, 38, 39]. The ROS production is an essential process to protect cells against invasion of infectious agents. However, when ROS formation becomes excessive, ROS can damage biomolecules and hinder the process of recovery in the injured tissue [40]. On the other hand, some studies have reported that LPLI is able to reduce the levels of mitochondria-derived free radicals in epithelial cells and inhibit the respiratory burst in rat neutrophils [41]. In addition, it has been suggested that the change in the cellular redox state leads to photobiostimulatory processes [42]. In line with this, our results show that the activities of antioxidant enzymes (SOD and CAT) were reduced after LPLI application. It is possible that these biochemical modulations are due to a decrease in the extent of the inflammatory response and consequent decrease of ROS. SOD plays an important role in the defense against oxidative stress by converting the superoxide anion to the less bioactive H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> molecules [43]. We detected an increase in SOD activity in the control group and a decrease in LPLI groups. As elevated antioxidant enzyme activity is one part of the host cellular defense system, increased SOD activity in control animals (injured animals) may be due to increased exposure to oxidative stress [44]. SOD is an inducible enzyme and its activity depends on O<sub>2</sub> concentration. As LPLI suppresses lipid peroxidation and protein carbonylation due to its established antioxidant effects, the decreased SOD activity observed in the LPLI groups may be indicative of the attenuated effects of SOD in a reduced oxidative stress environment [45].

CAT has an important role in the acquisition of tolerance to oxidative stress. It is a widely distributed defensive enzyme that catalyses the breakdown of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a strong

biological oxidizing agent [43]. Therefore, the significant CAT activity reduction in LPLI treatments might be related to reduced generation of ROS.

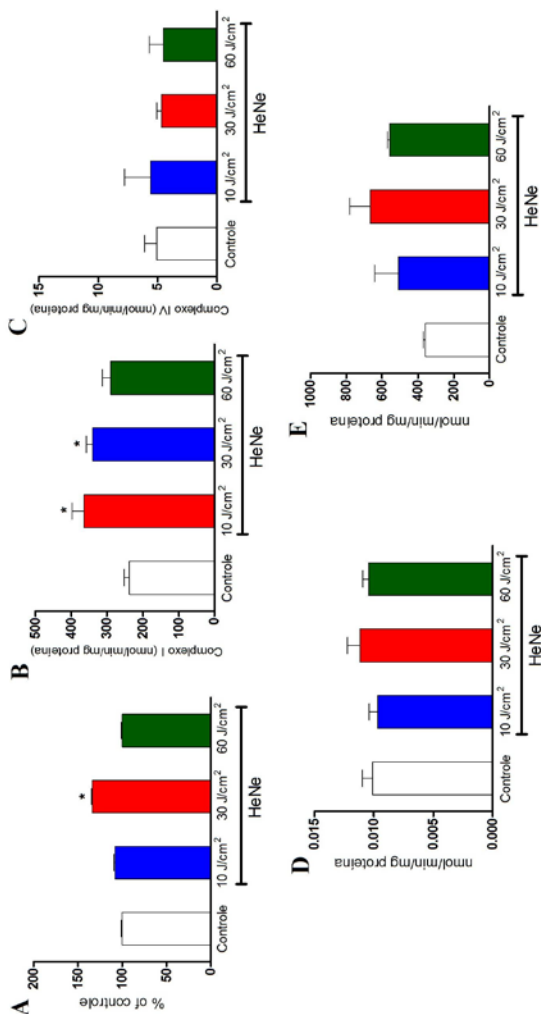
Recently, great emphasis has been placed on the application of laser irradiation of low energy density, with the objective of accentuating the cellular biochemical reactions and, in this way, contributing to a significantly more efficient resolution of the wound. Although the present results are preliminary, we suggest that LPLI presents beneficial effects on the wound healing process, probably by speeding up the inflammatory phase and inducing collagen synthesis, particularly with the laser HeNe 1 and 3 J/cm<sup>2</sup> doses and GaAs 3 J/cm<sup>2</sup> dose. Further studies are being carried out in our laboratory to better understand the biological effects of LPLI on wound healing.

## References

- Miyata H, Genma T, Ohshima M et al (2006) Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated protein kinase activation of cultured human dental pulp cells by low-power gallium-aluminum-arsenic laser irradiation. *Int Endod J* 39:238–244
- Thawer HA, Houghton PE (1999) Effect of laser irradiation on the growth and development of fetal mouse limbs in an in vitro model. *Lasers Surg Med* 24:285–295
- Conlan MJ, Rapley JW, Cobb CM (1996) Biostimulation of wound healing by low-energy laser irradiation. A review. *J Clin Periodontol* 23:492–496
- Nascimento PM, Pinheiro AL, Salgado MA, Ramalho LM (2004) A preliminary report on the effect of laser therapy on the healing of cutaneous surgical wounds as a consequence of an inversely proportional relationship between wavelength and intensity: histological study in rats. *Photomed Laser Surg* 22:513–518
- Pessoa ES, Melhado RM, Theodoro LH, Garcia VG (2004) A histologic assessment of the influence of low-intensity laser therapy on wound healing in steroid-treated animals. *Photomed Laser Surg* 22:199–204
- Pinheiro AL, Mreires GC, Barros-Vieira AL, Almeida D, Carvalho CM, Santos JN (2004) Phototherapy improves healing of cutaneous wounds in nourished and undernourished Wistar rats. *Braz Dent J* 15:21–28
- Silveira PCL, Streck EL, Pinho RA (2007) Evaluation of mitochondrial respiratory chain activity in wound healing by low-level laser therapy. *Photochem Photobiol* 86:279–282
- Karu T, Pyatibrat L, Kalendo G (1995) Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated in vitro. *J Photochem Photobiol B: Biol* 27:219–223
- Silveira PCL, Silva LA, Fraga DB et al (2009) Evaluation of mitochondrial respiratory chain activity in muscle healing by low-level laser therapy. *Photochem Photobiol* 95:89–92
- Seraslan G, Altug E, Kontas T, Atik E, Avci G (2007) Caffeic acid phenethyl ester accelerates cutaneous wound healing in a rat model and decreases oxidative stress. *Clin Exp Dermatol* 32:709–715
- Phan T, Wang L, See P (2001) Phenolic compounds of *Chromolaena odorata* protect cultured skin cells from oxidative damage: implication for cutaneous wound healing. *Biol Pharm Bull* 24:1373–1379
- Juránek I, Bezek S (2005) Controversy of free radical hypothesis: reactive oxygen species—cause or consequence of tissue injury? *Gen Physiol Biophys* 24:263–278
- Carvalho PTC, Mazzner N, Reis FA (2006) Analysis of the influence of low-power HeNe laser on the healing of skin wounds in diabetic and non-diabetic rats. *Acta Cir Bras* 21:177–183
- Morrone ET (1998) Muscular trauma treated with a Ga-Al-As diode laser: in vivo experimental study. *Lasers Med Sci* 13:293–298
- Woessner JF (1961) The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this amino acid. *Arch Biochem Biophys* 93:440–447
- Draper HH, Hadley M (1990) Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Meth Enzymol* 186:421–431
- Levine RL, Garland D, Oliver CN (1990) Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Meth Enzymol* 186:464–478
- Bannister JV, Calabrese L (1987) Assays for SOD. *Meth Biochem Anal* 32:279–312
- Acbi H (1984) Catalase in vitro. *Meth Enzymol* 105:121–126
- Lowry OH, Rosebrough NG, Farr AL (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275
- Li G, Feng X, Wang S (2005) Effects of Cu/Zn superoxide dismutase on strain injury-induced oxidative damage to skeletal muscle in rats. *Physiol Res* 54:193–199
- Pereira LM, Hatanaka E, Martins EF et al (2008) Effect of oleic and linoleic acids on the inflammatory phase of wound healing in rats. *Cell Biochem Funct* 26:197–204
- Henry G, Warren L, Garner MD (2003) Inflammatory mediators in wound healing. *Surg Clin N Am* 83:483–507
- Patwell DM, Jackson MJ (2004) Contraction-induced oxidants as mediators of adaptation and damage in skeletal muscle. *Exerc Sport Sci Rev* 32:14–18
- Sommer AP, Pinheiro ALB, Mester AR et al (2001) Biostimulatory windows in low intensity laser activation: lasers, scanners and NASA's light-emitting diode array system. *J Clin Laser Med Surg* 19:29–34
- Karu T (1999) Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *J Photochem Photobiol B: Biol* 49:1–17
- Vekshin NL, Mironov GP (1982) Flavin-dependent oxygen uptake in mitochondria under illumination. *Biofizika* 27:537–539
- Passarella S, Casamassima F, Molinari S et al (1984) Increase of proton electrochemical potential and ATP synthesis in rat liver mitochondria irradiated in vitro by He-Ne laser. *FEBS Lett* 175:95–99
- Karu T (1987) Photobiological fundamentals of low-power laser therapy. *IEEE J Quantum Electron* 23:1703–1717
- Benouoit B, Kitai T, Chance B (1994) Contribution of the mitochondrial compartment to the optical properties of the rat liver: a theoretical and practical approach. *Biophys J* 67:2501–2510
- Cooper CE, Springett R (1997) Measurement of cytochrome oxidase and mitochondrial energetics by near-infrared spectroscopy. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 352:669–676
- Byrnes KR, Barna L, Chenault VM et al (2004) Photobiomodulation improves cutaneous wound healing in an animal model of type II diabetes. *Photomed Laser Surg* 22:281–290
- Poli G, Parola M (1997) Oxidative damage and fibrogenesis. *Free Radic Biol Med* 22:287
- Fukushima K, Badlani N, Usas A et al (2001) The use of antifibrosis agent to improve muscle recovery after laceration. *Am J Sports Med* 29:394
- Reddy GK, Stehno-Bittel L, Enwemeka CS (1998) Laser photostimulation of collagen production in healing rabbit Achilles tendons. *Lasers Surg Med* 22:281–287

36. Stadler I, Lanzafame RJ, Evans R et al (2001) 830-nm irradiation increases the wound tensile strength in a diabetic murine model. *Lasers Surg Med* 28:220–226
37. Al-Watban F, Andres B (2003) Polychromatic LED therapy in burn healing of non-diabetic and diabetic rats. *J Clin Laser Med Surg* 21:249–258
38. Gillitzer R, Goebeler M (2001) Chemokines in cutaneous wound healing. *J Leukoc Biol* 69:513–521
39. Ruszczyk Z, Schwartz R (2000) Modern aspects of wound healing: an update. *Dermatol Surg* 26:219–229
40. Kerkweg U, Petrat F, Korth HG (2007) Disruption of skeletal myocytes initiates superoxide release: contribution of NAD(P)H oxidase. *Shock* 27:552–558
41. Albertini R, Villavarde AB, Aimbire F (2007) Anti-inflammatory effects of low-level laser therapy (LLLT) with two different red wavelengths (660 nm and 684 nm) in carrageenan-induced rat paw edema. *J Photochem Photobiol B: Biol* 89:50–55
42. Liu X, Zhou Y, Liu TC (2009) Effects of low-level laser irradiation on rat skeletal muscle injury after eccentric exercise. *Photomed Laser Surg* 27:863–869
43. Halliwell B, Gutteridge JMC (2007) *Free Radical in Biology Medicine*. University Press, Oxford, NY
44. Musalmah M, Fairuz AH, Gapor MT et al (2002) Effect of vitamin E on plasma malondialdehyde, antioxidant enzyme levels and the rates of wound closures during wound healing in normal and diabetic rats. *Asia Pacific J Clin Nurt* 11:448–451
45. Shukla A, Rasik AM, Patnaik GK (1997) Depletion of reduced glutathione, ascorbic acid, vitamin E and antioxidant defence enzymes in a healing cutaneous wound. *Free Radic Res* 26:93–101

## 9.2 Efeitos do LBP em células do sistema nervoso central (C6).



Efeito do LBP HeNe com doses de 10, 30 e 60 J/cm<sup>2</sup> sobre a redução de MTT (A), atividade do complexo I e IV da cadeia respiratória (B e C), creatina cinase (D) e hexoquinase (E) em células do sistema nervoso central (C6). As barras representam a média±erro padrão da média para seis animais. \* $P < 0.05$  vs. Controle (ANOVA de 1 via seguido de teste *post hoc* de Tukey).